

Université de Montréal

**NIVEAUX DE VITAMINE A (RÉTINOL et ACIDE RÉTINOÏQUE)  
MESURÉS DANS LE SANG DE CORDON OMBILICAL ET  
DÉVELOPPEMENT RÉNAL DES NOUVEAU-NÉS**

Par

Daniel Constantin Manolescu

Département de Nutrition  
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures en vue d'obtention du grade de  
Maître ès Sciences (M.Sc.) en Nutrition

Août, 2009

©Daniel Constantin Manolescu, 2009

Université de Montréal  
Faculté des Études Supérieures

Ce mémoire intitulé :

**NIVEAUX DE VITAMINE A (RETINOL et ACIDE RETINOIC)  
MESURÉS DANS LE SANG DE CORDON OMBILICAL ET  
DÉVELOPPEMENT RÉNAL DES NOUVEAU-NÉS**

Présenté par :  
Daniel Constantin Manolescu

a été évalué par un jury composé par les personnes suivantes :

Dr John S.D. Chan  
Président-rapporteur

Dr Pangala V. Bhat  
Directeur de recherche

Dr Isabelle Bourdeau  
Membre du jury

Mémoire accepté le : **10.Decembre.2009**

## **RÉSUMÉ:**

**Introduction :** La Vitamine A (rétinol, ROL) et son métabolite l'acide rétinoïque (AR) sont essentielles pour l'embryogénèse. L'excès comme l'insuffisance d'AR sont nocives. L'AR est régulé dans l'embryon par des gènes spécifiques (ALDH, CRABP, CYP).

**Hypothèse :** Les grandes variations d'AR dans le plasma des adultes normaux, nous ont orienté à mesurer les rétinoïdes (ROL et RA) dans le sang de cordon ombilical, pour évaluer des corrélations avec des polymorphismes des gènes impliqués dans le métabolisme de l'AR et le développement rénal (ALDH2, CRABP2, CYP26A1; B1). Vérifier pour des corrélations entre ces rétinoïdes et/ou avec la taille de reins à la naissance.

**Méthodes :** Extraction du ROL et RA du sang de cordon ombilical de 145 enfants et analyse par HPLC. Le volume des reins a été mesuré par ultrasonographie et l'ADN génomique leucocytaire extrait (FlexiGene DNA-Kit). 10 échantillons d'ADN ont été exclus (qualité). Les htSNP : ALDH1A2, CRABP2, CYP26A1;B1 du génome humain (HapMap) ont été séquencés et génotypés (Sequenom iPLEX PCR). Des tests biostatistiques des fréquences génotypiques et alléliques ont été effectués (Single-Locus,  $\chi^2$ , Kruskal-Wallis, Allelic-Exact). Des corrélations (ROL, RA, SNPs, V-reins) ont été analysés (Kendall-tau /Oakes).

**Résultats :** La  $\Delta$  RA (0.07-550.27 nmol/l) non corrélé avec la  $\Delta$  ROL (51.39-3892.70 nmol/l). Il n'y a pas d'association ROL ou RA avec les volumes des reins ou avec les SNPs/ CYP21A1;B1. **Corrélations trouvées :** 1. ( $p=0.035$ ), polymorphisme génétique ALDH1A2-SNP (rs12591551:A/C) hétérozygote/CA, (25 enfants, 19%) avec moyennes d'AR (62.21 nmol/l). 2. ( $p=0.013$ ), polymorphisme CRABP2-SNP (rs12724719:A/G) homozygote/AA (4 enfants, 3%) avec hautes valeurs moyennes d'AR (141,3 nmol/l).

**Discussion-Conclusion :** Les grandes  $\Delta$ RA suggèrent une variabilité génique individuelle du métabolisme de ROL. Les génotypes (CA)-ALDH1A2/ SNP (rs12591551:A/C) et (AA) -CRABP2/SNP (rs12724719:A/G) sont associés à des valeurs moyennes hautes d'AR, pouvant protéger l'embryogénèse lors d'une hypovitaminose A maternelle.

**Mots clé:** sang de cordon ombilical, ROL-rétinol, AR-acide rétinoïque, HPLC, SNP-polymorphisme, ALDH1A2, CRABP2, CYP26A1

## ABSTRACT

**Introduction:** Vitamin A (retinol, ROL) modulate the embryogenesis thorough RA, its metabolite. Excess or deficiency being pathologic, the RA is tight regulated in the embryo thorough specific genes (ALDH, CRABP, CYP, etc.) important for Vitamin A metabolism.

**Hypothesis:** High RA variations in healthy adults plasma, oriented to ROL, RA evaluation in human cord blood, in regard of possible correlations with polymorphisms of genes involved in RA metabolism and kidney development (RALDH2, CRABP2, CYP26A1,B1). Correlations between ROL and RA and/or with birth kidney size might also occur.

**Methods:** Cord blood ROL and RA were extracted and HPLC analysed, from 145 Montreal healthy newborns. Kidney volumes already measured by ultrasonography. Genomic leucocytary DNA extraction was performed with FlexiGene DNA-Kit. 10 samples excluded (DNA quality). htSNP choices: ALDH1A2, CRABP2, CYP26A1;B1 were made on HapMap human genome. Sequencing, genotyping (Sequenom iPlex PCR) was made for these genes eventual SNPs. Biostatistics tests for genotype and allelic frequencies (Single-Locus,  $\chi^2$ , Kruskal-Wallis, Allelic-Exact) and Kendall-*tau* /Oakes analysis for eventual ROL, RA, SNPs, V-reins correlations, were performed.

**Results:** No correlation found between  $\Delta$  RA (0.07-550.27 nmol/L) and  $\Delta$  ROL (51.39-3892.70 nmol/L). No association ROL or RA with kidney volumes nor with SNPs/CYP21A1;B1. **Found correlations:** **1.** ( $p=0.035$ ), polymorphism ALDH1A2-SNP (rs12591551:A/C) heterozygous/CA, (25babies, 19%) with RA (mean  $\sim$ 62.21nmol/L). **2.** ( $p=0.013$ ), polymorphism CRABP2-SNP (rs12724719: A/G) homozygous/AA (4babies, 3%) with RA (mean $\sim$ 141, 3 nmol/L).

**Discussion/Conclusion:** Big  $\Delta$  RA not correlated with  $\Delta$  ROL suggests individual genetic variance on RA metabolism. Genotypes (CA)-ALDH1A2/SNP (rs12591551:A/C) and (AA)-CRABP2/SNP (rs12724719: A/G) are associated with high cord blood RA mean and may be embryogenesis protective in a maternal hypovitaminosis-A, environment.

**Key words:** umbilical cord blood, ROL-retinol, AR-retinoic acid, HPLC, SNP-polymorphism, ALDH1A2, CRABP2, CYP26A1

## TABLE DE MATIÈRES

RÉSUMÉ .....	III
ABSTRACT .....	IV
LISTE DES TABLEAUX .....	VII
LISTE DES FIGURES .....	VIII
LISTE DES ABRÉVIATIONS .....	IX
REMERCIEMENTS .....	XII
<b>CHAPITRE 1 : Revue de littérature .....</b>	<b>1</b>
<b>1.) INTRODUCTION DE LA VITAMINE A.....</b>	<b>2</b>
1.1 Généralités .....	2
1.2 Survol général du métabolisme de la Vitamine A .....	5
<b>2.) METABOLISME EXTRA-CELLULES CIBLES DE LA VITAMINE A.....</b>	<b>12</b>
2.1. Principaux sources de la Vitamine A.....	12
2.2. Voies d'absorption .....	14
2.3. Réserves et mobilisation. Le rôle du foie .....	18
2.4. Transport dans le sang vers les tissus et cellules cibles .....	19
<b>3.) TRANSPORT ET PROTEINES DE LIAISON DES RETINOIDES.....</b>	<b>20</b>
3.1. RBP - Protéine de liaison du rétinol (ROL).....	22
3.2. CRBP- I, II et III - Protéines cellulaires de liaison du rétinol.....	24
3.3. CRABP-I et II- Protéines cellulaires de liaison de l'acide rétinoïque .....	28
<b>4.) METABOLISME INTRA- CELLULES CIBLES DE LA VITAMINE A.....</b>	<b>33</b>
4.1. L'ACIDE RETINOÏQUE (AR) - FORME ACTIVE DE LA VIT.A.....	33
4.1.1 Fonctions générales de l'acide rétinoïque.....	33
4.1.2 Synthèse biologique de l'acide rétinoïque.....	35
4.2 ENZYMOLOGIE DANS LA BIOSYNTHESE DE L'ACIDE RETINOÏQUE .....	39
4.2.1 Les alcool déshydrogénases a chaîne moyenne (MDR). Oxydation ROL.....	40
4.2.2 Les déshydrogénases/réductases à chaîne courte (SDR). Oxydation ROL....	42
4.2.3 Les aldéhydes déshydrogénases (ALDH). Oxydation du RAL en AR.....	45
4.2.3.1. RALDH 1 (ALDH1A1) / RALDH type 1 (E1, AHD2 ou ALDH1).....	48
4.2.3.2. RALDH 2 (ALDH1A2) / RALDH type 2 (V2).....	49
4.2.3.3. RALDH 3 (ALDH1A3) / RALDH type 3 (V1).....	52
4.2.3.4. RALDH4 (ALDH8A1) / RALDH type 4 .....	53
4.2.3.5. Certaines enzymes de la famille des Cytochrome P450 .....	54
4.3 CATABOLISME DE L'AR - Cytochromes CYP26 / Superfamille P450 .....	55
4.4 ACTIVITÉS BIOLOGIQUES GÉNOMIQUES DE L'ACIDE RÉTINOÏQUE.....	57

4.4.1 Les récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque (RARs et RXRs).....	60
4.4.1.1. Les RARs .....	63
4.4.1.2. Les RXRs .....	65
4.4.2 Les éléments de réponse des récepteurs à l'AR (RARE et RXRE).....	69
<b>5.) EFFETS PHYSIOLOGIQUES ET IMPLICATIONS CLINIQUES.....</b>	<b>73</b>
5.1 LA VISION .....	74
5.2 TEGUMENTS, PEAU ET L'INTEGRITÉ EPITHELIALE .....	75
5.3 LE SYSTÈME IMMUNITAIRE.....	76
5.4 DIVERS CANCERS. Leucémie aigüe pro-myélocytaire .....	77
5.5 ORGANOGÉNESE ET DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE.....	79
5.6 AUTRES IMPLICATIONS BIOLOGIQUES DES RETINOÏDES .....	80
<b>6.) HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS .....</b>	<b>81</b>
6.1 Les hypothèses.....	81
6.2 Les objectifs.....	82
<b>CHAPITRE 2: <i>Rôle of vitamin a in determining nephron mass and possible relationship to hypertension</i>.....</b>	<b>84</b>
<b>CHAPITRE 3: <i>Retinoic acid levels in cord blood from healthy montreal newborns are associated with ALDH1A2 and CRABP2, two important genes in kidney development</i>.....</b>	<b>89</b>
ABSTRACT .....	91
INTRODUCTION .....	92
MATERIAL AND METHODS.....	93
RESULTS .....	95
DISCUSSION .....	97
CONCLUSION .....	98
REFERENCES .....	99
TABLES AND FIGURES LEGENDS.....	101
<b>CHAPITRE 4 : Discussions et conclusions globales des travaux.....</b>	<b>107</b>
4.1. But .....	108
4.2. Discussions.....	108
4.3. CONCLUSIONS.....	115
4.4. PERSPECTIVES ET PROPOSITIONS .....	116
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>I</b>

## LISTE DES TABLEAUX

### CHAPITRE 1 – Revue de la littérature

<b>Tableau 1.</b> Descriptions de principales protéines de liaison aux rétinoïdes .....	32
<b>Tableau 2.</b> Expression tissulaire des différentes RALDHs chez la souris.....	47
<b>Tableau 3.</b> Activités des RALDHs pour divers substrats de RAL.....	47
<b>Tableau 4.</b> Caractéristiques des quelques hétérodimères formés par les RXR.....	68
<b>Tableau 5.</b> Spécificités de substrats des protéines du métabolisme de l'AR.....	72

### CHAPITRE 2 - *RÔLE OF VITAMIN A IN DETERMINING NEPHRON MASS AND POSSIBLE RELATIONSHIP TO HYPERTENSION - Article 1*

### CHAPITRE 3 - *RETINOIC ACID LEVELS IN CORD BLOOD FROM HEALTHY MONTREAL NEWBORNS ARE ASSOCIATED WITH ALDH1A2 AND CRABP2, TWO IMPORTANT GENES IN KIDNEY DEVELOPMENT – Article 2*

<b>Table 1-</b> Cord blood $\Delta$ RA vs. mean ROL levels in three groups (G1, G2 and G3)...	102
---	-----

## LISTE DES FIGURES

### CHAPITRE 1 – Revue de la littérature

<b>Figure 1</b>	Structures des principaux Rétinoïdes et $\beta$ -carotène.....	4
<b>Figure 2</b>	Digestion et absorption intestinale de Vit. A alimentaire. Schéma simplifiée.....	6
<b>Figure 3</b>	Métabolisme de la Vitamine A. Modèle mathématique simplifié.....	7
<b>Figure 4</b>	Différentes formes de Vitamine A présentes dans la circulation sanguine.....	8
<b>Figure 5</b>	Principaux formes des caroténoïdes présentes dans le sang humain.....	14
<b>Figure 6</b>	$\beta$ -carotène, métabolisme via clivage central et excentrique.....	15
<b>Figure 7</b>	Mécanismes de digestion et absorption intestinale de la Vit. A.....	18
<b>Figure 8.</b>	Métabolisme général de la vitamine A : digestion, absorption, transport, dépôt, mobilisation, livraison et action aux tissus cibles.....	20
<b>Figure 9.</b>	Bref métabolisme des protéines cellulaires de liaison des rétinoïdes.....	22
<b>Figure 10.</b>	Voies métaboliques des rétinoïdes intra-cellules cibles non-visuelles.....	33
<b>Figure 11.</b>	Biosynthèse et métabolisme intracellulaire de l'AR.....	36
<b>Figure 12.</b>	Possible modèle de biosynthèse directe et relationnelle des isomères de l'AR.....	39
<b>Figure 13.</b>	Étapes enzymatiques impliquées dans la biosynthèse de l'AR à partir du ROL.....	39
<b>Figure 14.</b>	Catabolisme de l'acide rétinoïque.....	55
<b>Figure 15.</b>	Schéma de régulation génique :AR via les récepteurs RAR et RXR et RARE ....	58
<b>Figure 16. A,B,C,D</b>	Récepteurs à l'AR (RAR et RXR),RARE ,transcription génique.....	62
<b>Figure 17.</b>	Structure de base des RAR et RXR et récepteurs de type hormonale.....	63
<b>Figure 18.</b>	Diversité combinatoire: RXR, RAR, PPAR et régulation génique par l'AR.....	66
<b>Figure 19.</b>	Rétinoïdes et système multi-RARE. Régulation du gène PEPCK par l'AR.....	71
<b>Figure 20.</b>	Régulation génique par l'AR avec métabolisme général des rétinoïdes.....	72
<b>Figure 21.</b>	Le cycle visuel des rétinoïdes chez les vertébrés.....	75

### CHAPITRE 2 - *Role of vitamin a in determining nephron mass and possible relationship to hypertension – Article 1*

<b>Figure 1</b>	Implication métabolique de la Vitamine A dans le développement rénal.....	86
<b>Figure 2</b>	Début de la néphrogenèse. Développements et mécanismes moléculaires.....	86

### CHAPITRE 3 - *Retinoic acid levels in cord blood from healthy Montréal newborns are associated with ALDH1A2 and CRABP2, two important genes in kidney development*

<b>Figure 1</b>	HPLC chromatogram of (A) cord blood and (B) standard, retinoids.....	103
<b>Figure 2</b>	Distribution of umbilical cord RA levels in term newborns.....	104
<b>Figure 3</b>	ALDH1A2 SNP location and frequencies for rs12591551 variant.....	105
<b>Figure 4:</b>	CRABP2 SNP location and frequencies for rs12724719 variant.....	106

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

<b>ADNc</b>	Acide désoxyribonucléique complémentaire
<b>ADH</b>	Alcool déshydrogénase
<b>ALDH</b>	Aldéhyde déshydrogénase
<b>AF</b>	Fonction de transactivation
<b>APL</b>	Leucémie aiguë promyélocytaire
<b>ApoB</b>	Apolipoprotéine B
<b>Apo-CRABP</b>	CRABP libre (sans l'AR)
<b>Apo-CRBP</b>	CRBP libre (sans le ROL ou autre rétinoïdes)
<b>AR ou RA</b>	Acide Rétinoïque (Retinoic acid)
<b>ARAT</b>	Acyl-CoA : rétinol acyltransphérase
<b>ARNm</b>	Acide ribonucléique messenger
<b>ARDS</b>	Syndrome de détresse respiratoire adulte
<b>at-</b>	Identification d'isomérisation (ex. <i>at-</i> , <i>9cis</i> , <i>13cis</i> , etc.)
<b>CEL</b>	Ester carboxylique
<b>Ch</b>	Cholestérol
<b>CM</b>	Chylomicron
<b>CMER</b>	Chylomicron chargé d'ester de ROL
<b>COUP-TF</b>	Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor
<b>CRABP (I et II idem 1 et 2)</b>	Protéine cellulaire liant l'acide Rétinoïque
<b>CRAD</b>	Cis-rétinol/androgène déshydrogénase
<b>CRBP (I et II idem 1 et 2)</b>	Protéine cellulaire liant le rétinol
<b>P450RAI/CYP26</b>	Enzyme de la famille du cytochrome P450
<b>DBD</b>	Domaine de liaison à l'ADN
<b>DR</b>	Répétition directe
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>ER</b>	Ester de ROL
<b>hALDH1</b>	ALDH de l'humain
<b>HEPES</b>	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
<b>holo-CRABP</b>	CRABP liée avec l'AR
<b>holo-CRBP</b>	CRBP liée aux rétinoïdes (principalement avec ROL)

<b>HPLC</b>	Chromatographie liquide á haute pression
<b>iLBP</b>	Protéine de liaison intracellulaire
<b>IPTG</b>	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalacto-pyranoside
<b>K<sub>M</sub></b>	Constante cinétique d'affinité de Michaelis-Menten
<b>LBD</b>	Domaine de liaison au ligand
<b>LPT</b>	Lipase pancréatique
<b>LRAT</b>	Lécithine : rétinol acide transférase
<b>LRP</b>	Récepteur relatif au LDL
<b>MDR</b>	Déshydrogénase/réductase á moyenne chaîne
<b>MES</b>	2-[N-Morpholino] ethanesulfonic acide
<b>mRALDH</b>	Rétinal déshydrogénase de souris
<b>MTP</b>	Microsomal triglycéride transfert protein
<b>NAD</b>	Nicotinamide adénine dinucléotide oxydé
<b>NADH</b>	Nicotinamide adénine dinucléotide réduit
<b>p-HMB</b>	Para-hydroxymercuribenzoic
<b>PL</b>	Phospholipide
<b>PLB</b>	Lipoprotéine lipase B
<b>PLZF</b>	Facteur de transcription
<b>PML</b>	Protéine nucléaire
<b>PPAR</b>	Récepteur de prolifération de peroxysomes
<b>PTL</b>	Triacylglycerol lipase pancréatique
<b>RAL</b>	Rétinal
<b>ROL</b>	Rétinol
<b>RALDH</b>	Rétinaldéhyde déshydrogénase
<b>rRALDH</b>	Rétinaldéhyde déshydrogénase du rat
<b>RAR</b>	Récepteur á acide rétinoïque
<b>RARE</b>	Élément de réponse á l'acide rétinoïque
<b>RBP</b>	Protéine plasmatique liant le ROL (Retinol binding protein)
<b>REH</b>	Rétinol ester hydrolase
<b>RODH</b>	Rétinol déshydrogénase/réductase
<b>RLDL</b>	Récepteur aux lipoprotéines de faible densité
<b>RPE</b>	Rétinal pigment épithélium

<b>RXR</b>	Récepteur nucléaire X rétinoïque
<b>SDR</b>	Déshydrogénase/réductase à courte chaîne
<b>SDS-Page</b>	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
<b>SNP</b>	Single nucléotide polymorphismes
<b>STRA6</b>	Récepteur membranaire du complexe ROL- RBP-TTR
<b>TG</b>	Triglycéride
<b>TR</b>	Récepteur nucléaire à l'hormone thyroïdienne
<b>TRIS</b>	Trishydroxyméthylaminométhane
<b>TTR</b>	Transthyrétine
<b>TZD</b>	Thiazolidine
<b>T2DM</b>	Diabète de type 2
<b>VDR</b>	Récepteur nucléaire de la vitamine D
<b>V<sub>max</sub></b>	Vitesse maximale de saturation de substrat

## REMERCIEMENTS

À mon directeur de recherche Dr. Pangala V. Bhat pour sa direction éclairée.

À mes professeurs de Département de Nutrition, Faculté de Médecine, U de Montréal,  
À Dr. Olivier Receveur et Dr. Irène Strychar pour leurs conseils et soutien aux étudiants.

À ceux qui m'ont aidé durant la réalisation de ces recherches et  
d'une manière générale à tous ceux et celles qui, comme mes parents, mon épouse, ma fille  
mes amis(es), mes professeurs et mes collègues, ont toujours cru en moi au fil-des-temps.

*Daniel Constantin Manolescu*

*Montréal, Québec, Canada*

*31. VIII. 2009 (A.D.MMIX)*

**NON MULTA SED MULTUM**

## Avant-propos

L'**objectif général** de cette étude est d'apporter des éléments pour une meilleure compréhension du rôle de la Vitamine A (rétinol et acide rétinoïque) dans l'organogenèse et le développement rénal humain. Nous travaillons avec du sang de cordon ombilical provenant des nouveau-nés d'une population Nord-Américaine ayant un apport alimentaire suffisant de rétinoïdes. Autant pour contribuer à notre objectif général que pour bien organiser le travail sur nos objectifs spécifiques (autre la revue de littérature générale sur les Rétinoïdes de ce Mémoire de Maîtrise, qui est elle aussi orientée vers le rôle de la Vitamine A dans le développement embryonnaire et l'organogénèse), nous avons synthétisé et publié un article type revue de littérature, d'avantage axé sur le rôle de la Vitamine A dans le néphrogenèse et le développement rénal. Pour les objectifs spécifiques et collatéraux, nous avons utilisé des méthodes d'investigation courantes dans le laboratoire de biologie moléculaire ( dont une large part fut donnée aux analyses par HPLC-chromatographie liquide á haute pression pour les rétinoïdes), physiologie et nutrition ainsi que les analyses statistiques appropriées des variables.

S'agissant d'un Mémoire de Maîtrise par articles, nous avons publié, dans des journaux scientifiques reconnus, la revue de littérature orientée sur les spécificités des rétinoïdes dans le développement rénal. Les résultats d'investigations ultérieures sont en cours de publication, ensemble avec leur présentation dans ce Mémoire de Maîtrise.

Dans le contexte de la rédaction, des informations développées dans un chapitre préalable sont parfois reprises, mais brièvement cette fois, au début d'un chapitre ultérieur, dans le but d'assurer une cohérence globale de l'œuvre par liaisons et références *in-situ* de l'information (et pas uniquement par des renvois à répétition).

La même logique d'articulation harmonieuse des informations d'un chapitre à l'autre s'applique aussi aux choix des Tableaux et Figures, dont l'usage généreux fut inspiré par l'adage académique voulant que souvent...*une image vaut milles mots*.

Nous avons voulu rendre hommage a nos professeurs et aux chercheurs (euses) pionniers dans les domaines évoquées dans notre présent travail et nous les avons cités en texte et dans notre bibliographie, indifféremment de l'année de leurs découvertes, à côté des études plus récentes sur les sujets scientifiques respectifs.

## **CHAPITRE 1 : REVUE DE LITTÉRATURE**

## 1.) INTRODUCTION DE LA VITAMINE A

### 1.1 Généralités

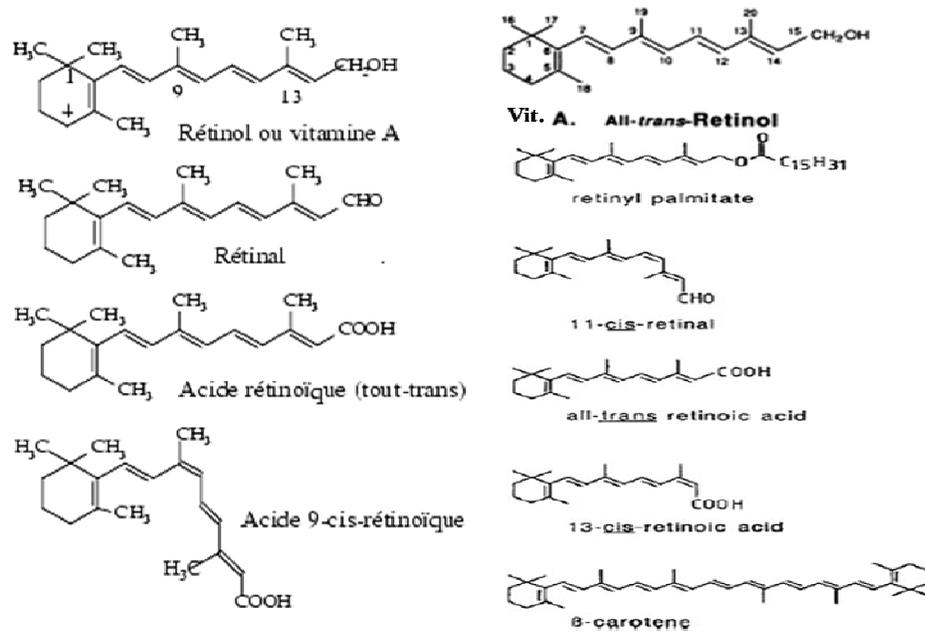
Depuis l'antiquité jusqu'à l'époque moderne, plusieurs remèdes naturels contenant de la Vitamine A ont été utilisés efficacement (d'abord de façon empirique) pour traiter différents problèmes de santé, sans toujours connaître leurs principes actifs. Dans l'Empire Romain on utilisait des pommades à base de foie d'ours et du miel pour accélérer la cicatrisation des blessures dans l'Armée et des cataplasmes de *garum* (une pâte de poissons gras, pour la plupart des Clupéidés de la Méditerranée) pour soigner les maladies de la peau. Dans la Grèce et l'Égypte anciennes, la perte de vision nocturne était traitée par la consommation d'huile de foie de poisson, accompagnée parfois d'applications de foies crus de bœufs ou foies d'hippopotames sur les yeux. Et même assez récemment, dans les 18-ème et 19-ème siècles, on recommandait l'huile de foie de morue, comme traitement et/ou prophylaxie, pour les enfants et adolescents en prise avec des problèmes de croissance ou maladies infectieuses récurrentes. Maintenant, il est connu que l'efficacité de ces remèdes provenait de leur contenu en vitamine A.

La vitamine A (C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>O), appelée aussi rétinol, appartient au groupe des vitamines liposolubles, est une substance d'apparence solide et a une masse moléculaire de 286,456 u. Le rétinol est une molécule hydrophobe synthétisée à partir de l'isoprène. La Vitamine A est la première des vitamines liposolubles avoir été découverte et extraite du jaune d'œuf et du beurre. Elle fut d'abord remarquée pour son rôle important dans la croissance des rats (McCollum E, Davis, Osborne et Mendel 1913). La structure chimique du ROL a été déterminée par Karrer et al., 1931, (*tout-trans-3,7-Dimethyl-9-(2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)-2,4,6,8-nonatetraen-1-ol*). A part sa structure, plusieurs autres aspects de la vitamine A comme ses propriétés physico-chimiques, le métabolisme, ses effets physiologiques, ainsi que sa synthèse ont été étudiés depuis. Dans l'organisme, elle existe sous forme de rétinol, de rétinol, d'acide rétinoïque et de rétinyl phosphate ou esters de rétinol (ER). Les termes vitamine A et rétinoïdes comprennent le rétinol ainsi que tous les dérivés, naturels ou synthétiques. Donc le terme vitamine A comprend toutes les molécules qui possèdent une activité biologique similaire à celle du ROL, alors que le terme rétinoïde comprend aussi les dérivés, naturels ou synthétiques du ROL ayant ou non une activité biologique (Sporn et Roberts 1994, (Blomhoff and Blomhoff 2006).

Les esters de ROL (vitamine A préformée) se trouvent dans la nourriture d'origine animale. Les  $\beta$ -carotènes (provitamine A) se trouvent dans les végétaux. Les mammifères se nourrissant avec de la nourriture végétale, peuvent produire 2/3 de leur vitamine A à partir des  $\beta$ -carotènes. Nombreux autres caroténoïdes, se trouvant dans le monde végétal, peuvent provenir ou non du  $\beta$ -carotène, contiennent des doubles liaisons conjuguées multiples dans leur chaîne de carbone latérale et existent sous forme alcoolique libre ou sous forme estérifiée (fatty acyl-ester forme). Les formes métaboliquement actives de la vitamine A sont le rétinol (ROL), le rétinal (RAL) et surtout l'acide rétinoïque (AR). La vitamine A et les rétinoïdes (**Fig.1,p.4**) sont impliqués dans l'embryogénèse, le développement de l'organisme, la croissance des os, la différenciation cellulaire, le système immunitaire, la régénération des tissus épithéliaux de divers organes, la vision et dans plusieurs voies métaboliques dans l'organisme ( ex. lipides, glucides, etc.). Elle est aussi active dans le traitement contre certains cancers (leucémie) et dans le traitement des acnés sévères. Tous les rétinoïdes ont une structure chimique moléculaire possédant un cycle  $\beta$ -ionone, une queue isoprénoïde (chaîne de carbone latérale) et un groupe polaire terminal. Selon l'état d'oxydation de la molécule, ce groupe polaire est de type hydroxyle (HC-OH) pour le ROL, aldéhyde (HC=O) pour le RAL et carboxyle (HO-C=O) pour l'AR. L'orientation *cis* ou *trans* de la chaîne de carbone latérale des différents isomères des rétinoïdes, influence leurs propriétés spécifiques. Plusieurs isoformes de ces molécules se retrouvent dans l'organisme (**Fig.1, p.4**). Les rétinoïdes sont très sensibles à l'oxydation atmosphérique, processus accéléré par la lumière et la chaleur.

L'organisme animal ne peut pas synthétiser la vitamine A et il doit se la procurer dans son alimentation. Le ROL est généralement associé aux lipides, comme toutes les vitamines liposolubles. Les facteurs qui favorisent (sels biliaires) ou entravent l'absorption intestinale des lipides influenceront aussi l'efficacité d'absorption du ROL (Houde-Nadeau, NUT 5050 UdeM 2005). Les aliments d'origine végétale contiennent des précurseurs du rétinol comme les caroténoïdes (avec leur composant le plus actif :  $\beta$ -carotène), alors que les aliments d'origine animale (viandes, produits laitiers et surtout foie), contiennent les esters de rétinol (ER), un peu de rétinol et très peu d'acide rétinoïque (AR) (Harrison 2005) , Houde-Nadeau, NUT 5050 UdeM 2005, (Wongsiriroj et al. 2008).

La forme active principale de la vitamine A est l'acide rétinoïque (AR). Sa fonction de ligand pour les récepteurs nucléaires de l'AR : RAR et RXR, lui permet de moduler l'expression génique par l'activation ou la répression de la transcription de gènes (Labrecque, Bhat et Lacroix 1997, (Blomhoff and Blomhoff 2006), (Davidovici et al. 2007). Il peut s'agir des gènes impliqués dans sa propre autorégulation par rétroaction (feed-back) dans la chaîne métabolique, mais aussi des gènes impliqués dans la morphogénèse des reins, le développement embryonnaire et l'organogénèse en général (Clagett-Dame et DeLuca 2002, (Makrakis et al. 2007), (Bhat and Manolescu 2008) ou encore différentes familles des gènes comme PPAR (Ziouzenkova and Plutzky 2008, Ziouzenkova et al. 2007) et *Hox* (Niederreither et al. 1999a) et plusieurs autres. Le déficit ou l'excès en vitamine A sont également néfastes et plusieurs désordres pathologiques sont associés à la quantité d'AR dans l'organisme. Une fine régulation de la quantité d'AR produite est donc nécessaire, sur tout l'axe métabolique de la vitamine A, de l'ingestion des rétinoïdes jusqu'à la dégradation de l'AR. Depuis les années 1960, on observe une intensification des études sur plusieurs propriétés biologiques des rétinoïdes dans l'ophtalmologie, la dermatologie, l'immunologie, l'oncologie, la biologie moléculaire et cellulaire, la gynécologie et dernièrement l'endocrinologie, le syndrome métabolique, la résistance à l'insuline et le diabète de type 2.



**Figure 1.** Structures des principaux Rétinoïdes et  $\beta$ -carotène  
(Adapté d'après Olson J.A. /Livrea 2000 et Blomhoff 2006)

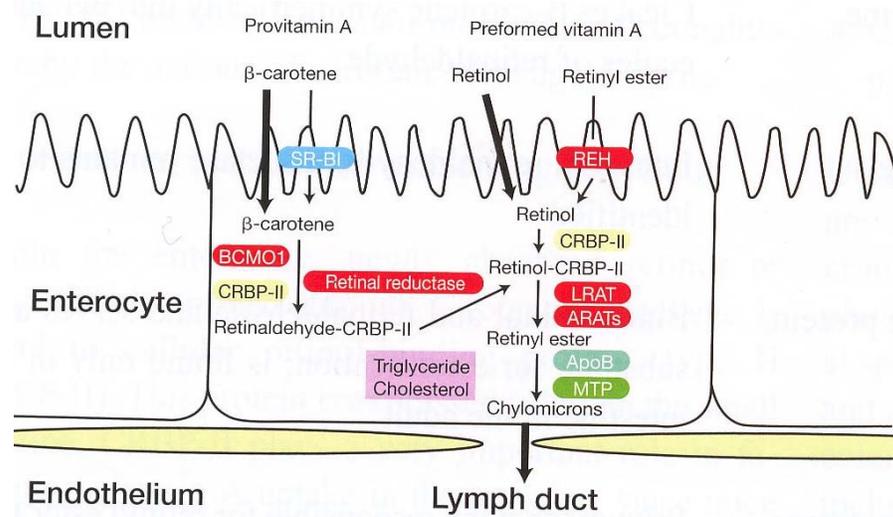
## 1.2 Survol général du métabolisme de la Vitamine A

La nourriture des organismes animales contient de la provitamine A (comme les caroténoïdes), de la vitamine A préformée (comme les esters de rétinol, ER), un peu de ROL et des traces d'AR. Dans l'intestin, les ER solubilisés préalablement dans les micelles sont hydrolysés d'abord dans le lumen intestinal par une triacylglycerol lipase pancréatique (PTL), ensuite sur la surface des entérocytes par la rétinyl-ester hydrolase (REH) de la bordure en brosse (Labrecque, Bhat et Lacroix 1997 ; Harrison 2005 ; Wongsiriroj and Blaner 2007, 2008) pour former du ROL qui va pénétrer ensuite dans les entérocytes. A doses physiologiques ce transport est fait par transporteur saturable, mais à doses plus grandes ce transport se fait passivement. L'importance des matières grasses pour l'absorption de la vitamine A est variable. Un apport alimentaire de 5 à 10 g de graisse ou d'huile par jour, améliorerait grandement l'absorption intestinale de la Vitamine A. Les sels biliaires sont indispensables à l'absorption de la vitamine A et du carotène. Une obstruction des voies biliaires risque donc de provoquer une avitaminose A. Les huiles hydrocarbonées, l'huile de paraffine, par exemple, diminuent de façon très nette l'absorption du carotène.

L'efficacité d'absorption de la vitamine A-préformée des aliments est de 70 à 90%. Pour les caroténoïdes (provitamine A) l'efficacité de l'absorption est variable (5% pour feuillus vertes (épinards, laitue romaine, chou vert frisé, feuilles de moutarde et pissenlit), 20% pour carottes et citrouilles et 30% pour la patate douce). Au début proportionnel avec l'apport, le taux d'absorption des caroténoïdes diminue lorsque la dose ingérée augmente trop (Houde-Nadeau, NUT 5050 UdeM 2005) ce qui évoque un mécanisme de saturation (Li and Tso 2003). Préalablement solubilisés dans les micelles, les caroténoïdes passent à travers la bordure en brosse intestinale par voie passive (plus efficacement s'il y a eu cuisson des aliments). Ce passage est facilité par un récepteur membranaire de classe B et type I (SR-BI) et les caroténoïdes sont absorbés dans les entérocytes où ils sont d'abord oxydés par l'enzyme carotène-15,15'-dioxygénase pour donner deux molécules de rétinol, réduites à leur tour par une rétinaldéhyde-réductase pour former le rétinol (During et al. 1998), Krynsky et Mayne/Livrea 2000, Harrison 2005). Ce ROL ainsi que le ROL directement ingéré ou nouvellement produit et absorbé dans l'entérocytes, sont liés à des protéines cytoplasmiques de type CRBP-II et ensuite sont estérifiés (ou ré-estérifiés) dans les entérocytes par l'enzyme lécithine-rétinol acyltransférase (LRAT) (Collins and Mao

1999), Harrison 2005, Wongsiriroj and Blaner 2007) de préférence avec l'acide palmitique.

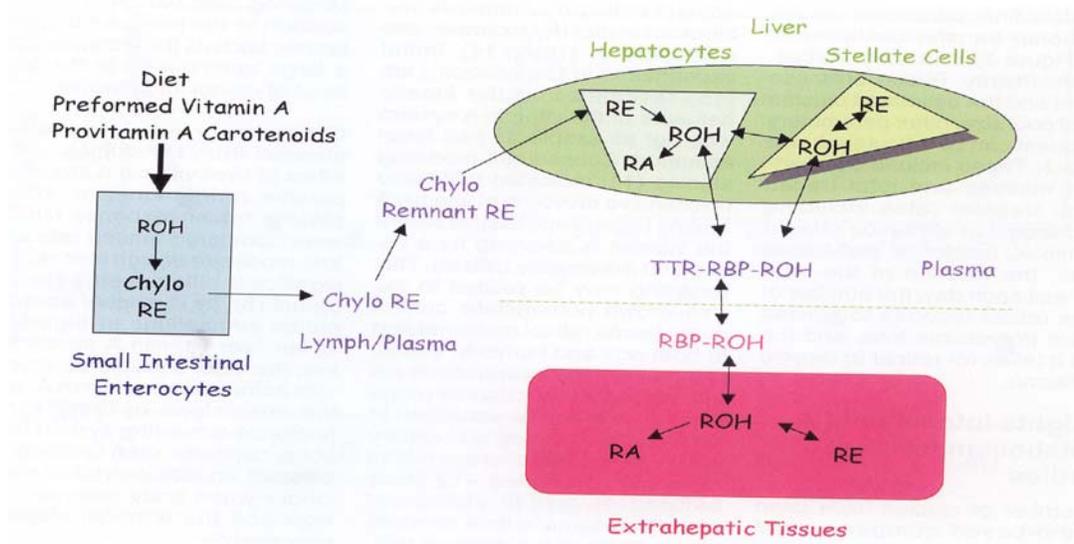
La littérature suggère aussi qu'autre par les LRAT, l'estérification (réestérification) du ROL dans les entérocytes de l'intestin grêle peut aussi être catalysée par des enzymes de type acyl-CoA : rétinol acyltransphérase (ARAT), particulièrement quand de très-grandes doses de vitamine A sont ingérées (Ong and Newcomer, 1994 ; Wongsiriroj and Blaner 2007). Ensuite les esters de rétinol (ER) sont inclus dans des Chylomicron et sortent des entérocytes dans la lymphe qui va les transporter au foie. **(Fig.2,p.6)**



**Figure 2 :** Absorption et digestion intestinale des diverses formes de Vitamine A alimentaire (Wongsiriroj and Blanner 2007/Sight and Life)

La mise en réserve est faite dans le foie (le principal organe de stockage de la vitamine A) sous forme des esters (palmitate) de rétinol (ER) majoritairement dans les cellules hépatiques étoilées (cellules Ito) sous forme des gouttelettes lipidiques (Ross AC and Zolfaghari 2004) (Blaner et al. 2009) et un peu dans les hépatocytes typiques (Green et Balmer 2005). Dans le foie, au besoin, des enzymes REH peuvent hydrolyser de nouveau les ER en ROL autant dans les cellules étoilées (cellules Ito) que dans les hépatocytes. Dans les hépatocytes typiques ce ROL est (selon besoins) soit oxydé vers l'AR sur la voie métabolique régulière pour usage interne de l'hépatocyte, soit lié au « rétinol-binding protein » (RBP) - associé à la protéine transthyréline (TTR) et sécrété dans la circulation, soit transféré (en tant que réserve intermédiaire de ROL rapidement disponible), vers les cellules hépatiques étoilées (cellules Ito) (Blanner 2009).

Ici il complétera la réserve de ROL obtenue directement dans ces cellules étoilées Ito par hydrolyse de-novo de leur propre réserve d'esters (ER) (palmitate de rétinol). Cette réserve intermédiaire de ROL des cellules étoilées, peut être ensuite (toujours selon les besoins) utilisée dans le foie en rétroaction vers les hépatocytes typiques, soit rétro-estérifié vers la réserve principale de ER, soit lié au « rétinol-binding protein » (RBP) - associé à la protéine transthyréline (TTR) et sécrété dans la circulation à destination des tissus extra-hépatiques cibles. (Ross AC and Zolfaghari 2004); Labrecque, Bhat et Lacroix 1997; Green et Balmer 2005; Blomhoff and Blomhoff 2006). (Fig.3,p.7)

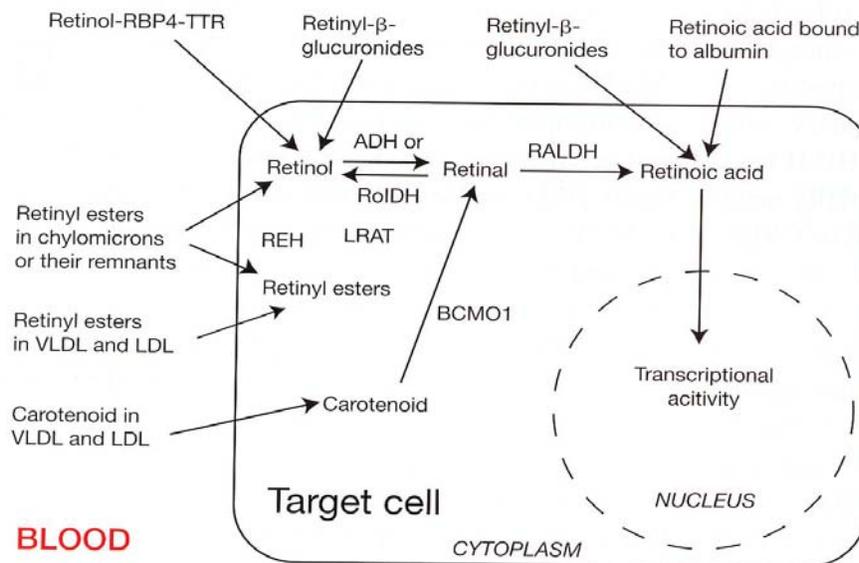


**Figure 3 :** Métabolisme général de la Vitamine A. Modélisation mathématique simplifiée (Green et Balmer 2005/Sight and Life)

La « retinol-binding protein » (RBP), est une protéine avec un poids moléculaire de 21 kDa synthétisée dans le foie. Dans sa structure se trouve une longue chaîne polypeptidique avec un site de liaison pour le ROL (Collins et Mao, 1999, Gamble et Blaner/Livrea, 2000) et c'est le seul transporteur extracellulaire spécifique du ROL dans la circulation (Gottesman, 2001; Blomhoff 2006). La RBP est capable de solubiliser le ROL grâce à sa poche hydrophobe et de le transporter aux tissus cibles. Portant le ROL on parle de holo-RBP alors que sans le ROL on parle d'apo-RBP. Le ROL est internalisé dans les cellules cibles alors que l'apo-RBP est éliminé par le rein. Le TTR est dégradée et/ou partiellement recyclée. Dans l'urine on trouve la RBP sous forme décarboxylée (manque le groupe carboxyle final) après sa filtration rénale.

Il existe toutefois des souris transgéniques déficientes en RBP qui sont néanmoins viables et fertiles (Quadro, 1999). Ceci est probablement dû à des mécanismes complémentaires, qui peuvent approvisionner de différentes façons en rétinoïdes, des tissus possédant les enzymes nécessaires pour les convertir en rétinol ou en acide rétinoïque directement dans leurs cellules (tissu adipeux, poumon, etc.) (Gottesman, 2001), (Moise et al. 2007) Voici quelques voies complémentaires (**Fig.4,p.8**) d'approvisionnement en rétinoïdes des tissus cible :

1) l'AR circulant lié à de l'albumine, 2) les ER circulants dans les chylomicrons et leurs résidus (fantômes) ou dans des lipoprotéines VLDL et LDL. 3) les métabolites glucuroniques polaires (hydrosolubles) du rétinol (retinyl- $\beta$ -glucuronides) et de l'AR qui peuvent facilement être hydrolysés vers ROL et AR (Blaner et al. 1994), (Wongsiriroy and Blaner 2007), 4) des caroténoïdes, dérivés ou non de  $\beta$ -carotène (provitamine A) (Krinsky et Mayne/Livrea 2000) et qui circulent dans le sérum (exportés du foie) dans des lipoprotéines VLDL et LDL ( Houde-Nadeau, NUT 5050 UdeM 2005; Wongsiriroy and Blaner 2007 ). Mais le ROL reste la principale forme de transport de la vitamine A avec un transporteur spécifique (RBP) dans l'organisme vers les tissus cibles. La TTR prévient la filtration glomérulaire dans le rein du complexe ROL-RBP (Blaner et al. 1991); (Wongsiriroy and Blaner 2007).



**Figure 4 :** Différentes formes de Vitamine A présentes dans la circulation sanguine (Wongsiriroy and Blaner 2007/Sight and Life)

Deux mécanismes expliquent le passage du ROL à travers les membranes cellulaires des tissus cibles : un récepteur membranaire STRA6 (Blaner 2007), (Duester 2008) reconnaissant le complexe ROL-RBP-TTR pour intervenir dans l'intégration du ROL et/ou la diffusion passive ou facilitée du ROL à travers la membrane cellulaire (Gottesman et al. 2001). Une fois liés à des protéines cellulaires, le rétinol et ses dérivés, le rétinol et l'AR, deviennent solubles (Gottesman et al. 2001). Ces protéines cytoplasmiques (nommées aussi récepteurs cytosoliques) sont le « cellular rétinol- ou rétinoides- binding protein » (CRBP), type 1 et 2, et le « cellular retinoic acid-binding protein » (CRABP), type 1 et 2. Cette association avec une protéine permet également aux rétinoides concernés d'être un substrat de plus haute affinité pour les enzymes impliquées dans la production d'AR (Collins and Mao 1999) dans les tissus cibles. Dans ces cellules, deux étapes d'oxydation sont nécessaires pour obtenir de l'AR à partir de ROL. Dans la première étape (réversible) et catalysée par des enzymes (ADH-recto et SDR-verso) le ROL est d'abord oxydé en RAL qui est oxydé à son tour (étape II oxydative irréversible catalysée par les RAL-aldéhydes déshydrogénases RALDHs -1,2,3,4 ) vers AR, le métabolite actif de la vitamine A (Duester 2000), Blomhoff 2006 ).

Plusieurs pathologies sont associées avec une trop grande ou trop faible quantité d'AR (calcification des tissus mous, toxicité et xérophtalmie, immunodéficience, etc.) d'où l'importance d'un bon équilibre d'AR, selon les besoins de l'organisme (Collins and Mao 1999). Des recherches sur des souris transgéniques ont montré une fine régulation *in vivo* de la quantité physiologiquement nécessaire d'AR, maintenue par l'optimisation de la production et de la dégradation d'AR. Une hydrolase CYP 26A1, de la famille cytochrome P450, catalyse l'oxydation de l'AR en métabolites hydrosolubles polaires, les 4-hydroxy AR, 4-oxo AR et 18-hydroxy AR (White et al. 1996),(Loudig et al. 2000). Une autre hydrolase clonée plus récemment est le cytochrome CYB26B1 (White et al. 2000) qui bien qu'ayant une spécificité tissulaire différente de celle du CYP26A1, possède une activité catalytique similaire pour l'oxydation de l'AR en composés hydrosolubles polaires. À l'aide de l'enzyme UDP-glucuronosyl-transférase (UGT), l'AR est conjugué à un acide glucuronique hydrophilique permettant ainsi la détoxification de l'AR et son élimination (Gestl et al. 2002). Il est intéressant de mentionner que les dérivés glucuroniques de l'AR sont aussi des métabolites actifs de la vitamine A, qu'ils ne sont pas toxiques et n'ont pas d'effet tératogène sur l'organisme (Barua, 1997,(Barua and Sidell 2004).

Plusieurs isoformes des rétinoïdes se retrouvent *in-vivo* (**Fig.1,p.4**) et ont différentes fonctions dans l'organisme. Par exemple l'isomère 11-*cis* RAL est très important dans la fonction visuelle (Saari et al. 2009) mais les isomères d'AR n'ont aucun rôle dans la vision (Mangelsdorf 1994). L'isomère tout-*trans* de l'AR est un des ligands pour les récepteurs nucléaires RARs et le 9-*cis* AR étant un ligand pour les RARs et aussi pour les RXRs. L'action biologique de ces isomères d'AR se manifeste par leur liaison-activation des récepteurs nucléaires RAR/RXR, qui stimulent ensuite les éléments de réponse à l'AR (RARE) se trouvant sur les promoteurs des gènes et contrôlent ainsi la régulation de l'activité transcriptionnelle par la répression ou par l'expression protéique des gènes cible. De cette façon les rétinoïdes contrôlent d'abord l'embryogenèse et ensuite les processus de prolifération, différenciation cellulaire et de l'apoptose par la régulation des gènes chez les vertébrés depuis l'embryogenèse jusqu'à la mort (Napoli 1996). Un autre isomère de l'AR, le 13-*cis* (isotrétionine) naturellement retrouvé chez les Eucaryotes, dans le sang et les tissus humains (Blaner 2001), n'ayant pas la capacité d'influencer directement l'activité des gènes, est utilisé comme agent dermatologique pour soigner le psoriasis et l'acné sévère (Thielitz et al. 2008). Il n'est pas recommandé aux femmes enceintes, vu qu'il est capable d'isomériser en at-RA lequel est tératogène. Étant donné que l'AR est nécessaire à la différenciation lymphocytaire (ex. lymphocytes T et B) (Kim 2008), la vitamine A est très importante pour le système immunitaire. Directement ou indirectement (par son rôle sur la synthèse protéique) la vitamine A est nécessaire à la régénération des tissus épithéliaux et au fonctionnement normal de la plupart des organes (Maden 2004, Niles 2003, Spinella et al. 2003) dont le fonctionnement du cerveau (Luo et al. 2009). L'AR est aussi utile dans le traitement des cancers (Moise et al. 2007). (Ex., cancers de la prostate, du sein, de la peau, du poumon, leucémie pro-myélocytaire etc.)

Une carence ou un excès, importantes, en vitamine A dans l'alimentation peut avoir des conséquences néfastes sur l'organisme. Les besoins en vitamine A sont estimés à environ 5 000 UI/jour (1U.I.=0,3µg ROL) avec un Apport Nutritionnel de Référence de 900 µg/jour et un Apport Maximum Tolérable pour la vitamine A préformée est de 3000 µg/jour (1U.I.=0,3µg ROL). On a vu aussi qu'une régulation de l'homéostasie des rétinoïdes est essentielle. Une hypovitaminose A entraîne chez le fœtus des malformations au niveau des systèmes cardiovasculaire, respiratoire, uro-génital, des membres et du cerveau allant jusqu'à la mort de l'embryon si la déficience est extrême.

Quand les besoins nutritionnelles ne sont pas comblées, la déficience en vitamine A peut devenir clinique et se caractérise par de graves problèmes oculaires comme l'hyperkératinisation du tissu conjonctif de l'œil (tache Bitot) ou de la cornée (xérophtalmie), cécité nocturne, etc. Le déficit en vitamine A (hypovitaminose) constitue un problème majeur de santé mondiale (plus de 120 pays), notamment chez les enfants de l'Asie, l'Amérique du sud et l'Afrique sub-saharienne où l'alimentation est pauvre en caroténoïdes (Custodio et al. 2009, Dole et al., Jiang et al. 2008, Kalua et al. 2008, Pal and Sagar 2008, Vieira et al. 2008). On estime qu'entre 140 et 250 millions d'enfants d'âge préscolaire ont une déficience subclinique en vitamine A et 3 millions sont cliniquement déficients. Chaque année, plus d'un million de décès pendant l'enfance sont associés à la déficience en vitamine A (World Health Organisation, 2003). Chez l'adulte une hypovitaminose A chronique affecte plutôt le fonctionnement de la vue et la biologie de la reproduction. L'hypervitaminose A chez l'embryon a des effets tératogènes comme des malformations affectant les membres, les structures crânio-faciales, la peau, les organes et des troubles de fonctionnement sur les systèmes nerveux, cardio-vasculaire, etc. (Hathcock et al. 1990), Olson/Livrea 2000 ). Chez l'enfant et l'adulte, son excès augmente la pression du liquide céphalo-rachidien entraînant de la fatigue, des migraines, de la fièvre et des vertiges.

En conclusion la vitamine A est essentielle dans plusieurs processus biologiques et son implication est critique à plusieurs étapes. Elle a un rôle déterminant dans la prolifération cellulaire et la différenciation des tissus fœtaux. Elle est impliquée dans le maintien de l'intégrité des tissus épithéliaux de plusieurs organes (Sporn and Roberts 1984), Kang and Fisher/Livrea 2000), dans la vision et la synthèse de pigments dans l'œil (Palczewski and Saari 1997); Crouch and Ma/Livrea 2000), dans la modulation de la réponse immunitaire, la reproduction, l'hématopoïèse et le développement des os et de la moelle osseuse (Sporn and Roberts 1994). Depuis le milieu des années 80, plusieurs recherches indiquent que les effets biologiques observés pour la vitamine A, sont dus à l'AR, notamment à cause de son rôle de ligand nucléaire lui donnant sa capacité de régulation de l'expression de nombreux gènes dans l'organisme. En effet, l'acide rétinoïque (AR), comme élément actif de la vitamine A, peut lier les récepteurs nucléaires RAR et RXR afin d'activer la transcription de plusieurs gènes impliqués dans la prolifération et la différenciation cellulaire, divers axes métaboliques (autorégulation, lipides).(Guidez/Livrea 2000, Blomhoff 2006, (Davidovici et al. 2007).

Plusieurs pathologies sont reliées à la quantité d'AR dans les cellules durant le développement embryonnaire ou après la naissance. Le métabolisme de la vitamine A est complexe et implique la concertation de plusieurs protéines (enzymes, transporteurs, etc.) Des études, à l'aide de souris « knock out », ont permis de comprendre le rôle physiologique de certaines de ces protéines. Les souris transgéniques sont des bonnes modèles pour les études *in vivo* des mécanismes enzymatiques impliqués dans le métabolisme de l'AR. La vitamine A et ses métabolites sont utilisés dans la prévention et le traitement de certaines maladies humaines et dans certains cancers (Sporn and Suh 2000) incluant les leucémies (Warrell 1996), (de Botton et al. 2005); (Sanz 2006) les tumeurs secondaire du cou et de la tête (Lee et al. 1993) et les cancers cervicaux (Abu et al. 2005) Les recherches se poursuivent pour mieux comprendre les effets des rétinoïdes sur l'organisme et leurs mécanismes biomoléculaires.

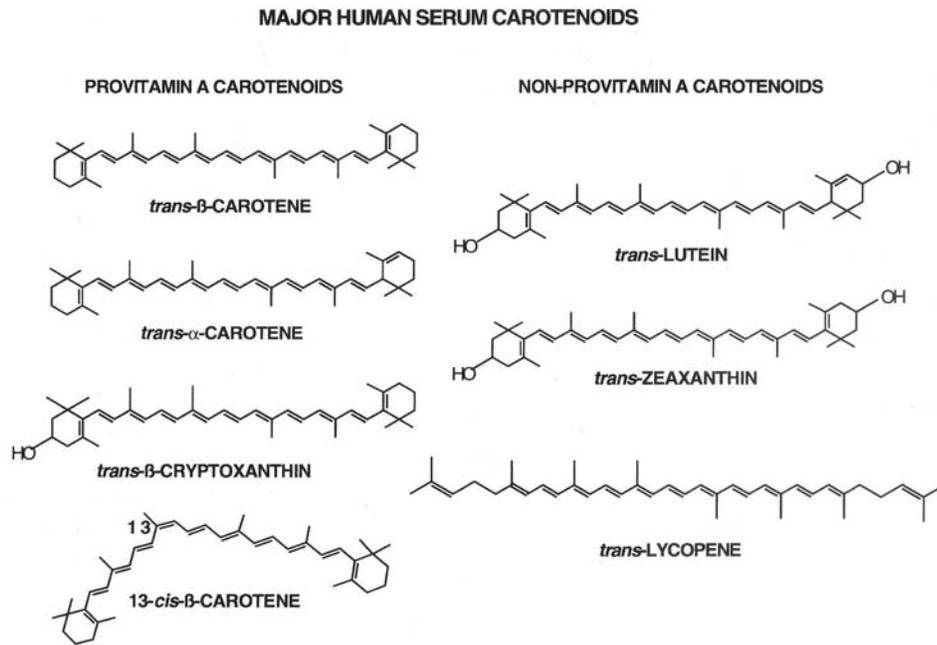
## **2.) METABOLISME EXTRA-CELLULES CIBLES DE LA VITAMINE A**

### **2.1. Principaux sources de la Vitamine A :**

Les animaux ou les humains n'ont pas la capacité de synthétiser la vitamine A *de novo*. Les besoins en vitamine A sont pourvus par l'alimentation à partir des sources végétales contenant la provitamine A ( $\beta$ -carotène) et autres caroténoïdes ou des sources animales (vitamine A préformée : esters de rétinol, moindre mesure Rétinol) (Olson J.A. /Livrea 2000; (Fraser and Bramley 2004); Harisson 2005). Les besoins en vitamine A sont estimés à environ 5 000 UI par jour avec un Apport Nutritionnel de Référence de 900  $\mu\text{g}/\text{jour}$  et un Apport Maximum Tolérable pour la vitamine A préformée de 3000  $\mu\text{g}/\text{jour}$ . Une unité internationale (UI) de vitamine A correspond à 0,3 $\mu\text{g}$  rétinol et est considéré comme l'unité de base, le rétinol-équivalent, ce qui permet de comparer l'activité vitaminique des différents dérivés de la vitamine A (M.H.Nadeau, NUT 5050, UdeM, 2005). Mieux encore pour comparer l'activité vitaminique des différents dérivés de la vitamine A, on parle maintenant d'un (1 Équivalent) d'Activité de Rétinol (RAE) qui vaut soit : 1 $\mu\text{g}$  de Vitamine A préformée provenant de la diète ou de suppléments alimentaires (ex.ROL, ER) ou 2 $\mu\text{g}$  de  $\beta$ -carotène en suppléments alimentaires ou 12 $\mu\text{g}$  de  $\beta$ -carotène provenant de la diète ou 24 $\mu\text{g}$  d'autres caroténoïdes pro-vitaminiques A provenant de la diète ( ex  $\alpha$ -carotène,  $\beta$ -cryptoxanthin, etc.).(Trumbo et al. 2001).

Les caroténoïdes provenant de fruits et légumes verts et surtout colorés ( les caroténoïdes sont des pigments végétaux largement présents dans la nature ), ainsi que les esters de rétinol (ER) d'origine animale ou de caroténoïdes de dépôt des tissus animaux ( ex. foie, abats, beurre, œufs) sont des précurseurs de ROL (Gottesman et al. 2001) Les produits enrichis industriellement en vitamine A : lait, produits laitiers, margarines, céréales préparées, etc. sont également des bonnes sources et précurseurs de ROL. Les animaux et les plantes peuvent cliver les caroténoïdes et obtenir des molécules biologiquement actives ( ex. des rétinoïdes de stockage ou actifs dans le cas des animaux) (Nagao 2004). Les animaux (ex. Drosophiles, poissons, oiseaux, souris, humains) peuvent convertir les caroténoïdes (comme  $\alpha$  et  $\beta$ -carotène,  $\beta$ -cryptoxanthine, venant de leur diète végétale) d'abord en rétinol et en apocaroténoïdes et ensuite en rétinoïdes - formes actives de la vitamine A (Krinsky and Mayne/Livrea 2000; Wongsiriroj and Blanner 2007).

L'humain et les carnivores peuvent se procurer aussi des RE d'origine animale ou de caroténoïdes de stockage tissulaire (lutéine et zéaxanthine/macula, lycopène/prostate,  $\beta$ -carotène/corpus-lutéum et jaune-d'œuf, astaxanthin et canthaxanthin/saumon et flamingos, etc.) en mangeant des tissus animaux où il y a stockage de caroténoïdes venant de la diète végétale de ces animaux ou RE après conversion des caroténoïdes (**Fig.5, p.14**). En fait dans les pays industrialisés 30-70% de l'apport en vitamine A provient des REs et du ROL et le reste est assuré par les caroténoïdes de la diète (Harrison 2005). L'acide rétinoïque (AR) de sources alimentaire animale (tissus) contribue très peu dans la diète à l'apport journalier en vitamine A (3-15  $\mu\text{g}$  AR / kg tissu) alors que l'apport courant total du ROL de la diète est de 1mg/jour pour les adultes (Gundersen and Blomhoff 2001); Blomhoff 2006). D'autres recommandations d'apport journalier en vit. A, varient avec l'âge. Enfants :  $\leq 1\text{an}/375\mu\text{g}$ , 1-3 ans/400 $\mu\text{g}$ , 4-6ans/500 $\mu\text{g}$ , 7-10ans/ 700 $\mu\text{g}$ . Adultes et adolescents : Homme  $\geq 10$  ans/1000  $\mu\text{g}$ , Femme  $\geq 10$  ans/800  $\mu\text{g}$  (Ansstas G. and Thakore, 2008).

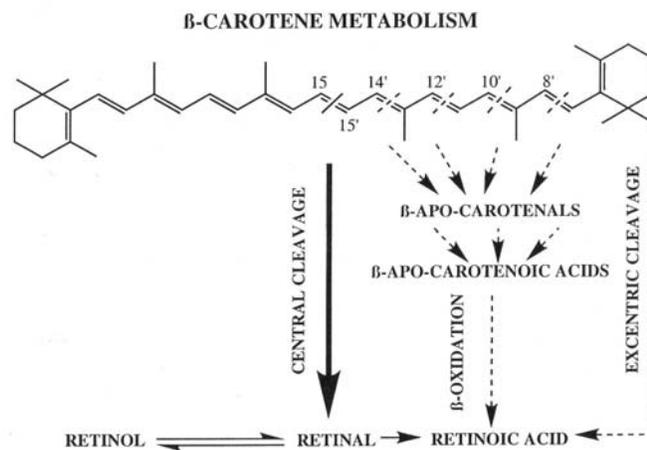


**Figure 5 :** Principales formes des caroténoïdes présentes dans le sang humain (Krinsky and Mayne/Livrea 2000)

## 2.2. Voies d'absorption:

L'absorption des caroténoïdes ( **Fig.2,p.6 et Fig.7,p.18**) se fait dans les entérocytes de l'intestin grêle par diffusion passive mais possiblement facilitée aussi ( lors d'une diète trop riche en gras) par un récepteur-transporteur membranaire de classe B et type I (SR-BI) se trouvant sur la membrane des cellules de la bordure en brosse intestinale (van Bennekum et al. 2005). L'efficacité de l'absorption augmente avec l'augmentation de l'apport mais le taux d'absorption des caroténoïdes diminue lorsque la dose ingérée augmente trop (Houde-Nadeau, NUT 5050 UdeM 2005). Des études (Li and Tso 2003) ont montré un processus saturable *in vitro*. La cuisson des aliments améliore les taux d'absorption, notamment pour le  $\beta$ -carotène. Dans les entérocytes les caroténoïdes sont d'abord oxydés pour obtenir leur clivage. Le mécanisme de clivage de caroténoïdes a été étudié pour la première fois dans les années 1950 (GLOVER and REDFEARN 1954). Une molécule de bêta-carotène, par hydrolyse de la liaison 15-15' et clivage symétrique sous l'influence d'une enzyme caroténoïde-oxygénase ( $\beta$ -carotène 15,15'- dioxygénase), donne deux molécules de RAL qui peut ensuite soit être réduit vers ROL, par une rétinaldéhyde réductase ou oxydé vers AR par une des RALDH 1, 2, 3,4.

Par contre, les deux autres carotènes (alpha et gamma) ne donneraient naissance qu'à une seule molécule de vitamine A (Krinsky et Mayne/Livrea 2000; Harrison 2005). D'autres études (Napoli and Race 1988); Wang et al 1996, Krinsky and Mayne/Livrea 2000; Blomhoff 2006) suggèrent aussi un clivage asymétrique. **(Fig.6, p.15)** Il en résulte deux molécules de  $\beta$ -apocaroténal avec des chaînes de différentes longueurs. Les deux molécules, en fonction de leur longueur, vont être transformées en RAL ou AR par l'intervention catalytique d'enzymes différentes. L'enzyme responsable du clivage asymétrique du  $\beta$ -carotène et lutéine, la  $\beta$ ,  $\beta$  carotène 9', 10'-dioxygénase, a été identifiée et clonée (Kiefer et al. 2001). Il y aurait aussi une voie métabolique mineure de production directe d'AR associée avec l'oxydation mitochondriale directe (Wang XD and Krinsky 1997, Ziouzenkova et al. 2007) (donc sans l'intermédiaire RAL) des produits du clivage asymétrique du  $\beta$ - carotène ( $\beta$ - apocaroténals et  $\beta$ - apo-carotenoic acids) (Krinsky and Mayne/Livrea 2000,(Ziouzenkova et al. 2007). Les réactions dans l'ensemble de cette voie directe seraient analogues aux processus de  $\beta$  - oxydation mitochondriale des acides gras (Wang XD et al. 1996b), Krinsky and Mayne/Livrea 2000).



**Figure 6.**  $\beta$ -carotène, métabolisme via clivage central et excentrique (Krinsky and Mayne/Livrea 2000)

Les esters de retinol (RE) de la diète d'origine animale, solubilisés préalablement dans les micelles, sont hydrolysés d'abord dans la lumière intestinale (Labrecque, Bhat et Lacroix 1997; Harrison 2005 ; (Wongsiriroj et al. 2008), par des enzymes d'origine pancréatique (triglycéride-lipase pancréatique (PTL) et ensuite sur la surface des entérocytes par la rétinyl-ester hydrolase (REH) et la Phospholipase-B de la bordure en

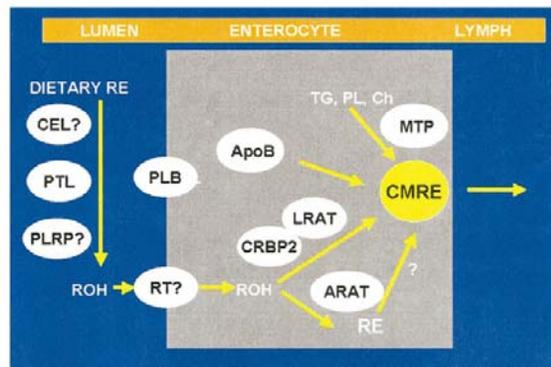
brosse de l'intestin (PLB), pour former du ROL qui va pénétrer ensuite dans la paroi intestinale ( Blomhoff 2006; Wongsiriroj and Blaner 2007) (**Fig.2,p.6 et Fig.7,p.18** ) La carboxyl ester lipase (CEL) pancréatique a été considérée, par le passé, responsable de l'hydrolyse des ER de la diète en rétinol au niveau de l'intestin. La (CEL) pancréatique est une enzyme capable d'hydrolyser, *in vitro*, les esters de cholestérol, les ER et les triglycérides (Weng et al. 1999). Elle est exprimée dans le pancréas mais aussi dans le lait maternel, le plasma sanguin, le foie et l'aorte (Gottesman et al. 2001). La situation a été clarifiée par des études sur des souris transgéniques KO pour la CEL pancréatique (Weng, et al. 1999) confirmant que le principal responsable de cette hydrolyse des ER de la diète vers ROL, au niveau des cellules de la bordure en brosse du petit intestin, est la rétinyl-ester hydrolase (REH). En fait l'absorption de ROL par la paroi intestinale était identique chez les souris contrôle et ceux CEL-KO donc les ER avaient préalablement été hydrolysés chez les CEL-KO aussi, nécessairement par d'autres enzymes soit (REH) (Weng, et al. 1999). De plus la capture des chylomicrons par les hépatocytes et l'hydrolyse de la Vit A qu'ils contiennent, est inaltérée chez ces souris CEL-KO (Weng, et al. 1999) donc l'activité hydrolase retrouvée dans les hépatocytes est l'œuvre d'autres enzymes de type rétinyl-ester hydrolases (REH) (Ross AC and Zolfaghari 2004).

En doses physiologiques le ROL libre passe dans les entérocytes facilité par un transporteur membranaire saturable du ROL (RT), mais à grandes doses c'est un transport passif. Dans les entérocytes, le ROL est complexé par liaison avec un récepteur cytosolique, le cellular rétinol-binding protein de type 2 (CRBP2), complexe qui constitue un meilleur substrat pour la réestérification du ROL par l'enzyme : lécithine: rétinol acyltransphérase (LRAT) (O'Byrne et al. 2005); Harrison 2005; Wongsiriroj and Blaner 2007) de préférence avec l'acide palmitique. Autre l'estérification du ROL par les enzymes de type LRAT (O'Byrne, 2005), la littérature suggère que l'estérification (réestérification) du ROL dans les entérocytes de l'intestin grêle peut aussi être catalysée par des enzymes de type acyl-CoA : rétinol acyltransphérase (ARAT), particulièrement quand de très-grandes doses de vitamine A sont ingérées (Ong and Newcomer, 1994 ; O'Byrne 2005, Blaner 2007). Également trois études indépendantes *in-vitro*, suggèrent que l'enzyme diacylglycerol acyltransférase de type I (DGAT-I) est capable d'estérifier le ROL vers RE d'une manière acyl-CoA-dépendante et agir ainsi comme une ARAT (du moins *in-vitro*) (O'Byrne 2005 ;(Yen et al. 2005); (Orland et al. 2005). DGAT-1 a été identifiée à l'origine

comme une enzyme exprimée dans plusieurs tissus dont l'intestin, enzyme capable de la biosynthèse du triacylglycerol à partir de diacylglycerol et des acyl-CoA-gras. Ceci suggère que la physiologie de la DGAT-1 dans l'intestin concerne la catalyse de l'estérification du ROL sur l'axe acyl-CoA-gras-dépendante et peut faciliter ainsi les transformations de la vitamine A des aliments dans les entérocytes de l'intestin grêle (Wongsiriroj and Blaner, 2007). Les ERs sont ensuite inclus dans des chylomicrons (sortes de entéro-lipoprotéines) qui contiennent aussi d'autres matières lipidiques : phospholipides (PL), triglycérides (TG), cholestérol (Ch) et cholestéryl esters (CEs) et apolipoprotéine B (apoB). Une autre protéine, la microsomal triglycéride transfert protéine (MTP), contrôle l'inclusion d'une partie de ces matières lipidiques dans les chylomicrons. Les chylomicrons (CM) qui contiennent les ERs nouvellement absorbés (CMRE) sont sécrétés hors des entérocytes dans le système lymphatique, qui va les transporter ensuite dans la circulation sanguine générale qui va les acheminer au foie. Bien que la plupart du ROL absorbé dans les entérocytes est ainsi d'abord envoyé dans le lymphatique, estérifié en tant que RE inclus dans les chylomicrons (sortes de entéro-lipoprotéines), il y a aussi une quantité significative de ROL non-estérifié qui est aussi absorbée dans les entérocytes et est envoyée ensuite directement dans la circulation portale en tant que ROL LIBRE, son passage vers l'extérieur de l'entérocyte étant possiblement facilité par le même transporteur membranaire du ROL : Retinol transporter protéine (RT), (Harrison 2005).

Ce type de transport de ROL libre dans la circulation portale est probablement augmenté de façon compensatoire et devient physiologiquement significatif lors des conditions pathologiques qui affectent le bon déroulement de la formation et sécrétion des chylomicrons. Il est toujours intéressant d'étudier la répartition ultérieure du ROL absorbé de l'intestin grêle, lorsqu'il sort des entérocytes sur les deux voies de transport vers le foie : voie lymphatique (chylomicrons) et voie portale (ROL libre). Rappelons-nous que seulement de 20 à 60% du ROL ingéré se retrouve dans le système lymphatique (Goodman et al. 1966, HUANG and GOODMAN 1965, Orland et al. 2005); (Blomhoff et al. 1990);2006, Harrison 2005). De plus (Hollander 1981) montre qu'approx. 60% du ROL absorbé de l'intestin grêle, sort des entérocytes dans la circulation lymphatique et 30% sort dans la circulation portale et il indique aussi que la sécrétion de ce ROL vers la voie lymphatique est modulée par la présence des taurocholate et différents acides gras en concentrations variables.

Intéressant aussi le fait qu'une supplémentation orale en ROL est efficace et améliore partiellement les symptômes de hypovitaminose A chez des patients malades d'*abetalipoproteinémie* (patients qui ne forment et ne secrètent pas des chylomicrons) (Kane JP et al.) 1996; Harrison 2005). Des études in-vitro ont également confirmé que dans des cellules type entérocytes en culture, il y a aussi un transport de ROL libre ou de ses métabolites à travers la cellule (absorption -excrétion) indépendamment de la formation et la sécrétion de lipoprotéines (chylomicrons) (Nayak et al. 2001). On peut donc envisager le transport de ROL libre dans la circulation, comme étant peut-être un mécanisme adaptatif et compensatoire de soutien, essentiel pour l'homéostasie de la vitamine A in-vivo dans certaines situations biologiques qui affectent le mécanisme primaire des chylomicrons.



**Figure 7.** Mécanismes de digestion et absorption intestinale de la vit. A (Harrison, 2005)

### 2.3. Réserves et mobilisation. Le rôle du foie :

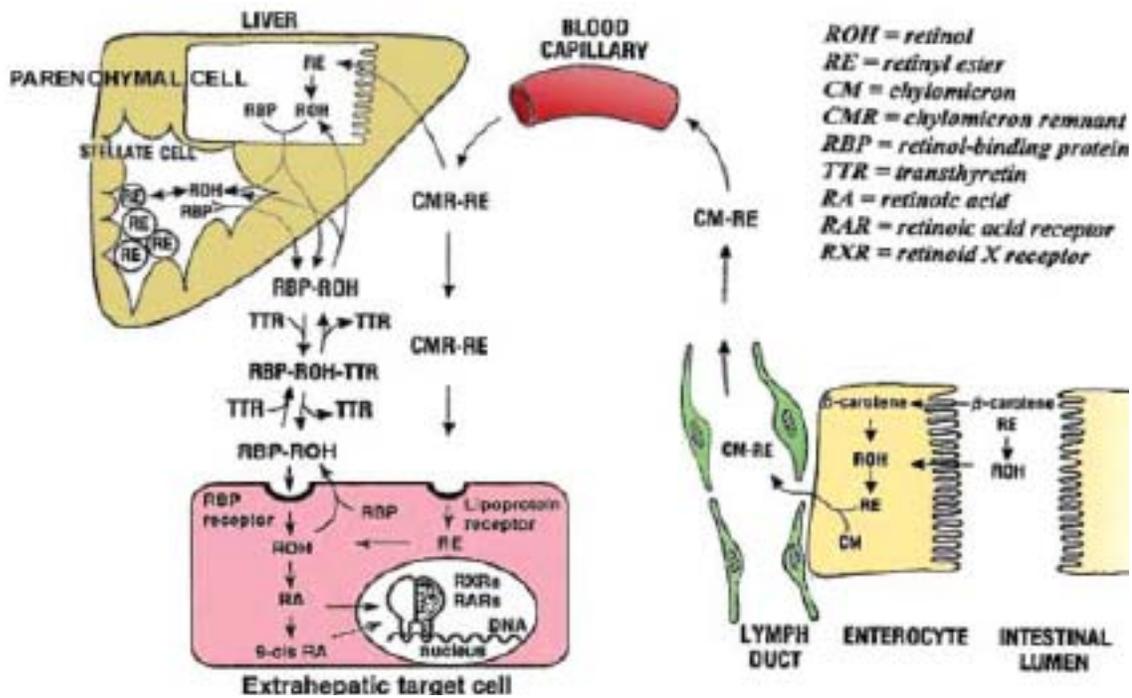
Les chylomicrons CMRE sortent des entérocytes dans le système lymphatique, arrivent dans la circulation sanguine générale et ensuite dans le foie (le principal organe de stockage de la vitamine A) où des enzymes rétinyl-ester hydrolases (REH) transforment de nouveau les ERs en ROL. En fait le ROL subit plusieurs fois, autant dans les hépatocytes que dans les cellules hépatiques étoilées, un processus de recyclage: hydrolyse, sécrétion, estérification, emmagasinage, avant son utilisation finale (Ross AC and Zolfaghari 2004) (Blaner et al. 2008). Dans le foie, la vitamine A est stockée sous forme d'esters (palmitate) de rétinol (ER) majoritairement dans les cellules hépatiques étoilées (cellules Ito) sous forme d'inclusions alvéolaires lipidiques (Ross AC and Zolfaghari 2004) et un peu dans les hépatocytes typiques (Green et Balmer 2005). Au besoin, des enzymes REH peuvent hydrolyser de nouveau les ER en ROL autant dans les hépatocytes étoilées (cellules Ito)

que dans les hépatocytes typiques. Dans les hépatocytes typiques ce ROL est (selon besoins) soit oxydé vers l'AR sur la voie métabolique régulière pour usage interne de l'hépatocyte, soit lié au « retinol-binding protein » (RBP) - associé à la protéine transthyréline (TTR) et sécrété dans la circulation, soit transféré (en tant que réserve intermédiaire de ROL rapidement disponible), vers les cellules hépatiques étoilées (cellules Ito). (Blaner 2009). Ici il complétera la réserve de ROL intermédiaire obtenu directement dans ces hépatocytes étoilées (cellules Ito) par hydrolyse de-novo de leur propre réserve d'esters (ER) (palmitate de rétinol). Cette réserve intermédiaire de ROL des hépatocytes étoilées (cellules Ito) peut-être ensuite (toujours selon besoins) soit utilisée dans le foie en rétroaction vers les hépatocytes typiques, soit rétro-estérifiée vers la réserve principale de ER, soit liée au « rétinol-binding protein » (RBP) - associé à la protéine transthyréline (TTR) et sécrété dans la circulation à destination des tissus extra-hépatiques cibles. (Ross AC 1993); Gamble and Blaner/Livrea, 2000; Green et Balmer 2005; Blomhoff 2006). (**Fig.3 p.7; Fig.8,p.20**). Une réserve normale de retinyl-esters (RE) dans les hépatocytes-étoilées, permette aux individus normaux d'avoir un apport adéquate de Vit A pour des semaines voir des mois (Blomhoff et al. 1991), 2006) à partir de leurs réserves qui leur assurent une concentration sérique homéostatique constante de ROL dans le sang, d'environ 1-2  $\mu\text{M}$  en dépit des fluctuations de ROL dans la diète journalière.

#### **2.4. Transport dans le sang vers les tissus et cellules cibles :**

Les ERs hydrolysés dans les hépatocytes typiques ou étoilées produisent le ROL nonestérifié qui va se lier à la RBP, (Kanai et al. 1968); Ross and Zolfaghari 2004; Wongsiriroj and Blaner 2007) protéine de transport sécrétée en grande quantité dans les hépatocytes. Ce complexe ROL-RBP4 va être ensuite sécrété dans le plasma et tout de suite associée à la protéine transthyréline (TTR) (Peterson and Rask 1971); Ross and Zolfaghari 2004; Blomhoff 2006). La TTR servirait à prévenir la filtration glomérulaire du complexe ROL-RBP lors du passage du sang dans les reins. Il ne faut pas oublier que l'assimilation extra-hépatique des résidus des CM ( chylomicrons ) est aussi très importante dans l'acheminement des ERs et caroténoïdes vers différents tissus cibles : moelle osseuse, cellules sanguines périphériques, rate, tissu adipeux, muscles squelettiques, reins (Paik et al. 2004); Wongsiriroj and Blaner 2007 ). (**Fig.4, p.8; Fig.8, p.20**)

Ce transport direct ( sans impliquer le foie ) de rétinoïdes de l'intestin grêle vers des tissus cible est peut-être un mécanisme complémentaire dans l'homéostasie du ROL, qui prend une place très importante lorsque la voie principale de transport du ROL (via la protéine de transport RBP4) à partir des réserves de vit A du foie est physiologiquement perturbée .



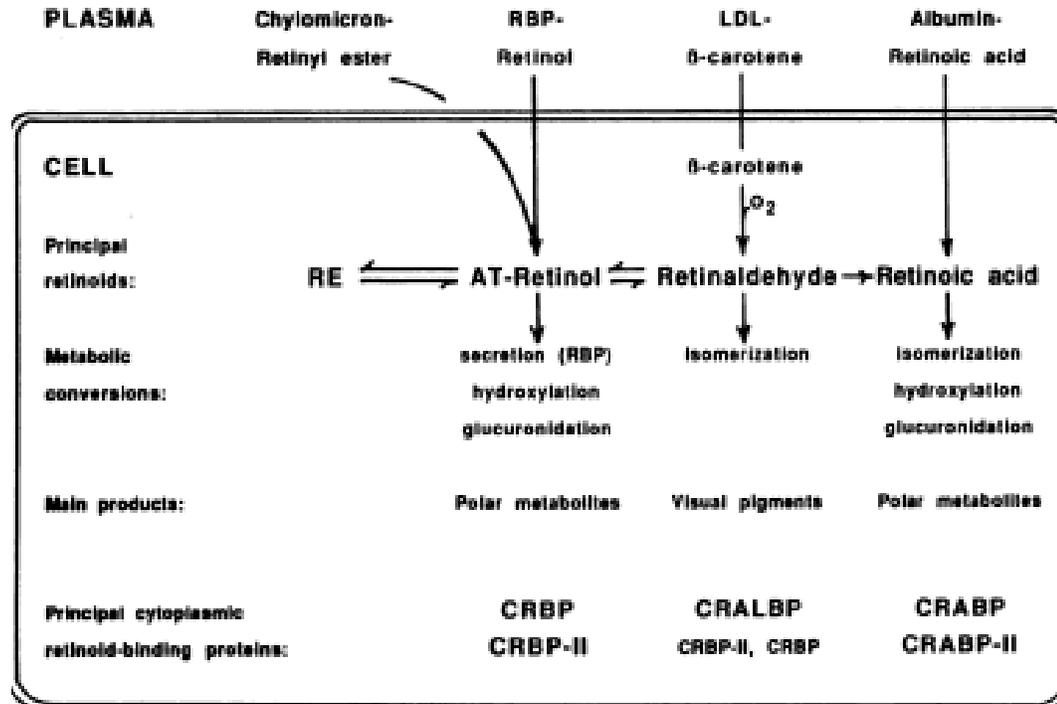
**Figure 8.** Métabolisme général de la vitamine A : digestion, absorption, transport, stockage, mobilisation, livraison et action aux tissus cibles (Blomhoff et Blomhoff, 2006)

### 3.) TRANSPORT ET PROTEINES DE LIAISON DES RETINOIDES

Plusieurs protéines sont impliquées dans le transport des rétinoïdes tant dans le plasma qu'à l'intérieur des cellules (entérocytes, hépatocytes ou cellules cibles). Le ROL est lié au « rétinol binding protein » (RBP) dans le foie, pour son transport ultérieur dans le sang sous forme d'un complexe ROL-RBP-TTR jusqu'aux tissus cibles. La TTR prévient la filtration glomérulaire dans le rein du complexe ROL-RBP (Peterson and Rask 1971); Blomhoff 2006; Wongsirirotf and Blaner 2007).

Dans les cellules (enthérocytes, hépatocytes ou cellules cibles) le ROL et ses dérivés, le RAL et l'AR vont se lier à des protéines cellulaires (récepteurs cytosoliques) qui les solubilisent, améliorent leur affinité comme substrats enzymatiques et augmentent ainsi leur réactivité et l'efficacité des réactions métaboliques spécifiques (**Fig.9, p.22**) auxquelles ils participent. Ces protéines cytoplasmiques de liaison pour les rétinoïdes, jouent aussi un rôle de protection en liant le ROL libre, lequel en excès, peut déstabiliser la structure membranaire et affecter sa fonction (Blomhoff 2006; Wongsirirot and Blaner 2007). Ces protéines sont les « cellulars retinol-binding protein » (CRBP), de type I et II, et les « cellulars retinoic acid-binding protein » (CRABP), de type I et II (Gottesman et al. 2001; Wongsirirot and Blaner 2007). Elles font partie d'une famille de protéines de type récepteurs cytosoliques pour des petits ligands hydrophobes comme les rétinoïdes, famille très bien préservée évolutivement chez les mammifères (Ong 1994, Ong et al. 2000; Blomhoff 2006).

Les deux principales CRBP-I et CRBP-II, lient le *at*-ROL et le *13cis*-ROL mais pas le *9cis*-ROL ou *11cis*-ROL ou l'AR. Ils lient aussi le RAL mais dans l'œil il y a un autre type de RAL-binding protéine (CRALBP pour *11-cis*-ROL et *11cis*-retinaldéhyde). La CRBP-I est exprimée dans presque tous les tissus sauf les muscles cardiaques et squelettiques et elle est particulièrement abondante dans les tissus très riches en ROL (foie). La CRBP-II est exprimé seulement dans les entérocytes absorbantes du tissu en brosse des villosités de l'intestin grêle. Des études parlent également d'une protéine CRBP-III (exprimée seulement dans les glandes mammaires et dans le cœur, muscles et tissu adipeux), qui serait nécessaire pour l'incorporation des rétinoïdes dans le lait des mammifères et donc surtout exprimé dans le tissu mammaire et d'une façon moindre dans d'autres tissus (cœur, muscle et tissu adipeux) où elle aurait un rôle complémentaire-compensatoire redondant avec la CRBP-I (Piantedosi et al. 2005), Blomhoff 2006). Quant aux deux CRABP, alors que la CRABP I est exprimée dans tous les tissus, la CRABP II est exprimée d'avantage dans la peau, l'utérus, les ovaires, le plexus choroïde et des tissus fœtales dont les reins. Toutes ces 5 protéines sont exprimées en excès par rapport à leurs ligands (les 3 CRBP en ratio de 4 :1 par rapport au ROL intracellulaire et les 2 CRABP en ratio de 20:1 par rapport à l'AR intracellulaire), ce qui veut dire qu'en conditions normales tous les rétinoïdes intracellulaires se trouvent sous forme lié à ces protéines. (David A. Bender, Nutritional Biochemistry II-ed Cambridge, 2003).



**Figure 9.** Quelques implications métaboliques des protéines cellulaires de liaison des rétinoïdes. (informations d'après Ross 1993, Blomhoff 2006, Wongsirirotj and Blaner 2007)

### 3.1. RBP - Protéine de liaison du rétinol (ROL)

La « retinol binding protein » (RBP) est une protéine avec un poids moléculaire de 21 kDa synthétisée principalement par le foie pour lier le ROL en ratio équimoléculaire 1:1 dans le foie afin de l'acheminer dans la circulation sanguine jusqu'aux tissus cibles (Ross AC 1993) ; (Collins and Mao 1999). La RBP lie le ROL, couplée à la transthyréline (TTR), pour ensuite l'acheminer aux cellules. Dans sa structure se trouve une longue chaîne polypeptidique avec un site de liaison pour le ROL (Collins and Mao 1999), Gamble et Blaner/Livrea, 2000 ; Wongsirirotj and Blaner 2007) et c'est le seul transporteur extracellulaire spécifique du ROL dans la circulation sanguine (Gottesman et al. 2001, Ross AC and Zolfaghari 2004); Blomhoff 2006; Wongsirirotj and Blaner 2007). La RBP est capable de solubiliser le ROL grâce à sa poche hydrophobe et ainsi de le transporter aux tissus cibles sous forme du complexe TTR-RBP-ROL (holo-RBP) d'environ 80 kDa. Portant le ROL on parle de holo-RBP alors que sans le ROL on parle d'apo-RBP. La protéine transthyréline (TTR) est composée de quatre sous-unités de 14 kDa formant un

homotétramère de 55 kDa. Associée à la protéine RBP dans un ratio 1 :1, la TTR préviendrait la filtration glomérulaire de la RBP et donc du complexe RBP-rétinol (Napoli 1996); Napoli/Livrea 2000; Wongsiriroj and Blaner 2007). La TTR (transthyrétine) nommée aussi la pré-albumine (car plus rapide en électrophorèse que l'albumine) sert aussi de transporteur pour les hormones thyroïdiennes (T4). Le ROL est internalisé dans les cellules cibles alors que l'apo-RBP est éliminé par le rein. Le TTR est dégradée et/ou partiellement recyclée. Dans l'urine RBP se trouve décarboxylé (manque le groupe carboxyle final) après sa filtration rénale. Chez des souris transgéniques déficientes en TTR, ceci ne semble pas affecter l'absorption, la capture et la livraison du ROL et des ER, car l'apport en rétinoïdes dans le foie et les tissus cibles (ex. reins, rate, yeux) est comparable pour les souris contrôle et les TTR-Down. On ne voit pas d'anomalie du développement et les souris TTR-Down sont fertiles (Wei et al. 1995). Si l'on injecte de l'RBP humaine à des souris TTR-Down, cette RBP se retrouve rapidement dans le système uro-excréteur et ensuite dans l'urine confirmant le rôle de la TTR dans la prévention de la filtration glomérulaire de la RBP dans les reins (Wei et al. 1995). Des souris transgéniques déficientes en RBP ont un niveau de ROL plus bas dans le sang et une réserve de ROL dans le foie plus élevée. Ces animaux sont néanmoins viables et fertiles (Quadro et al. 2003) bien qu'une baisse d'acuité visuelle est observée chez les jeunes et aussi chez les adultes nourris avec une diète pauvre en vit. A. Mais les souris RBP-Down adultes nourris avec une diète suffisante en vit A sont normaux.

Chez l'humain, une étude familiale chez des sœurs porteuses d'une variante Down dans le gène RBP mais ayant une diète suffisante en rétinoïdes, a révélée des niveaux sanguins très faibles en RBP associés à des troubles de vision nocturne, mais pas avec d'autres symptômes associé à une hypovitaminose A chronique (Seeliger et al. 1999). Ainsi selon les études réalisées chez la souris et l'humain, il semble que la RBP est essentielle pour la mobilisation du ROL dans le foie surtout lorsque la diète est insuffisante en vitamine A (Noy 2000) ; Wongsiriroj and Blaner 2007).

En conclusion, en absence de RBP (mais avec une diète suffisante en rétinoïdes) il y a des mécanismes complémentaires, qui peuvent manifestement approvisionner de différentes façons en rétinoïdes, des tissus possédant les enzymes nécessaires pour les convertir en rétinol ou en acide rétinoïque directement dans leurs cellules (tissu adipeux, poumon, etc.) (Gottesman et al. 2001); (Paik et al. 2004); Wongsiriroj et Blaner 2007).

Autre la RBP, ils existent aussi d'autres façons d'approvisionnement en rétinoïdes des tissus cibles via le sang. C'est premièrement le cas de l'AR circulant lié à de l'albumine et des ER circulants dans les chylomicrons et leurs résidus (fantômes) ou circulant dans des lipoprotéines VLDL et LDL. Deuxièmement c'est le cas des métabolites glucuroniques polaires (hydrosolubles) du rétinol (retinyl- $\beta$ -glucuronides) et de l'AR qui peuvent facilement être hydrolysés vers ROL et AR (Blaner et al. 1994), Wongsiriroj and Blaner 2007). C'est aussi le cas des caroténoïdes, dérivés ou non de  $\beta$ -carotène (provitamine A) (Krinsky et Mayne/Livrea 2000) qui circulent dans le sérum (exportés du foie) dans des lipoprotéines VLDL et LDL formant des résidus des chylomicrons (Parker 1996); Houde-Nadeau, NUT 5050 UdeM 2005; Wongsiriroj and Blaner 2007 ) et peuvent être convertis directement dans les cellules cibles en rétinol ou en acide rétinoïque (Gottesman et al., 2001). Mais le ROL reste la principale forme de transport de la vitamine A avec un transporteur spécifique (RBP) dans l'organisme vers les tissus cibles. Le complexe rétinol-RBP-TTR est reconnu au niveau des membranes cellulaires des tissus cibles par un récepteur membranaire spécifique STRA6 (Blaner 2007) qui permet le passage du ROL à travers la membrane de la cellule. Il peut y avoir aussi de la diffusion passive ou facilitée du ROL à travers la membrane cellulaire (Gottesman et al. 2001).

Alors qu'on croyait la RBP synthétisée presque uniquement dans le foie (avec des présences mineures dans d'autres tissus) et ayant comme rôle exclusif le transport de ROL, plusieurs recherches ont prouvé dernièrement une synthèse abondante de la RBP4 dans le tissu adipeux et on trouvé une corrélation positive du RBP en tant qu'adipokine avec l'obésité, le syndrome métabolique, la résistance à l'insuline et le diabète de type 2 (T2DM). ((Yang et al. 2005) montrant ainsi une possible interférence majeure entre les rétinoïdes et ces conditions cliniques et maladies du métabolisme (Graham et al. 2006).

### **3.2. CRBP- I, II et III - Protéines cellulaires de liaison du rétinol**

Dans les cellules (enthérocytes, hépatocytes ou cellules cibles) le ROL et ses dérivés, le RAL et l'AR vont se lier à divers protéines cellulaires (récepteurs cytosoliques) qui solubilisent ces rétinoïdes à l'origine liposolubles, les protègent de la dégradation oxydative non-métabolique, améliorent leur affinité comme substrats enzymatiques et augmentent ainsi leur réactivité et l'efficacité des réactions métaboliques spécifiques auxquelles ils participent (Gottesman, 2001 ; Harrison 2005 ; Wongsiriroj and Blaner 2007).

Les protéines cytoplasmiques (nommées aussi récepteurs cytosoliques) de type CRBP, sont le « cellular rétinol- ou rétinoïdes- binding protein » (CRBP type I, II et III). Cette association avec une protéine permet également aux rétinoïdes concernés d'être un substrat de plus haute affinité pour les enzymes impliquées dans la production d'AR (Collins, 1999 ; Napoli/Livrea M.A. 2000 ; Harrison 2005 ; Wongsiriroj and Blaner 2007) dans les tissus cibles. Les « cellulars rétinol (rétinoïdes) binding protein » (CRBP), CRBP I, II et III, appartiennent à une famille de protéines de liaison spécifiques pour des métabolites hydrophobiques y compris les acides gras intracellulaires. Ils ont une similarité de structure d'environ 56% et peuvent lier le tout-*trans* ROL, le 13cis-ROL et le tout-*trans* RAL mais pas le 9cis-ROL ou 11cis-ROL ou l'AR. Ils lient aussi le *at*-RAL mais dans l'œil il y a un autre type de RAL-binding protéine (Noy 2000; David A. Bender, Nutritional Biochemistry II-ed Cambridge, 2003 ; Piantedosi 2005; Blomhoff 2006). Les CRBP sont hautement conservées d.p.d.v. de l'Évolution, ce qui confirme leur importance physiologique. Bien qu'elles partagent des similarités génétiques, structurales et d'activité biochimique, les voies d'expression cellulaire de ces deux protéines réceptrices cytosoliques (cytoplasmiques) pour les rétinoïdes, sont très différentes et spécifiques à chacune d'entre elles (Noy 2000, Harrison 2005 ; Wongsiriroj and Blanner 2007).

La CRBP1, un polypeptide de 14.6 kDa, est exprimée dans plusieurs tissus chez l'embryon et chez l'adulte (Ghyselinck et al. 1999 ; (Batten et al. 2004), avec une abondance marquée dans le foie (hépatocytes-étoilées) (Blaner, 2009), les poumons, les reins, et les organes sexuelles (Noy, 2000).) La CRBP2, un polypeptide de 16kDa, est exprimé presque seulement dans les entérocytes absorbatives matures des villosités du petit intestin (du moins chez l'adulte). Chez l'embryon, la CRBP2 est exprimée dans l'intestin et de manière transitoire dans le foie. (Ong et all 1994 ; Noy 2000). CRBP1 a plus d'affinité pour le ROL que CRPB2 et leur affinité pour le RAL est similaire (Noy, 2000; David A. Bender, Nutritional Biochemistry II-ed Cambridge, 2003). Parmi ses activités, la CRBP1 solubilise les rétinoïdes dans le foie et d'autres tissus, facilite l'oxydation du ROL en RAL par les rétinols-déshydrogénases (ADH-alcool déshydrogénases) et du RAL en AR par les rétinol-déshydrogénases (ALDH-aldéhydes déshydrogénases), (Collins et Mao, 1999, Napoli/M.A. Livrea, 2000; Blomhoff 2006) et améliore l'hydrolyse des ER en ROL et l'estérification ( ou réestérification ) du ROL en ER par sa présentation à l'enzyme LRAT (lécithine-rétinol acyltransphérase) (O'Byrne, 2005).

Les deux enzymes (CRBP I et LRAT), sont abondamment exprimées dans les hépatocytes-étoilées où elles jouent un rôle important dans la formation et le stockage des retinyl-esters (RE) (Napoli/Livrea 2000; (Ross AC and Zolfaghari 2004); (Blaner et al. 2009). Des souris transgéniques KO pour ces deux enzymes montraient des réserves insuffisantes de RE dans leurs hépatocytes-étoilées (Ghyselinck et al. 1999); (Batten et al. 2004). Cette diminution peut être expliquée par une estérification LRAT du ROL moins efficace sur le rétinol libre qu'avec le ROL lié au CRBP I (Ghyselinck et al. 1999). En condition de diète suffisante en vitamine A, des mécanismes compensatoires doivent toutefois fonctionner aussi chez les souris transgéniques KO-CRBP1 car elles sont viables, fertiles et ne démontrent pas d'anomalies spécifiques d'une déficience en AR lors de l'embryogenèse ni des symptômes dus à une hypovitaminose A chronique chez les nouveau-nés ou les adultes (Ghyselinck et al. 1999). Par contre les souris avec une diète déficiente en vitamine A, écoulent leur réserve d'ER dans approx. 5 mois et développent des anomalies spécifiques de l'hypovitaminose A post-natale (Ghyselinck et al. 1999).

Ces expériences reflètent le modèle physiologique d'une réserve normale de retinyl-esters (RE) dans les hépatocytes-étoilées, qui permet normalement d'avoir un apport adéquate de Vit A pour des semaines voir des mois (Blomhoff et al. 1990),1994, 2006) à partir de réserves qui assurent une concentration sérique homéostatique constante de ROL dans le sang, (Blomhoff and Blomhoff 2006) d'environ 1-2  $\mu\text{M}$  en dépit des fluctuations normales voir restrictives de ROL dans la diète journalière. Les auteurs (Ghyselinck et al. 1999) notent que le développement normal des souris transgéniques KO-CRBP1 n'est pas dû à une surexpression de complémentarité de la CRBP2 car l'expression tissulaire de la protéine CRBP2 est presque identique pour les souris contrôles et mutantes (Ghyselinck et al., 1999). L'expression de la CRBP1 est stimulée par l'administration d'AR alimentaire (Blaner et al. 1986) ; Napoli/Livrea M.A. 2000 ; (Niles 2004).

La CRBP2 (cellular rétinol/rétinoïdes-binding protein de type II) lie dans les entérocytes, le ROL libre ou RE fraîchement absorbés via la vitamine A préformée de la nourriture ou le RAL formé par le clivage des provitamines A- caroténoïdes fraîchement absorbés de la diète. Le ROL lié à la CRBP2 est ensuite ré-estérifié (principalement par la LRAT) avec des acides gras a longue chaîne (principalement du palmitate) (Blaner and Wongsiriroj 2007 ; Blomhoff 2006 ; Harrison 2005 ; (O'Byrne et al. 2005). Le RAL lié a la CRBP2 est subséquentment réduit en ROL qui sera a son tour lié à de la CRBP2 et

estérifié ensuite également avec des acides gras à longue chaîne (ex. palmitique). Plusieurs enzymes peuvent catalyser cette réaction réversible de réduction **RAL-ROL**, comme par exemple des alcool-déshydrogénases/réductases à courte chaîne (**SDR**, dont la RoldH) ou à moyenne chaîne (**MDR** – dont les ADH font aussi partie), ainsi que des membres de la famille des aldo-keto réductases. Il semblerait qu'il y a plus d'une seule RAL-Réductase intestinale en tant qu'enzyme unique responsable pour catalyser la conversion de RAL vers ROL (Blaner and Wongsiriroj 2007). La CRBP II, exprimé presque seulement dans l'intestin grêle, est une de plus abondantes protéines des entérocytes absorbantes de la muqueuse des villosités de l'intestin grêle et elle compte pour approximativement 1% du total des protéines solubles de la muqueuse jéjunale (Ong 1994) ; Blomhoff 2006). Cette présence intense de la CRBP II dans le petit intestin, indique son rôle important dans le début de l'absorption intestinale de la vitamine A (Li and Norris 1996) ; Harrison 2005).

Il a été spéculé que la CRBP-II pourrait se lier à des transporteurs, spécifiques pour rétinoïdes, localisés dans les membranes des entérocytes de la bordure intestinale en brosse, permettant ainsi une diffusion facilitée pour le ROL. La CRBP-II peut aussi servir comme réservoir temporaire-tampon de ROL pour garder les concentrations cytoplasmiques transitoires des rétinoïdes libres, aussi bas que possibles et ainsi protéger les cellules et leurs membranes lipidiques des effets détersives de ces rétinoïdes libres (Harrison, 2005). Des souris transgéniques CRBP-II/KO montrent une capacité réduite d'absorption intestinale de la Vit A (évaluée selon les réserves hépatiques des ER réduites de 40% des souris CRBP-II/KO par rapport aux contrôles), même dans les conditions d'une diète enrichie en Vitamine A (E et al. 2002) ; Blomhoff 2006). Néanmoins la situation est encore plus évidente et ce rôle de la CRBP-II de faciliter l'absorption augmente, lorsque l'apport alimentaire de vitamine A est bas et pas lorsque celui-ci est abondant, ce qui signifie que bien qu'importante dans le processus d'absorption intestinale de la vitamine A, la CRBP-II n'est pas la seule impliquée dans ce processus (E X et al 2002 ; Wongsiriroj and Blaner 2007). Des études in vivo ont également montré que les niveaux de mRNA du CRBP-II sont augmentés dans l'intestin grêle des rats nourris avec une diète déficiente en rétinoïdes (Rajan et al. 1991) ; Harrison 2005) et aussi chez les rats avec une diète riche en acides gras non-saturés aux longues chaînes-carbone (Suruga et al. 1995) ; Harrison 2005).

Dans l'entérocytes le complexe CRBP II-ROL est un substrat de meilleure affinité (comme la CRBP I-ROL dans le foie) pour l'enzyme lécithine-rétinol acyltransphérase (LRAT) (O'Byrne et al. 2005) dont l'efficacité d'estérification (réestérification) vers RE du ROL préalablement lié à la CRBP II est augmentée comparativement au simple ROL libre (Noy 2000) ; Ross and Zolfaghari 2004 ; Harrison 2005 ; Wongsiriroj and Blaner 2007). On suggère aussi qu'autre par les LRAT, l'estérification (réestérification) du ROL dans les entérocytes de l'intestin grêle peut aussi être catalysée par des enzymes de type acyl-CoA : rétinol acyltransphérase (ARAT), quand des très-grandes doses de vit. A sont ingérées (Ong 1994) ; O'Byrne 2005, Wongsiriroj and Blaner 2007). L'expression de la CRBP-II est inhibée par l'administration alimentaire d'AR (Blaner et al. 1986); (Niles 2004). On parle aussi d'une protéine CRBP-III, nécessaire (ensemble avec la LRAT) pour l'incorporation des rétinoïdes (ER) dans le lait des mammifères exprimé d'abord dans le tissu mammaire et moins dans d'autres tissus (cœur, muscle et tissu adipeux) où elle aurait un rôle complémentaire-compensatoire redondant avec la CRBP-I (David A. Bender, Nutritional Biochemistry II-ed Cambridge, 2003 ; Piantedosi, 2005 ; Bromhoff 2006).

Les protéines (récepteurs cytosoliques) CRBP-I, CRBP-II, CRBP-III stabilisent leurs rétinoïdes dans le cytoplasme et ont un rôle clé dans la présentation du ROL et du RAL aux enzymes spécifiques, en donnant l'accès à ces rétinoïdes, exclusivement aux enzymes essentielles du métabolisme de la vitamine A. Ces protéines cytoplasmiques de liaison pour les rétinoïdes (CRBP), ont aussi un rôle de protection, liant les rétinoïdes transitoirement libres excédentaires, qui peuvent déstabiliser comme détersifs, la membrane et ses fonctions (Harrison 2005 ; Blomhoff, 2006 ; Wongsiriroj and Blaner 2007).

### **3.3. CRBP-I et II- Protéines cellulaires de liaison de l'acide rétinoïque**

Les « cellulars rétinoïque acide binding protein » (type CRBP, environ 14 kDa.), CRBP- I et II, sont des récepteurs cytosoliques d'AR , appartiennent à la superfamille des protéines cellulaires pour liaison des lipides, partagent 72% d'identité de leurs séquences d'acides aminés (Aström et al. 1991) et sont bien exprimées dans plusieurs tissus chez l'embryon et l'adulte (Gorry et al. 1994) ; (Schweigert et al. 1999) ; Creech Kraft/Livrea 2000 ; (Gottesman et al. 2001); (Clagett-Dame and DeLuca 2002) ; David A. Bender, 2003 ; Blomhoff 2006), dans les organes sexuelles féminines et le placenta.

L'expression tissulaire des deux isoformes, CRABP-I et CRABP-II est spécifique et variable selon les stades de développement et le type de cellules (Dollé et al. 1990) ; Ong et al.1994). La CRABP-I est plus largement exprimée, alors que la CRABP-II est plus limitée à la peau, l'utérus, les ovaires et le développement rénal (Rajan, 1991 ; Ong 1994 ; (Dollé et al. 1990) ; (Zheng and Ong 1998). L'expression de la CRABP-I semble régulée par l'AR (Astrom, 1991 ; (Wei et al. 1995). L'expression du CRABP-II est stimulée par l'AR dans plusieurs tissus (Kato et al. 1985). Leurs modèles de structure moléculaire sont très bien conservés sur l'axe évolutif des vertébrés, ce qui signifie qu'ils sont importants dans le développement et métabolisme (Gorry et al. 1994) ; Zheng 1998,1999 ; David A. Bender, Nutritional Biochemistry II-ed Cambridge, 2003). Les CRABP I et II facilitent l'oxydation microsomale catabolique de l'AR vers des métabolites polaires, en présentant l'AR lié aux enzymes de la famille des cytochromes (ex. CYP26A1) et interviennent ainsi dans la régularisation pour une concentration optimale d'AR très importante chez l'embryon (Gorry et al., 1994 ; Creech Kraft/Livrea 2000 ; Clagett-Dame et DeLuca 2002). La surexpression par transfection de CRABP-I dans des cellules souches de type F9, a augmenté leur niveau de dégradation de l'AR et a diminué leur sensibilité à l'AR comparativement aux cellules contrôle non-tranfectées (Boylan and Gudas 1992) ; Bromhoff 2006).

Des expériences avec des souris transgéniques CRABP1/KO, CRABP2/KO et les deux gènes KO simultanément, donnent des phénotypes normaux pour les homozygotes de ces mutants (Gorry et al., 1994 ; Lampron et al., 1995).L'embryogénèse et le développement après naissance sont normaux, la descendance est fertile et a une viabilité normale. Il n'y a pas de compensation-complémentarité entre CRAPB I et II, car les phénotypes des homozygotes double-mutants de ces animaux, sont quasi-normaux aussi. Ces double-KO ont une anomalie mineure du limbe et une légère réduction de la viabilité post-natale (9% mortalité avant l'âge de 6 semaines contre 2% de mortalité pour les contrôles) (Lampron et al., 1995 ; Clagett-Dame and DeLuca 2002).Aucune activité supplémentaire de liaison à l'AR n'a été observée chez ces animaux double-mutants homozygotes (Lampron et al.1995). Cela surprend (étant donné le rôle important de ces protéines dans le métabolisme de la vitamine A et leur longue conservation sur l'axe évolutive des vertébrés), mais la surprotection d'animaux en laboratoire a probablement biaisé les expériences (Lampron et al., 1995 ; Clagett-Dame et DeLuca, 2002).

Puisque les expériences de surexpression de la CRABP-I (Boylan and Gudas 1991),(Boylan and Gudas 1992) ont montré une diminution par catabolisme de l'AR dans les cellules, il était concevable que des expériences de sous-expression/suppression des CRABP I et II (Gorry et al. 1994 ; Lampron et al., 1995 ) donnent l'effet contraire (augmentation des quantités d'AR dans les cellules avec des conséquences (peut-être) dans la biologie de ces animaux CRABP-KO). La quasi-normalité de mutants et de leur descendance peut surprendre mais c'est possible que les éventuels déséquilibres se règlent au niveau cellulaire ( restant invisibles ) et/ou l'environnement de laboratoire a pu estomper l'impact de ces mutations, en laissant le temps à d'autres mécanismes compensatoires du métabolisme des rétinoïdes de ces animaux transgéniques, de s'activer physiologiquement (diminution de l'absorption intestinale et de libération des réserves du foie, diminution de protéines de transport et de liaison, augmentation de la dégradation non-métabolique du ROL et RAL cytoplasmiques, augmentation de la synthèse des CYP et du catabolisme de l'AR) menant ainsi à une harmonisation des besoins par diminution des quantités d'AR même en absence des deux protéines CRABP, chose qui n'aura pas eu le temps de se concrétiser dans la nature .

Bien que non-essentielle pour la reproduction des animaux ayant à leur disposition une diète suffisante en vitamine A, la CRABP I semble néanmoins influencer les dépôts des retinyl-esters (RE) et le turn-over du ROL en conditions de pénurie alimentaire de vitamine A (Budhu A. et al. 2001) (Ghyselinck et al. 1999) ; Clagett-Dame et DeLuca, 2002). Des études montrent que l'expression de la CRABP-II augmente l'activité transcriptionnelle des RAR (Dong et al. 1999) ; Budhu et al. 2001). Il a été démontré qu'en l'absence du ligand (AR) la CRABP-II reste localisée prédominant dans le cytoplasme, mais elle répond lors de la synthèse cytoplasmique d'AR, en le liant et se transportant (translocation) ensemble avec l'AR dans le noyau, où elle peut s'associer directement avec le récepteur nucléaire RAR, lui présentant l'AR qui joue ainsi son rôle de ligand nucléaire aussi (Bastie et al. 2001, Delva et al. 1999); (Budhu AS and Noy 2002a). Très important, le complexe CRABP-II-RAR contrôle et stabilise le cheminement (channeling) du ligand (AR), de la CRABP-II vers le RAR, facilitant ainsi la ligation de l'AR a l'RAR et par conséquent un meilleur contrôle de l'activité transcriptionnelle subséquente (Dong et al. 1999 ; Delva et al. 1999 ; Budhu et al. 2001 ; Budhu and Noy, 2002 ; Blomhoff 2006).

On a aussi remarqué une association intéressante et spécifique de la CRABP-I avec les mitochondries (Ruff and Ong 2000) alors qu'auparavant on considérait que les mitochondries n'ont aucun rôle dans le métabolisme ou la fonction de l'AR. On a vu que les cellules exprimant la CRABP-I ont une capacité accrue à dégrader l'AR (Boylan and Gudas, 1991,1992) et l'AR lié à la CRABP-I est encore plus accessible à l'oxydation par le cytochrome microsomale P450s (nommé aussi P450RA1 ou CYP26A1) provenant des microsomes membranaires du Réticule Endoplasmique (Fiorella and Napoli 1994); Ruff and Ong 2000). Cependant et bien qu'il ait été démontré que l'expression des CYP26 est inductible par l'AR qui lui sert ensuite de substrat (White et al. 1996), (White et al. 1997) ce cytochrome n'est pas présent dans les testicules de souris, qui contiennent pourtant de la CRABP-I, mais il est présent dans le foie de souris, organe qui ne contient pas, lui, de la CRABP-I (Ray et al. 1997). Un deuxième cytochrome microsomale P450 murin qui catabolise l'AR (CYP26B1) a aussi été décrit mais son expression est aussi limitée au foie adulte (Fujii et al. 1997). Le rôle primaire des CRABP-I étant de lier l'AR, leurs présences dans la mitochondrie impliquent logiquement une participation mitochondriale dans le métabolisme de l'AR pour ces cellules qui expriment le CRABP-I.

En 1973 il a été proposé que le mécanisme d'action de l'AR, puisse être similaire avec celui des hormones stéroïdiennes (Bashor et al. 1973). Ceci a été confirmé depuis par la découverte des protéines-récepteurs nucléaires d'AR (RAR et RXR). Par extension analogique, puisque le premier pas dans l'inactivation du calcitriol (vitamine D3) est une hydroxylation mitochondriale, il est aussi possible que la CRABP-I facilite le passage de l'AR ou de ses dérivés dans la mitochondrie pour des réactions ultérieures. Reste à déterminer les compartiments ciblés dans la mitochondrie par la CRBP-I ainsi que son rôle exacte dans des éventuelles réactions mitochondriales impliquant la gestion de l'AR (Ruff and Ong 2000). Serait-il possible que le premier pas (C18-hydroxylation) observé dans le catabolisme microsomal habituel de l'AR par les CYPs (dans les microsomes de la membrane du Réticule Endoplasmique) (Fiorella and Napoli 1994), puisse être aussi accompli par une hydroxylation catabolique mitochondriale d'AR transféré dans la mitochondrie par la CRABP-I, en tant que mécanisme complémentaire/compensatoire du catabolisme microsomal, sous certaines conditions ?

En conclusion, les deux isoformes de CRABP (I et II) sont des récepteurs cytosoliques pour l'AR importants, qui remplissent plusieurs fonctions communes mais aussi spécifiques dans le métabolisme de l'AR, parmi lesquelles : stabilisation et protection de l'AR contre l'oxydation, la dégradation et/ou l'isomérisation hâtive non-métabolique, solubilisation de l'AR, régulation du métabolisme de l'AR (Boylan 1992 ; Fiorella 1994), régulation de l'accès de l'AR à des compartiments cellulaires divers (noyau, mitochondries, microsomes de la membrane du Réticule Endoplasmatique) (Ong 1994) ; (Gustafson et al. 1996); (Gaub et al. 1998) ; Ruff 2000 ; Clagett-Dame and DeLuca 2002 ), co-activateurs pour les récepteurs nucléaires d'AR( RAR et RXR) (Delva 1999 ; Dong 1999 ; Clagett-Dame and DeLuca 2002 ), etc. Les deux protéines CRABP (I et II) sont abondamment exprimées dans l'embryogénèse, cependant pas dans les mêmes types de cellules (Maden 1994) ; Blomhoff 2006). Le (Tableau 1, p.32) donne une synthèse de quelques caractéristiques des CRABP (I et II) et des autres protéines de liaison aux rétinoïdes présentées dans ce sous-chapitre.

Protéine	Famille	Masse moléculaire (kDa)	Ligand	Fonctions physiologiques
RBP	lipocaline	21.0	ROL	- transporteur du ROL
CRBP-I	iLBP	15.0	ROL	- holo-CRBP substrat pour LRAT - apo-CRBP stimule REH et inhibe LRAT
CRBP-II	iLBP	15.0	ROL RAL	- holo-CRBP substrat pour LRAT et RAL réductase
CRABP-I	iLBP	14.0	AR	- holo-CRABP substrat pour le métabolisme de l'AR - séquestre l'AR
CRABP-II	iLBP	14.0	AR	- ibidem que CRABP-I mais avec une affinité différente pour l'AR

**Tableau 1.** Descriptions et fonctions de principales protéines de liaison aux rétinoïdes (Noy, 2000)

#### 4.) METABOLISME INTRA- CELLULES CIBLES DE LA VITAMINE A

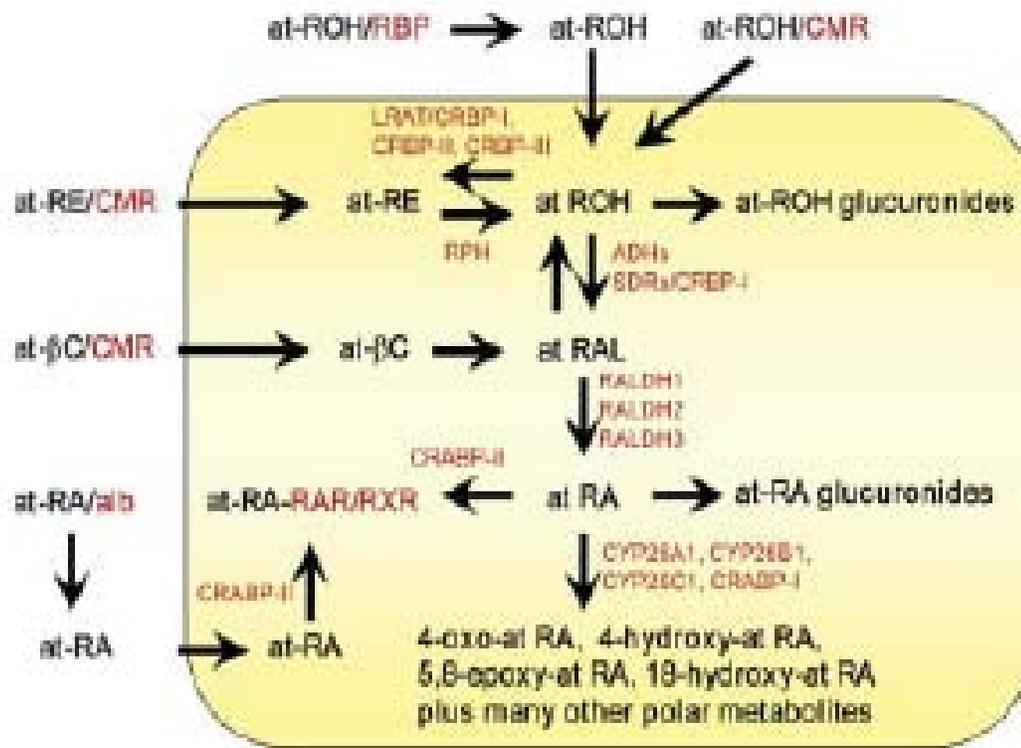


Figure 10. Voies métaboliques des rétinoïdes intra-cellules cibles non-visuelles (Blomhoff and Blomhoff, 2006)

#### 4.1. L'ACIDE RETINOÏQUE (AR) - FORME ACTIVE DE LA VIT.A

##### 4.1.1 Fonctions générales de l'acide rétinoïque

L'AR est une petite molécule hormonale lipotrope/ file avec un poids moléculaire de 300Da, qui est aussi partiellement soluble autant dans les fluides intra et extra cellulaires (Napoli/Livrea 2000;Blomhoff, 2006). En tant que morphogène (Eichele and Thaller 1987, Thaller and Eichele);Clagett-Dame and DeLuca, 2002) la distribution tissulaire de l'AR est strictement contrôlée durant l'organogénèse intra-utérine et le développement post-natal et gérée par l'expression des enzymes impliquées dans la synthèse et le catabolisme de l'AR. L'AR est un morphogène et un puissant modulateur de la formation des axes embryonnaire et du maintien du phénotype des tissus épithéliaux ainsi qu'un important immuno-modulateur chez l'adulte (Morriss-Kay and Sokolova 1996); Creech Kraft/Livrea, 2000; Blomhoff 2006).

L'AR est la forme active principale de la vitamine A qui régule l'expression des gènes en tant que ligand des récepteurs nucléaires spécifiques, les RARs et RXRs. Il peut moduler l'expression génique par l'activation ou la répression de la transcription de gènes (Guidez and Zelent/Livrea 2000, Blomhoff et Blomhoff 2006, (Davidovici et al. 2007). Il contrôle ainsi des gènes impliqués dans sa propre autorégulation par feed-back dans la chaîne métabolique, des gènes impliqués dans l'embryogénèse et le développement rénal (Clagett-Dame et DeLuca 2002, Creech Kraft/Livrea 2000; (Makrakis et al. 2007), Bhat et Manolescu 2008 ) ou différents gènes comme PPAR (Ziouzenkova and Plutzky 2008, Ziouzenkova et al. 2007) et *Hox* ((Niederreither et al. 1999a) etc. Un excès ou une déficience en AR sont toxiques surtout pour l'embryon et plusieurs pathologies y sont associées (calcification des tissus mous, toxicité et xérophtalmie, immunodéficience, etc.) d'où l'importance d'un bon équilibre d'AR in-vivo (Collins and Mao 1999). La concentration d'AR dans les tissus cibles est donc hautement contrôlée via l'expression des enzymes de la synthèse et du catabolisme de l'AR (Petkovich PM 2001); Napoli/Livrea 2000; Clagett-Dame and DeLuca 2002 ; Blomhoff 2006). **(Fig.10, p.33)**

L'isomère tout-*trans* de l'AR est un des ligands pour les récepteurs nucléaires RARs et le 9-*cis* AR est un ligand pour les RARs et aussi pour les RXRs. L'action biologique de ces isomères d'AR se manifeste par leur liaison-activation des récepteurs nucléaires RAR/RXR, qui stimulent les éléments de réponse à l'AR (RARE) se trouvant sur les promoteurs des gènes et contrôlent ainsi la transcription (répression ou expression) protéique des gènes cibles. Les rétinoïdes contrôlent d'abord l'embryogénèse et ensuite les processus de prolifération, différenciation cellulaire et de l'apoptose par la régulation des gènes chez les vertébrés depuis l'embryogénèse jusqu'à la mort (Napoli 1996). Le 13-*cisRA* (isotrétionine) naturellement retrouvé chez les Eucaryotes, dans le sang et les tissus humains (Blaner 2001), n'ayant pas la capacité d'influencer l'activité des gènes, est utilisé comme agent dermatologique pour soigner le psoriasis et l'acné sévère (Thielitz et al. 2008). Étant donné que l'AR est nécessaire au maintien du taux normal des lymphocytes T et B (Kim 2008), la vitamine A est très importante pour le système immunitaire. Directement ou indirectement (par son rôle sur la synthèse protéique) la vitamine A est nécessaire à la régénération des tissus épithéliaux et au fonctionnement des organes (Maden 2004, Niles 2003, Spinella et al. 2003), du cerveau (Luo et al. 2009), etc. L'AR est utile dans le traitement contre certains cancers (leucémie, peau, sein, etc.) (Moise et al. 2007).

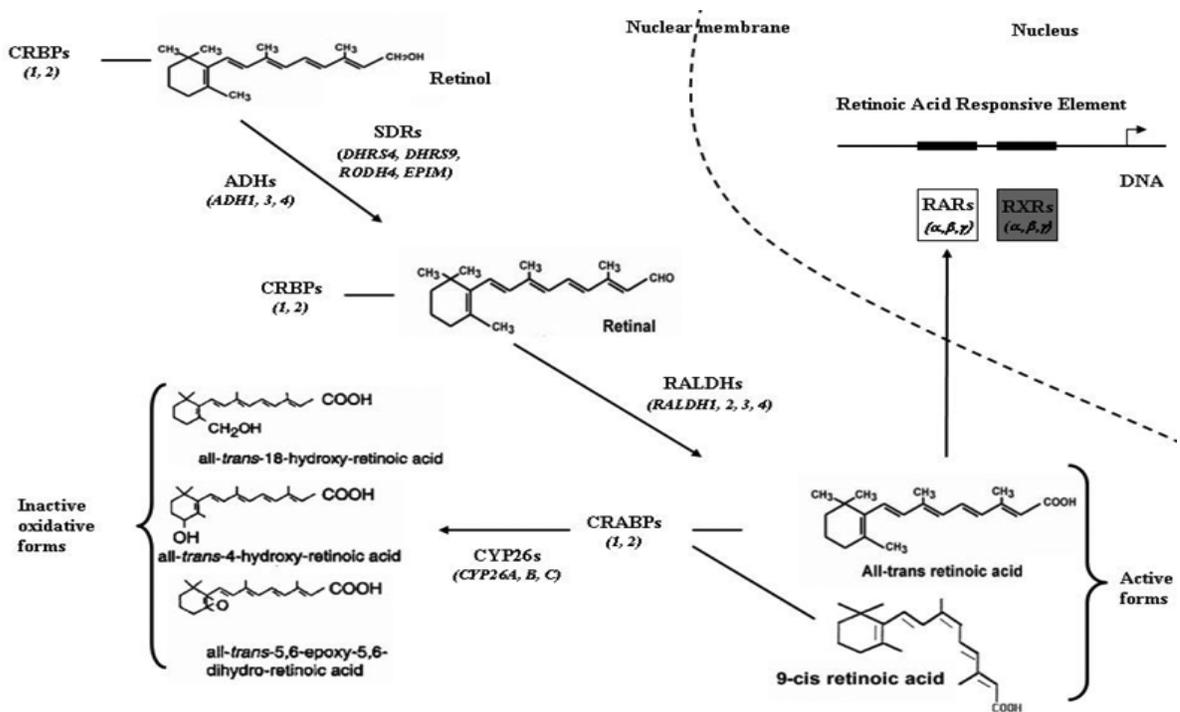
Ainsi l'at-RA remplit toutes les fonctions endocrines connues pour les rétinoïdes, principalement par l'activation de trois récepteurs nucléaires RAR -  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  (Glass et al. 1997) ; (Renaud and Moras 2000). Son isomère 9cRA contrôle les récepteurs nucléaires distincts RXR -  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ , récepteurs qui influencent par hétérodimérisation les fonctions d'autres récepteurs nucléaires (ex. RAR -  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ , VDR, PPAR  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ , etc.). Ces hétérodimères formés avec RXR par ces autres récepteurs nucléaires ci-haut mentionnés, semblent pouvoir être activés au maximum et fonctionner seulement avec le ligand spécifique pour le récepteur non-RXR du tandem (atRA, hormone thyroïdienne, EPA, DHA, etc.), à condition que ce ligand soit présent en concentration suffisante. Toutefois quand les concentrations de ce ligand tombent sous leur niveau suffisant pour être efficaces à activer à eux seuls le hétérodimer formé par leur récepteur nucléaire avec le RXR, c'est le 9cis-RA qui semble compenser ce manque, en ce sens que par son action spécifique sur le RXR, il permet au hétérodimer en question de fonctionner efficacement quand-même. De plus d'autres ligands nucléaires que le 9-cis sont capables d'activer les récepteurs nucléaires RXR (ex. acid phytanic, eicosanoïdes et docosahexanoic acid (Eager et al. 1992) ; (Kitareewan et al. 1996) ; (de Urquiza et al. 2000) ; Blomhoff 2006).

Certaines études suggèrent que le 9cRA et ses analogues pourraient influencer la progression de certaines maladies métaboliques (ex. diabète de type 2) (Nagpal and Chandraratna 2000) et que tous ces effets de 9cRa dans des processus métaboliques, attestent de sa biogénèse contrôlée *in-vivo* (Napoli/Livrea 2000). L'AR possède également des activités non-génomiques *in-vivo* (Blomhoff 2006) qui modulent l'activité de certaines enzymes (ex. PKC $\alpha$ -protéine kinase C)(Radomska-Pandya et al. 2000, Ochoa et al. 2003), stimulent le turnover de certains neurotransmetteurs (acétylcholine dans les synapses neuronales en formation)(Liao et al. 2004) ou encore bloquent la Ca<sup>2+</sup>-ATPase (calcium-magnésium-dépendant adénosine triphosphates) par compétition avec les activateurs thyroïdiens T3 et T4 (thyroxine) (Nutrition Reviews 1989 ; Blomhoff 2006).

#### 4.1.2 Synthèse biologique de l'acide rétinoïque

L'acide rétinoïque est le résultat de 2 oxydations successives de la vitamine A (**Fig.10, p.33 et Fig.11, p.36**). La première oxydation est réversible et transforme le ROL en RAL par l'action d'une ROL-deshydrogénase cytosolique ou microsomale (Duyster

1996),2000 ; Clamgett-Dame and DeLuca 2002). La deuxième oxydation ( par une RAL-deshydrogénase cytosolique ) est irréversible et transforme le RAL en AR (Labrèque, Bhat et al.1995 ; (Duester 2000) ; Blomhoff 2006). De plus l'AR peut être synthétisé directement a partir du  $\beta$ -Carotène c'est-à-dire sans oxydation préalable du  $\beta$ -Carotène en RAL et ROL (Napoli and Race 1988) ;(Hébuterne et al. 1995) dans des organes tels que l'intestin, le foie, les reins et les poumons. Il y aurait ainsi une voie métabolique mineure de production directe d'AR associée avec l'oxydation mitochondriale directe (Wang XD and Krinsky 1997) (donc sans l'intermédiaire RAL) des produits du clivage asymétrique du  **$\beta$ -carotène** soit ( $\beta$ -apocaroténals et  $\beta$ -apo-carotenoic acids) (Krinsky and Mayne/Livrea, 2000). Les réactions dans l'ensemble de cette voie mineure directe seraient analogues avec le processus de  $\beta$  - oxydation mitochondriale des acides gras (Wang X-D, Russel RM, 1996). Donc le  $\beta$ -Carotène et autres caroténoïdes peuvent être une source directe d'AR, particulièrement chez les espèces qui, comme les humains, peuvent accumuler de grandes quantités de caroténoïdes ( parfois à en devenir légèrement roses ) dans leurs tissus (adipeux, tégumentaires, etc.)



**Figure 11** : Biosynthèse et métabolisme intracellulaire de l'AR (Nezzar et al. 2007)

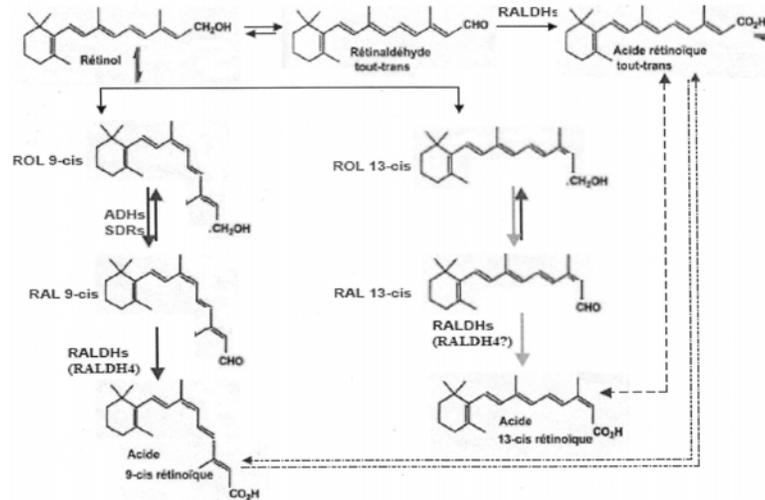
Parmi les isomères des rétinoïdes (**Fig.1, p.4 ; Fig.11, p.36**), ceux tout-*trans* AR sont des ligands pour les récepteurs nucléaires RARs alors que le 9-*cis* AR est un ligand pour les RARs et aussi pour les RXRs. L'action biologique de ces isomères d'AR se manifeste par leur liaison-activation des récepteurs nucléaires RAR/RXR, qui stimulent ensuite les éléments de réponse à l'AR (RARE) se trouvant sur les promoteurs des gènes et contrôlent ainsi la régulation de l'activité transcriptionnelle par la répression ou par l'expression protéique des gènes cibles. Bien que la présence fonctionnelle *in vivo* de l'isomère AR 9-*cis* a déjà été mise en doute par une étude sur des embryons murins qui n'a pas détecté d'AR 9-*cis in vivo* (Horton and Maden 1995), d'autres recherches ont démontré la présence d'AR 9-*cis* pouvant se lier au récepteur RXR dans les reins et le foie des souris adultes (Heyman et al. 1992). Les auteurs de cette étude avancent que l'AR 9-*cis* trouvé dans ces organes, proviendrait de l'isomérisation de l'AR tout-*trans*.

Des études orientées d'isomérisation ont indiqué que l'AR tout-*trans* peut, en effet, donner des isomères 9-*cis* et 13-*cis* par une simple réaction chimique de type mercaptan-dépendante (thiol C-SH). Ainsi, cette isomérisation ne serait pas due à l'action d'une isomérase enzymatique spécifique (Urbach and Rando 1994). D'autres recherches avancent l'hypothèse qu'une telle isomérisation de *at-AR*, non contrôlée enzymatiquement sur une voie métabolique, ne semble pas s'intégrer dans les modèles métaboliques de gestion précise des rétinoïdes *in-vivo* que nous connaissons (Liu et al. 1996); (Sass et al. 1999); (Brodeur et al. 2003) et considèrent que plusieurs enzymes sont capables de catalyser l'oxydation des isomères 9-*cis* et 13-*cis* du ROL et du RAL vers des isomères 9-*cis* et 13-*cis* du RA respectivement (Duester 2000) ce qui permettrait (du moins en théorie) qu'une voie de synthèse de ces isomères soit possible *in vivo*. Une activation spécifique des RXR a été rapportée (Solomin et al. 1998) dans des régions spécifiques de la moelle épinière des embryons de souris (11-12 dpc) mais des recherches sur ces embryons avec une méthode HPLC ultra-sensible, n'ont toujours pas trouvé du 9-*cis*/RA dans ces tissus (Sakhi et al. 1998); (Ulven et al. 2001); (Blumhoff 2006) mais seulement du *at-RA*. Pas plus que Schmidt et al. 2003 et Kane MA et al. 2005. D'autres études, suggèrent la présence d'une isomérase qui transforme l'ER tout-*trans* en ROL 9-*cis*, avant la première oxydation sur l'axe de synthèse de l'AR. (Lidén and Eriksson 2005). L'AR 13-*cis* paraît dans le plasma humain (Eckhoff and Nau 1990) en tant que forme de réserve qui peut s'isomériser en AR tout-*trans* au besoin (Armstrong et al. 2005).

Tous les effets observés en cas d'excès d'AR 13-*cis* ne sont pas intégralement dus à une isomérisation intégrale en tout-*trans* RA. L'isomère 13-*cis*, bien qu'incapable d'influencer les gènes en liant les RAR/RXR, à d'autres fonctions (permettre une meilleure hydratation de la peau etc.) (Nau 2001 ; (Thielitz et al. 2008). Ainsi plusieurs recherches montrent que les AR 9-*cis* et 13-*cis* sont actifs biologiquement (Blaner 2001 ; Gottardis et al.1996). Il est donc envisageable que des voies de biosynthèse existent pour ces isomères comme pour l'AR tout-*trans*, par oxydation sur les axes spécifiques de leurs iso-rétinoïdes prédécesseurs (9-*cis* et 13-*cis* ROL et 9-*cis* et 13-*cis* RAL), (**Fig.12,p.39**). Un argument dans ce sens, serait l'existence des enzymes spécifiques pour des isomères 9-*cis* de rétinoides sur des palières métaboliques préalables au 9-*cis*/RA (CRAD3-une SDR préférentielle pour le 9-*cis* ROL et RALDH4 préférentielle pour 9-*cis* RAL) (Lin et Napoli 2003 ; Sima A. et Bhat, 2009(en publication). Mais le 9-*cis*/RA *in vivo* reste difficile à isoler, peut-être parce qu'il est très instable (donc se dégrade ou il s'isomérisse vite en at-RA), ou il est produit en quantités actives biologiquement (1nM) uniquement dans des régions isolées, ou que des concentrations HPLC enregistrables sont présentes uniquement de façon rapide et transitoire.

Des études on aussi montré qu'un traitement avec du 9-*cis* RA, engendre une surexpression du cytochrome Cyp26A1 encore plus abondante que celle induite par les mêmes doses de at-RA (Luot et Sakai, 2006), ce qui laisse penser que le 9-*cis* RA puisse être catabolisé plus rapidement que le at-Ra *in vivo*. La présence du 9-*cis*/RA *in vivo*, hors de tout doute, a été démontrée chez l'humain lors de l'administration de grandes quantités de suppléments de ROL (100mg ROL, ce qui veut dire 100 fois plus la dosé recommandée/jour dans la diète)(Arnhold et al. 1996) et chez la souris lors d'administration des doses toxique d'AR-at (Ulven et al 2001 ; Schmidt et al 2003). Il est donc claire que la toxicité et la tératogénicité de la Vit. A en grandes quantités sont dues (du moins en partie) à la génération trop abondante du 9-*cis* RA qui engendre ensuite une activation anormale de plusieurs gènes contrôles par couplage de leurs éléments RARE avec des dimères RAR-RXR ou RXR-RXR. Quoi qu'il en soit il est bien documenté que l'expression du RXR par voie de signalisation spécifique existe *in-vivo* et bien qu'on sait que le 9-*cis* RA pourrait l'activer (Blaner, 2001) cette activation peut aussi être opérée soit via des hétérodimères RAR-RXR, soit via des homodimères RXR-RXR ou des hétérodimères RXR avec d'autres récepteurs nucléaires (RXR-PPAR). Il est aussi possible que d'autres ligands nucléaires que

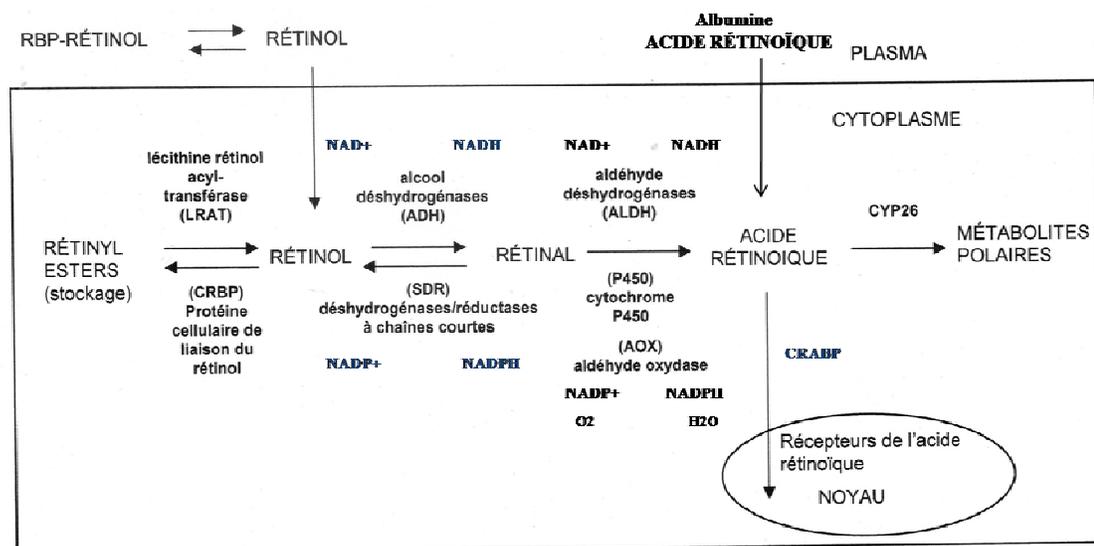
le 9-cis soient capables d'activer les récepteurs nucléaires RXR (ex. acid phytanic, eicosanoïdes et docosahexanoic acid ( Eager et al 1992 ; Kitareewan et al 1996 ; de Urquiza et al 2000 ; Blomhoff 2006)



**Figure 12.** Possible modèle de biosynthèse directe et relationnelle des isomères de l'AR (Labo Dr. Pangala V.Bhat / Sima A. 2008, adapté d'après Blaner 2001)

#### 4.2 ENZYMOLOGIE DANS LA BIOSYNTHESE DE L'ACIDE RETINOÏQUE

Plusieurs familles enzymatiques catalysent les oxydations métaboliques des rétinoïdes (ROL, RAL) ( Fig.13,p.39) qui mènent à la production d'AR à partir du ROL. Ces enzymes originent des gènes ancestraux communs et leur conservation évolutive interspécifique confirme leur importance dans le métabolisme des rétinoïdes.



**Figure 13.** Étapes enzymatiques impliquées dans la biosynthèse de l'AR à partir du Rétinol (Labo Dr. Pangala V.Bhat / Manolescu D. 2009, adapté d'après Duester et al. 1996)

#### 4.2.1 Les alcool déshydrogénases a chaîne moyenne (MDR-ADH) - Oxydation du ROL

La superfamille enzymatique MDR (medium-chain déshydrogénase/réductases) est divisée en 8 familles et possède approx. 350 sous-unités résiduelles. Elle contient les alcool-déshydrogénases classiques du foie (ADH), les quinone-réductases, les leukotrienes-B4-déshydrogénases, etc. (Bairoch 2005 ; Persson 2008). Appartiennent à la superfamille des MDR, les ADHs sont des enzymes cytosoliques de type Zn-métalloprotéine, avec une sous-unité d'environ 40 kDa (Duester, 2000) et présentent 5 Classes différentes chez l'humain, résultant des duplications génétiques successives sur l'axe évolutif des vertébrés (la première il y a 500 millions d'années) d'une lignée ancestrale commune de formaldéhyde déshydrogénase. Comme beaucoup des duplications ancestrales, ces duplications enzymatiques correspondent avec l'enzymogénèse engendrée par les nouvelles activités du vivant, comme par exemple à l'époque de l'émergence des vertébrés terrestres à partir des poissons ostéichthyens (Cederlund 1991 ; Persson 2008).

Généralement les alcools déshydrogénases (ADH) sont responsables de l'oxydation NAD-dépendante d'alcools en leurs aldéhydes (Ex. l'éthanol en acétaldéhyde ou plus spécifiquement dans le métabolisme des rétinoïdes, le ROL en RAL). En sens inverse, ces enzymes ADH peuvent également catalyser une réduction (toujours NADH-dépendante) des aldéhydes en leurs alcools, donc du RAL en ROL, puisque l'on sait que la première étape d'oxydation sur l'axe métabolique (RA) des rétinoïdes est une étape réversible (Napoli/Livrea 2000 ; Clagett-Dame et DeLuca2002 ; Blomhoff 2006). Par contre, dans certains situations physiologiques restrictives (ratio NAD/NADH approx = 1000), seulement l'étape d'oxydation est fonctionnelle (Veech 1969). Les enzymes dépendantes du cofacteur NAD(H) ont, *in vivo*, une tendance d'oxydation plus accentuée, alors que les enzymes NADP(H) dépendantes qui catalysent des réactions de réduction *in vivo* (Duester 2000). La famille des ADHs se divise en huit classes chez les vertébrés. Les premières classes ADH 1 à 7 sont NAD(H)-dépendantes. La classe 8 est NADP(H)-dépendante (Duester 2001 ; Persson 2008). Ces différentes classes de la famille ADH comprennent plusieurs variantes géniques, selon les espèces. Par exemple chez l'humain la classe ADH1 présente trois isoformes géniques : ADH1A, ADH1B et ADH1C. L'ADH1 a été la première enzyme des ADH, prouvée pouvoir oxyder le ROL en RAL (Duester 2000).

Pendant une longue période, les scientifiques ont considéré que l'oxydation du ROL en RAL devrait être spécifique aux cellules présentant de l'acide rétinoïque (AR). Des expériences sur des souris transgéniques KO pour les gènes ADH1, ADH3 et ADH4 (Deltour et al. 1999) ont permis d'expliquer leur action dans la biosynthèse et le métabolisme de l'AR. L'ADH3 est exprimée dans presque tous les tissus alors que les ADH1 et 4 sont exprimés plus spécifiquement et uniquement dans certains tissus. L'ADH 4 est la plus efficace dans le rôle catalyseur de l'oxydation du ROL en RAL et présente une affinité pour les isomères type *cis*-ROL (Deltour 1999a). Son expression spatiotemporelle coïncide avec la distribution de l'acide rétinoïque dans l'embryon, suggérant son implication *in vivo* dans la production de RAL sur l'axe métabolique de production d'AR dans l'embryon (Deltour 1999a ; Creech Kraft/Livrea 2000 ; Clagett-Dame et DeLuca 2002). L'ADH1 peut catalyser avec moindre efficacité qu'ADH4 l'oxydation du ROL et présente une affinité pour le *trans*-ROL. (Deltour& al, 1999b).

Les **souris** transgéniques KO pour les gènes ADH1 et ADH4 sont normales et fertiles (Deltour et al, 1999b). Toutefois la quantité d'AR produit chez ces souris KO était plus faible par rapport aux contrôles chez les KO-ADH 4 par rapport aux KO-ADH 1 (Deltour et al, 1999b). La survie des KO-ADH3 est réduite et elles présentent des défauts de croissance qui peuvent être améliorées par administration d'un supplément alimentaire de ROL (Duester et all 2003). Autre son rôle connu dans l'oxydation du formaldéhyde, les études des **souris** transgéniques KO-ADH3 ont révélé l'implication de l'ADH3 dans le métabolisme de l'AR (Molotkov et al., 2002b). Son expression coïncide aussi avec la présence de ROL et la synthèse de l'AR dans une large variété de tissus. Des expériences sur un modèle murin transgénique double-KO (ADH1/ADH4) simultanément, montrent qu'ADH1 et ADH4 ont aussi des fonctions spécifiques (Molotkov et al., 2002a). Ainsi ADH1 empêche la toxicité du ROL en excès en l'oxydant vers RAL sur un axe métabolique (Molotkov et coll, 2002a) qui implique ensuite une oxydation par RALDH1 et son élimination rapide (Molotkov et Duester, 2003). ADH4 serait plus active lors de situations d'hypovitaminose A et ce pour protéger l'embryogenèse et subvenir à ses besoins en AR. (Molotkov et al., 2002a). En bref, toutes ces trois ADHs oxydent le ROL mais chacune a son rôle spécifique dans ce processus, dépendamment du contexte exogène lié au gradient de ROL (abondance, suffisance optimale, pénurie) : ADH1 pour éviter la toxicité par accumulation de ROL, ADH3 pour la biosynthèse courante de l'AR, et ADH4 pour

augmenter la biosynthèse d'AR et l'orientée vers l'embryon dans le but d'assurer sa survie et son développement. (Creech Kraft/Livrea 2000 ; Clagett-Dame et DeLuca 2002 ; Blomhoff 2006). En conclusion les ADH sont des enzymes cytosoliques appartenant à la superfamille des MDR (*Cytosolique Medium-Chain Alcohol Dehydrogenases*) et les ADH1, ADH3 et ADH4 sont impliqués dans l'oxydation du at-ROL en at-RAL. (Persson 2008, (Parés et al. 2008). Elles oxydent le at-ROL *in vitro*, l'ADH4 étant en ceci la plus efficace. La survie des souris KO-ADH3 est réduite et elles présentent des défauts de croissance qui peuvent être améliorés par l'administration d'un supplément alimentaire de ROL, alors que l'effet du KO transgénique pour les ADH1 et ADH4 est observable uniquement dans les cas souris soumis à un apport excédentaire de ROL ou déficient en ROL respectivement. L'ADH3 est exprimée de façon ubiquitaire alors que les ADH1 et ADH4 le sont plus spécifiquement. Les ADHs ne semblent pas oxyder le at-ROL lié à la CRBP-I (Duester et al 2003 ; Blomhoff 2006).

#### **4.2.2 Les déshydrogénases/réductases à chaîne courte (SDRs) - Oxydation du ROL**

Les SDR sont des oxydoréductases NAD(P)(H)-dépendantes, microsomales et polyvalentes qui partagent certaines structures et mécanismes d'action (Parés 2008). Cette superfamille possède 350 sous-unités résiduelles et ne présente pas de dépendance métallo (Persson et al. 2009). Les SDR sont essentiels dans les métabolismes des lipides, aminoacides, carbohydrates, cofacteurs, hormones et xénobiotiques ainsi que dans les réactions redox. (Kavanagh et al. 2008). Il y a peu d'identité séquentielle similaire entre les SDRs (approx 15 à 30%) mais la similarité est élevée pour leurs structures tridimensionnelles (Ex. le repliement Rossmann, un feuillet  $\beta$  entouré d'hélices  $\alpha$ , important pour le couplage du cofacteur) (Opperman et al., 2001). La conservation de cet élément et d'un site actif (souvent portant une AA-tétra-séquence Asn-Ser-Tyr-Lys) offre une plateforme d'activité enzymatique pour les oxydoréductases, les épimérasés et lyases. (Kavanagh, 2008). Cette dernière caractéristique est typique et commune aux oxydoréductases (Opperman et al., 2003). Les SDR (superfamille) conservent les six motifs de leur séquence primaire (Opperman et al., 2001). Appelées d'abord « insect-type alcohol dehydrogenase family », ces enzymes sont nommées déshydrogénases/réductases à courte chaîne (short-chain dehydrogenase/reductase family, SDR) en raison de leur activité d'oxydoréductase et de leur courte séquence (Napoli/Livrea 2000 ; Opperman et al., 2001 ; Kavanagh 2008).

Dans la Nature, il existe plusieurs centaines de SDRs distribuées à travers plusieurs espèces vivantes (Opperman et al., 2003). Chez les animaux il y a plus de 50 enzymes de la superfamille SDR qui contrôlent l'activité des prostanoides, stéroïdes et rétinoïdes (Bailey 1997 ; Jörnvall 1995). Les SDR partagent des séquences bien conservées d'AA pour des sites de liaison de leurs cofacteurs, de résidus catalytiques et des structures tertiaires mais elles ont très peu des résidus parfaitement conservés. Les SDR sont multifonctionnelles ; chacune pouvant catalyser le métabolisme de plusieurs substrats .Ces enzymes activent dans le cycle de la vue, génèrent des facteurs rétinoïques de type endocrine (atRA et 9cisRA) ou réactivent le 3-adiol en DHT (Napoli 2000, 2001).Une sous-famille SDR (3 $\alpha$ -HSD), qui partage plusieurs proches séquences d'AA, catalyse soit le at- soit le cis-ROL et la déshydrogénation des androgènes. Les SDRs comprennent 250-350 résidus dont les extrémités N- et C-terminales jouent un rôle, des signaux peptidiques, des domaines transmembranaires, où elles sont impliquées dans la formation de complexes multi-enzymes. Ces enzymes appartiennent à des groupes diverses (ex. oxydoréductases, lyases, isomérases) (Filling, 2002 ; Kavanagh, 2008). Elles sont majoritairement des oxydoréductases NAD(P) (H)-dépendantes pour les alcools ROL (réaction réversible).

Les SDRs capables de catalyser ainsi l'oxydation du ROL vers RAL sont le rétinol-déshydrogénases (RDHs). Les enzymes microsomales RDH1, RDH2, RDH3, RDH4, RDH5, RDH10, RDH11-14, CRAD1 (*cis*-retinol/3 $\alpha$ -hydroxysterol short-chain dehydrogenase), CRAD2, CRAD3 et retSDR1 oxydent le ROL en RAL, *in vitro*, mais préfèrent, dans certains cas, des stéroïdes (Duester 2000 ; 2003). CRAD3 (*cis*-rétinoïde/androgène déshydrogénase, type 3) semble catalyser la première étape pas dans la biosynthèse du 9cisRA (oxydation du 9cisROL en 9cisRAL). CRAD3 partage des séquences similaires d'AA avec d'autres rétinoïdes/stéroïdes déshydrogénases réductases à chaîne courte (CRAD1, CRAD2, et RDH4). Comparativement avec la CRAD1, l'enzyme CRAD3 reconnaît mieux le 9cisROL vis-à-vis d'atROL mais elle possède une moindre efficacité en tant que androgène déshydrogénase. La CRAD3 possède une efficacité apparente (V/Km) pour 9cisROL presque égale avec celle de la CRAD1 mais 3X plus grande que celle du RDH4. CRAD2 ne reconnaît pas le 9cis ROL comme substrat. CRAD3 (en collaboration subséquente avec RALDH1/AHD2, RALDH2 et ALDH12 (équivalent *homo* de RALDH4 *mus*) qui oxydent le 9cisRAL), contribue à la production de 9cisRA dans des cellules humaines intactes.

Le foie et les reins, deux tissus avec les plus grandes concentrations de rétinoïdes iso-9cis, présentent la plus intense expression d'ARNm de CRAD3. CRAD3 est aussi exprimée dans les testicules, l'intestin grêle, le cœur et le cerveau. (Zhuang et Napoli 2002). RDH5 et CRAD1 se trouvent liées, par deux hélices (en N-terminal et en C-terminal), au bord du réticulum endoplasmique (RE), avec la partie catalytique de l'enzyme retrouvée dans la lumière du RE et c une terminaison (appendice) cytosolique de six à sept nucléotides qui sort dans la cytoplasme (Lidén et al., 2003). Cette appendice cytoplasmique explique leur l'activité enzymatique *in vivo* (Tryggvason et al., 2001). RDH1 catalyse le tout-*trans* ROL lié au CRBPI en at-RAL sur la voie de atAR mais elle semble plus impliquée plus dans le métabolisme des androgènes selon son efficacité plus grande pour l'oxydation des hydroxystéroïdes (Duester, 2000). RDH2 est impliquée dans la réduction NADPH-dépendante du RAL en présence du cytochrome P450 CYP2D1 (Imaoka et al., 1998 ; Napoli 2000). Étant exprimés principalement dans le foie, les RDH2 semblent importantes pour la réduction du RAL en ROL dans le processus d'estérification pour stockage hépatique du ROL (Ross et al., 2000 ; Napoli/Livrea 2000 ; Kavanagh 2008). Les trois enzymes CRADs 1,2,3 sont capables d'oxyder le ROL *in vitro* mais préfèrent, dans certains cas, des stéroïdes (Duester et col. 2000 ; 2003). La retSDR1 est exprimée dans la rétine et préfère le NADP/NADPH comme cofacteur. Elle réduit le tout-*trans* RAL en tout-*trans* ROL ce qui indique sa possible implication dans la régénération du tout-*trans* ROL dans le cycle visuel (Haeseleer et al., 1998 ; Crouch et Ma/Livrea 2000). RDH5, RDH11 et RDH12 sont les enzymes connues pour oxyder *in vivo* le ROL dans le cycle visuel, avec une préférence pour les isomères *cis* (Driessen et al., 2000 ; Kim et al., 2005).

En conclusion les enzymes de la famille SDR (Membrane-Bound Short-Chain Dehydrogenase/Reductases) sont des enzymes microsomaux capables de catalyser l'oxydation du ROL en RAL (Napoli/Livrea 2000 ; Duester et al. 2003 ; Blomhoff 2006, Parés 2008). Les RDH1, RDH5, RDH11, CRAD1, CRAD2, CRAD3 et retSDR1 font partie de ces enzymes. CRAD3 (en collaboration subséquente avec RALDH1/AHD2, RALDH2 et ALDH12 (équivalent *homo* de RALDH4 *mus*) qui oxydent le 9cisRAL), contribue à la production de 9cisRA dans des cellules humaines intactes. Les SDRs utilisent souvent comme substrat le atROL lié à la CRBP-I et sont exprimées dans plusieurs types de cellules sensibles à la vitamine A, qui expriment aussi la CRBP-I. La CRBP-I fonctionne comme un chaperon pour le ROL et le RAL et améliore l'efficacité des réactions redox en

présentant ces rétinoïdes à leurs enzymes sur divers axes métaboliques des rétinoïdes (Everts et al 2005 ; Kavanagh, 2008).

#### **4.2.3 Les aldéhydes déshydrogénases (ALDH) - Oxydation du Rétinal (RAL) en AR**

Ces enzymes ont la capacité d'oxyder le RAL en AR. Les aldéhydes déshydrogénases (ALDH) sont des oxydoréductases, qui catalysent de façon irréversible (et dépendante de leur co-facteur NAD<sup>+</sup> ou du NADP), l'oxydation des aldéhydes en leurs acides carboxyliques correspondants, (Yoshida et al., 1998 ; Napoli/Livrea 2000 ; Blomhoff 2006). Elles font partie d'une superfamille de plus de 555 membres largement présents dans la nature, des bactéries à l'humain (Yoshida et al. 1998, Sophos et Vasiliou, 2002 ; Lin et al 2003). Leurs structures se ressemblent mais ces enzymes se différencient par leurs caractéristiques physico-chimiques et enzymatiques, la distribution tissulaire et intracellulaire et leurs activations métaboliques (Haselbecy et al 1999, Napoli 2000 ; Clagett-Dame et DeLuca 2002). Autre leurs rôles physiologiques dans la synthèse de certains acides organiques (Ex. l'AR, l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA), les ALDHs sont très importantes de par leurs rôles métaboliques de détoxification des aldéhydes endogènes et exogènes (Vasiliou et Nerbert, 2005). Les aldéhydes endogènes résultent du métabolisme des protéines, glucides et lipides, des vitamines et des stéroïdes. Les aldéhydes exogènes, proviennent de la transformation métabolique dans l'organisme (parfois incomplète) de diverses molécules chimiques étrangères (ex. polluants environnementaux ; produits pharmaceutiques, produits cosmétiques, colorants, aromatisants et préservatifs alimentaires de synthèse, etc.). La toxicité de ces aldéhydes, résulte de leur haute réactivité en tant que molécules électrophiles, avec les groupes thiols (HS) et les groupes aminés dans l'organisme. Ceci déstabilise l'homéostasie du corps sur divers axes et peut engendrer des inhibitions enzymatiques, erreurs ADN, de la mutagénèse, de la carcinogénèse, etc.

Dans certaines pathologies, certains aldéhydes peuvent néanmoins avoir aussi des effets thérapeutiques (Vasiliou and Nebert 2005). Dans l'évolution les gènes ALDH humains dérivent de 4 gènes ancestraux qui existaient déjà chez les bactéries primitives et se sont différencié jusqu'à l'humain (Vasiliou et al.,1999 ;Vasiliou et Nebert, 2005). Chez l'humain, ces gènes ont des longueurs variables (de 11 à 40 kpb) et encodent pour une protéine de près de 500 acides aminés ayant un poids moléculaire d'approximatif 55 kDa.

L'enzyme active est présente comme homodimère ou homotétramère. Les ALDHs sont cataloguées en plusieurs classes (familles), (Ex. ALDH1, ALDH2, ALDH3, ALDH8, ALDH12) d'après leur séquence en acide aminé (Vasiliou et al., 1999 ;2000 ; 2005 ). Les ALDHs de classe 1 (donc de la famille ALDH1) sont des enzymes cytoplasmiques exprimées de façon constitutive ou induite et distribuées dans différents tissus (ex. cerveau, globules rouges, etc.). Elles catalysent l'oxydation d'aldéhydes aliphatiques. A titre d'exemple, les *rétinaldéhydes déshydrogénases* (RALDH) capables d'oxyder le RAL en AR, sont majoritairement des enzymes de la classe ALDH1.

La famille (classe) ALDH2, présente un seul membre, l'ALDH2 qui est une enzyme mitochondriale exprimée dans divers tissus, mais plus fortement dans le foie (Yoshida et al., 1998). Elle est impliquée dans la tolérance/préférence à l'alcool éthylique car elle est active dans le métabolisme et la détoxification de l'acétaldéhyde dans le foie. Une mutation inhibitrice (down) de son gène est présente dans 50% des populations asiatiques, amérindiennes ou eskimos et chez moins de 10% des caucasiens et méditerranéens. Il s'ensuit que les premiers sont plus vulnérables aux effets aigus et chroniques de l'alcool (Isse et al., 2002).

Les enzymes de la famille ALDH3 (classe 3) sont cytoplasmiques. Elles oxydent des aldéhydes aromatiques et aliphatiques à moyenne et à longue chaîne de carbones (Vasiliou et al., 2000). Dans le monde animal, quatre enzymes RALDH sont connues pour catalyser l'oxydation du RAL vers l'acide rétinoïque (AR), dont trois font partie de la famille (classe) ALDH1 et sont nommées (de type) ALDH1A1 (RALDH1), ALDH1A2 (RALDH2), ALDH1A3 (RALDH3) et la quatrième fait partie de la famille (classe) ALDH8 et se nomme de type ALDH8A1 (RALDH4). Chez l'humain une enzyme ALDH12 est analogue à cette dernière.

Ces enzymes se différencient aussi par : leurs distributions tissulaires et intracellulaires (**Tab.2,p.47**), leurs propriétés physico-chimiques, leurs affinités enzymologiques (**Tab.3,p.47**), leurs expressions spatio-temporelles (HSU et al.2000) et leur biologie spécifique. Ainsi la RALDH2 s'exprime tôt dans l'embryogénèse, avant les RALDH1, RALDH3 et RALDH4 qui s'expriment plus tard lors de la différenciation des tissus et des organes (Niederreither et al.2002).

Tissu	RALDH1	RALDH2	RALDH3	RALDH4
Cerveau	pré-natale et post-natale	□	pré-natal	
Méninges	+	+	□	
Hypophyse antérieure	□	+	□	
Oeil	rétine, lentille	mésenchyme	rétine	
Nez	épithélia respiratoire et olfactif, (mésenchyme)	mésenchyme	épithélium olfactif, (mésenchyme)	
Dents	incisives	sac dentaire	+	
Cœur	(épicarde), valves	épicarde	□	
Oesophage/Estomac	épithélium et mésenchyme	mésenchyme	□	
Intestins	épithélium, mésenchyme externe	mésenchyme externe	lamina propria	
Poumons	bronches/parenchyme	mésothélium	(bronche/parenchyme)	
Foie	(+)	□	□	+
Reins	(cortex néphrogénique), tubes collecteurs	cortex néphrogénique	+	+
Glande surrénale	cortex interne	□	moëlle	
Prostate/Vésicule séminale	Épithélium	mésenchyme	épithélium	
Muscles squelettiques	□	□	+	
Peau (follicule pileux)	(+)	□	+	

**Tableau 2.** Expression tissulaire des différentes RALDHs chez la souris (Niederreither, 2002)  
 + : expression forte ou persistente, (+) : expression faible ou temporaire et restreinte, □ : indétectable

ALDH	Espèces	Activité pour les substrats de rétinol (RAL)		
		Tout- <i>trans</i>	9- <i>cis</i>	13- <i>cis</i>
RALDH1	Rat	+	+	-
	Souris	+	+	-
	Humain	+	+	+
	Singe	+	+	+
RALDH2	Rat	+	+	+
	Souris	+	+	+
RALDH3	Humain	+	?	?
	Souris	+	-	-
RALDH4	Humain	Trace	+	+
	Souris	Trace	+	+
PB-ALDH	Rat	-	Trace	-
	Souris	-	?	?

**Tableau 3 :** Activités des RALDHs pour divers substrats de RAL.  
 (d'après Labo Dr. Pangala V.Bhat / Brodeur 2006 et Sima 2009)

#### 4.2.3.1. RALDH 1 (ALDH1A1) / RALDH type 1 – (ou E1, AHD2 ou ALDH1)

RALDH1 (aussi appelée Rétinal déshydrogénase 1, Adh-2 ou ALDH1) est exprimée dans l'embryogénèse, surtout dans la rétine dorsale (Haselbeck et al 1999) mais aussi chez l'adulte dans différents tissus (surtout le foie, le rein, la trachée, les poumons, l'estomac, les intestins, les testicules, les tissus épithéliaux, etc.) selon l'espèce (Bhat, 1998 ; Napoli 2000/Livrea ; Blomhoff 2006). L'expression de RALDH1 après la naissance surtout dans le rein, suggère un rôle de l'AR dans la maturation, les fonctions et la préservation des épithéliums du rein adulte (Bhat et al. 1998). Elle catalyse l'oxydation des isomères *trans* RAL et 9-*cis* RAL vers l'acide rétinoïque (AR) (Labrecque et al., 1995 ; Bhat et Samaha, 1999 ; Napoli/Livrea 2000 ; Gagnon et al., 2003 ; Brodeur et al., 2003). Isolée dans le foie pour son rôle d'aldhéhyde déshydrogénase (Ikawa et al., 1983), on découvre ensuite le rôle de la RALDH1 dans l'oxydation du RAL en AR (Yoshida et al., 1992). Une activité ALDH d'oxydation du RAL est observée dans le rein de rats et de bovins (Bhat et al. 1988; 1996). L'enzyme RALDH1 est partiellement purifiée et caractérisée (Labrecque et al. 1993). La RALDH1 fut ensuite clonée et caractérisée dans plusieurs espèces : humaine (Hsu et al., 1985 ; Yoshida et al., 1985), murine (Rongneparut et Weaver, 1991), le rat (Bhat et al., 1995 ; Kathmann et Lipsky., 1997 ; Penzes et al., 1997), aviaire (Godbout et Monckton, 2001) et simienne dans la lignée cellulaire JTC12 (Brodeur et al., 2002).

Le gène (ALDH1A1) de la RALDH1 est d'une longueur d'environ 50 Kpb, selon les espèces (Hsu et al., 1989 ; Hsu et al., 1999). Il comprend 13 exons et est localisé sur le chromosome 9 chez l'humain (Raghunathan et al., 1988) et le chromosome 19 chez la souris. Son ADNc est composé de 1503 nucléotides et partage 90% d'homologie séquentielle interspécifique avec les pbALDH1 de rat et de souris (Dunn et al., 1989 ; Hsu et al., 1999). Sa protéine (l'enzyme RALDH1) comprend 501 acides aminés et a une masse moléculaire de 140 kDa (non dénaturée). Elle se présente en homo-tétramère avec des sous-unités de 54 kDa. La similarité interspécifique des séquences AA des RALDH1s peut approcher 95% (Penzes et al., 1997) donc la protéine est bien conservée sur l'axe évolutif. Cette similarité AA est de 87% entre les RALDH1 humaine et murine (Hsu et al. 1999) et de 76% entre la souris et les amphibiens (Moore et al. 1998).

La RALDH1 catalyse plus efficacement l'isomère 9-*cis* RAL que le tout-*trans* RAL autant en forme libre que lié par la CRBP (plus efficace avec CRBP-RAL) suggérant qu'elle pourrait intervenir dans la biosynthèse de l'AR 9-*cis* *in vivo* (Napoli/Livrea 2000 ; Duester et al, 2003 ; Blomhoff 2006). Les RALDH1s humaines (Bhat et Samaha, 1999) et celles de la lignée cellulaire simienne JTC-12 (Brodeur et al., 2002), peuvent aussi oxyder le 13-*cis* RAL. Des études avec des enzymes chimériques combinant la RALDH1 et la pbALDH1 de rat, ont révélé que les séquences d'AA de 1 à 131 sont impliquées dans l'oxydation du tout-*trans* RAL. Les AA 132 à 343 catalysent le 9-*cis* RAL (Montplaisir et al., 2002) et les AA 132 à 500 sont impliqués dans l'inhibition de l'activité enzymatique par le Mg (Brodeur et al., 2006). Des recherches sur la RALDH1 de mouton ont déterminé les séquences d'AA responsables pour lier le substrat et le cofacteur (Moore et al., 1998). Il est possible de stimuler dans le foie de rat, l'expression de cette enzyme ALDH nommé (pbALDH1) qui est semblable aux RALDH1s par un traitement avec du phénobarbital (Deitrich, 1971; Dunn et al., 1989; Hsu et al., 1999). La pbALDH1, n'a aucune activité pour le at-RAL et catalyse très peu l'oxydation du 9-*cis* RAL (Hsu et al., 1999 ; Kathmann et al., 2000).

La RALDH1 est donc impliquée dans la biosynthèse de l'acide rétinoïque (AR) , le métabolisme de l'éthanol et divers détoxifications ( Ex. excès de ROL, des oxazaphosphorines comme le cyclophosphamide, etc ) ( Duester et al 2003; Vasiliou et al. 2000; Blomhoff 2006 ). Il a été aussi observé que l'expression de la RALDH1 était diminuée dans les tumeurs induites chimiquement chez les souris (Banfi et al., 1994). L'étude de souris transgéniques KO-RALDH1 ont révélé plutôt un rôle de complémentarité de la RALDH1 avec les autres RALDH (2,3,4) dans la biosynthèse d'AR dans les divers tissus embryonnaires ou adultes et un rôle plus spécifique de la RALDH1 pour le catabolisme et l'élimination du ROL en excès surtout dans le foie ( Duester et al. 2003 ; Fan et al., 2003 ; Blomhoff 2006 ).

#### **4.2.3.2. RALDH 2 (ALDH1A2) / RALDH type 2-(aussi appelée V2)**

La RALDH2 (aussi appelée ALDH1A2 ou V2) est une ALDH cytoplasmique de Classe 1 et Type 2 (son gène s'appelle ALDH1A2), révélée dans la rétine ventrale de l'embryon de souris (Duester, 2000; Huachen et al.2000) et exprimée dans plusieurs tissus chez l'embryon (Creech Kraft/Livrea 2000; Clagett-DAME et DeLuca 2002, Bhat et

Manolescu 2008) et dans les organes sexuelles chez l'adulte (Haselbeck et al.1999 ; Niederreither et al. 1997 ; Blomhoff 2006). Précocement exprimée à 7,5 jours dans l'embryogénèse des souris, c'est la première RALDH exprimée dans l'embryon (à l'étape de la gastrulation déjà) au niveau des somites non-différenciés, dans le mésenchyme entourant le tube neural, dans les membres différenciés (Haselbeck et al. 1999) et dans le cerveau antérieur (encéphale proximale) (Zhao et al. 1996). Dans les embryons murins, RALDH2 est localisée dans des cellules mésenchymateuses y compris dans le mésoderme du tronc, le bourgeon du limbe proximal, le bourgeon uretic, le mésoderme du bourgeon des poumons ainsi que dans le cœur (Niederreither et al. 1997).

L'expression précoce de la RALDH2 dans le mésoderme suggère un rôle pour l'AR dans la formation de l'axe de rotation de l'embryon. (Creech Kraft/Livrea 2000 ; Clagett-Dame et DeLuca, 2002 ; Blomhoff 2006). Le gène (RALDH1A2) de l'enzyme RALDH2, se trouve sur le chromosome 9 chez la souris et 15 chez l'humain. Sa version murine a une longueur de 70 kb, et possède 13 exons qui codent pour une séquence de 499 acides aminés (Hsu et al., 2000). Chez l'homme il existe un ADNc, proche de celui de type RALDH2, qui est 95% similaire aux cDNA du rat, murin (Yoshida et al. 1998 ; Ono et al.1998) et aviaire (Ono et al.1998). La séquence d'acides aminés de la RALDH2 a bien été préservée sur l'axe évolutif (Hsu et al.2000) et partage 72% d'identité avec la classe des ALDH1 humaines. Elle peut oxyder irréversiblement le *at*-RAL vers *at*-AR en présence de NAD<sup>+</sup> (Zhao et al.1996 ; Wang et al. 1996 ; Lamb et Newcomer, 1999). La protéine comprend 499 acides aminés et partage 70% d'homologie de séquence avec RALDH1 et 3, et 90% inter-espèces. L'expression spatiotemporelle très spécifique de RALDH2 coïncide avec la présence d'AR dans les mêmes tissus (Niederreither et al., 1997, 1999).

Plusieurs études ont démontré l'importance de RALDH2 dans la production d'AR lors du développement (Margaret Clagett-Dame, 2002 ; Blomhoff 2006; Bhat et Manolescu 2008). Les embryons de souris transgéniques privés de ce gène (KO-**RALDH2** -/-), ne présentent pas d'axe de rotation embryonnaire ni d'AR dans leurs tissus précoces. Ils ne sont pas viables et meurent rapidement *in-utero* au stade de 10,5 jours post-coïtum, principalement suite à des défauts dans la différenciation des cardiomyocytes et le développement du cœur, mais l'absence de RALDH2 perturbe le développement de presque tous leurs organes (Niederreither et al., 1999,2001 ; Makrakis 2007).

L'oreille interne (Romand et al. 2001), le pharynx (Niederreither et al. 2003), les extrémités et la formation de la symétrie du corps (Vermot et al., 2006) y sont perturbés. Ainsi le développement du cerveau postérieur est gravement perturbé dans la segmentation, et la croissance à cause de l'absence d'AR pour moduler l'expression de certains gènes homéobox et d'autres gènes comme *Krox20* (Niederreither et al., 2000). Il y a arrêt dans la néphrogenèse de ces souris RALDH2-K.O. (Niederreither et al.1999). L'AR a un rôle essentiel pour une organogénèse normale des reins (Creech Kraft/Livrea 2000; Clagett-DAME et DeLuca 2002, Makrakis 2007, Bhat et Manolescu 2008). Étant donné l'intérêt de notre projet de Maîtrise pour les liens entre les rétinoïdes et le développement rénal, nous allons développer sur ce sujet dans le cadre d'une revue de littérature orientée sur cet axe, que nous nous proposons de publier dans une revue scientifique reconnue et l'inclure plus loin ici, dans le présent Mémoire de Maîtrise.

Les RALDH1 et RALDH3 sont exprimées dans l'embryon plus-tard que la RALDH2, et peuvent contribuer à la synthèse d'AR, du moins dans les régions crânio-faciales, (Mic et al., 2002 ; Niederreither et al., 2001,2002). Le besoin précoce en RALDH2 et son AR précocement produit juste par elle pour le développement de la majorité des organes vitaux, fait que les embryons des **KO-RALDH2** *-/-* ne se rendent même pas au delà de 10 jours post-coïtum, et meurent avant. L'administration d'AR à la souris gestante (*at-RA*, 25mg/kgCorps/2 fois par jour) est capable de sauver ces embryons **KO-RALDH2** *-/-* (Niederreither et al. 1997 ; 1999 ; Blomhoff 2006) ce qui confirme que la RALDH2 est responsable de la production d'AR dans différents tissus et cellules et est absolument nécessaire pour l'organogénèse, durant le développement embryonnaire. (Creech Kraft/Livrea 2000; Berggren et al. 2001 ; Clagett-Dame et DeLuca, 2002 ; Blomhoff 2006). L'administration intra-péritonéale d'AR restaure aussi la néphrogenèse et le développement rénal normal (Makrakis, 2007).

Certaines anomalies (comme des troncs plus courts) restent inchangés même après l'administration d'AR exogène (Niederreither et al., 1999, 2000, 2001, 2002). Un tel traitement avec AR exogène prévient les malformations jusqu'au jour 8,5 approximativement mais si par la suite l'apport l'AR n'est pas discontinué, des toxicités tératogènes typiques de l'hypervitaminose A sont observées (Mic et al., 2002). La RALDH2 oxyde le RAL ( $K_m$  : 0.7  $\mu$ m) préférentiellement à l'acétaldéhyde ( $K_m$  : 645  $\mu$ m) et catalyse l'oxydation des isomères tout-*trans* RAL, 9-*cis* RAL et 13-*cis* RAL vers AR

avec préférence pour le atRAL (Bhat et Samaha, 1999 ; (Gagnon et al. 2002) 2003 ; Brodeur et al, 2003). En conclusion l'enzyme RALDH2 est nécessaire et essentielle pour la synthèse précoce *in vivo* d'AR à partir de RAL surtout chez l'embryon où elle joue également un rôle très important dans le développement rénal. C'est le seul cas, parmi toutes les souris transgéniques -/- (K.O.) produites, où la déficience d'un gène impliqué dans la biosynthèse de l'AR mène à une mortalité prénatale.

#### 4.2.3.3. RALDH 3 (ALDH1A3) / RALDH type 3 - (aussi appelée V1)

La RALDH3 (aussi appelée ALDH1A3, V1 et ALDH6) est exprimée dans les tissus optiques (vésicules) de la souris à partir de 8,5 jours de vie embryonnaire, dans la rétine ventrale et l'épithélium dorsal pigmentaire de souris et de poulets ainsi que dans le système olfactif, dans les bourgeons urétiqes et la surface de l'ectoderme dans la région du développement cérébral (Grün et al., 2000 ; Huanchen et al. 2000 ; Mic et al., 2000, Li et al., 2000 ; (Dupé et al. 2003) ; Blomhoff 2006). Comme les RALDH1 et RALDH2, la RALDH3 est capable d'oxyder le RAL dans la rétine ventrale (McCaffery et al., 1993). Chez l'humain, RALDH3 est très bien exprimée dans les glandes salivaires, les reins, l'estomac, les glandes mammaires normales et l'est en quantités variables dans plusieurs autres tissus (Hsu et al., 1994 ; Napoli/Livrea 2000 ; Blomhoff 2006). La RALDH3 a été d'abord clonée à partir de glandes salivaires humaines (Hsu et al., 1994), ensuite à partir des embryons murins et aviaires (Li et al., 2000 ; Grün et al., 2000) et de reins et rétine ventrale de souris adultes (Mic et al., 2000 ; Grün et al., 2000).

Le gène ALDH1A3 se trouve sur le chromosome 7 chez la souris et sur le chromosome 15 chez l'humain et code pour la protéine RALDH3 (séquence de 512 AA). Elle partage 90% similitudes d'ALDH1A3s interspécifiques et 70% avec les RALDH1 et 2 (Mic et al., 2000 ; Li et al., 2000 ; Grün et al., 2000). Les souris transgéniques KO-RALDH3-/- meurent dans max 10 heures après-naissance, à cause de malformations ORL, (l'asphyxie par obturation entre les cavités nasales et buccale (atrésie rhino-orale) (Dupé et al., 2003). Le développement de l'œil est perturbé, mais dans la vésicule optique, la rétine ventrale n'est que légèrement affectée, alors que les reins et les oreilles ne sont pas touchés, ce qui laisse penser que les RALDH2, RALDH4 et RALDH1 pourraient compenser pour la production d'AR dans ces organes (Niederreither et al. 2002 ; Clagett-Dame et DeLuca, 2002 ; Blomhoff 2006).

Toutes ces informations confirment l'importance de la RALDH3 qui est essentielle pour la synthèse de l'AR dans ces zones ORL de l'embryon (Dupe et al. 2003). La RALDH3 est aussi utilisé dans les recherches biomédicales contre le cancer, dans des lignées cellulaires spécifiques (cellules épithéliales mammaires non-tumorigéniques (MTSV1.7) qui expriment la RALDH3 et les cellules épithéliales d'adénocarcinome mammaire humain (MCF-7) qui n'expriment pas la RALDH3 et ne peuvent pas oxyder le RAL en AR (Rexer et al., 2001). RALDH3 des différentes espèces peuvent catalyser l'oxydation de tout-*trans* RAL, qui est son substrat de haute affinité et l'enzyme préfère les aldéhydes aliphatiques à huit carbones (Graham et al. 2006). Le fait que les malformations chez les souris KO-RALDH3 -/- peuvent être empêchées aussi par l'administration d'AR exogène à la souris gestante (comme pour celles des KO-RALDH2 -/-) montre qu'en fait, différents organes, tissus et cellules utilisent différents mécanismes et voies enzymatiques (ex. RALDH1, RALDH2, RALDH3, etc.) plus ou moins spécifiques et souvent complémentaires, pour satisfaire les besoins en AR (Niederreither et al. 2002 ; Blomhoff 2006).

#### **4.2.3.4. RALDH4 (ALDH8A1) / RALDH type 4**

Lin, Napoli et al, 2003 ont démontré qu'une quatrième enzyme de type ALDH, ALDH8A1 (RALDH4) reconnaît les rétinoïdes (RAL) comme substrats. La RALDH4 murine est semblable (orthologue) à l'ALDH12 humaine (elles partagent 90% de similarité des séquences d'AA et ont des valeurs Km proches pour le 9-cis RAL (3,2 µM pour l'ALDH12). Elles ne catalysent pas bien la déshydrogénation (oxydation) du *at*-RAL et sont exprimées bien chez l'adulte uniquement dans le foie et les reins (Lin et Napoli, 2000 ; Lin et al., 2003). Elle n'appartient pas à la classe 1 des ALDHs (comme les autres RALDHs) mais à la classe 8 (Sophos et Vasiliou, 2003). Le gène ALDH8A1 se trouve sur le chromosome 10 chez la souris, le 1 chez le rat et le chromosome 6 chez l'humain. La séquence en AA de sa protéine, l'enzyme RALDH4 est bien conservée sur l'axe évolutif, caractérisant les ALDHs (Lin et Napoli, 2000 ; Lin et al., 2003). Elle est présente à 14,5 jours dans le foie d'embryon de souris, mais pas dans le rein (Lin et al., 2003). Les conditions de transcription pour son ARNm et de translation (traduction, expression) de la protéine RALDH4 sont différentes de celles des autres RALDH (Lin et Napoli 2003).

Le foie fœtal de souris (e14.5) exprime très peu l'ARNm de la RALDH1, du tout celui des RALDH 2 et 3 mais rapidement celui de la RALDH4 (Lin, Napoli et al, 2003) ce qui suggère un rôle de cette enzyme dans l'organogénèse hépatique fœtale (Niederreither, 1997, 2002). L'expression conjointe de la RALDH4 à cet âge (e14.5) dans le foie et quelques cellules sanguines, suggère aussi une contribution à l'hématopoïèse fœtale, ce qui est important car des embryons murins qui manquent de RXR ont des expressions réduites d'ARNm d'érythropoïétine et une érythropoïèse perturbée de l'âge 10.25 j à 14.5 j (Makita, 2001). Ces observations peuvent fournir des explications pour le mécanisme d'impact synergique des suppléments de vitamine A et de Fe, qui sont plus efficaces (lorsque administrés ensemble) pour rétablir l'érythropoïèse et éliminer l'anémie ferriprive, que la simple supplémentation en Fe (Suharno, 1993).

Donc la RALDH4, non seulement est exprimée différemment par rapport aux autres RALDHs de souris dans l'embryogénèse, mais aussi chez les adultes où elle l'est intensément seulement dans le foie et le rein (Lin et Napoli, 2000 ; Lin et al., 2003). RALDH4 a une grande activité enzymatique sur le 9-*cis* rétinol. Elle peut aussi catalyser faiblement l'oxydation du 13-*cis*RAL et très peu le *at*-RAL. En fait la RALDH4 est doublement plus active avec un substrat de 9-*cis* RAL, qu'avec les autres isomères de RAL (Lin et al, 2003 ; Blumhoff 2006). Des études de métabolisme démontrent la capacité de l'RALDH4 de produire du 9cRA dans les cellules, en coopération avec une SDR murine (CRAD1, CRAD3 ou RDH1) (Lin et Napoli, 2000). Sa présence dans les tissus, foie et rein, où l'on retrouve le 9-*cis* ROL (Labrecque et al. 1995 ; Paik et al. 2000) appuie cette théorie. La caractérisation de la RALDH4 murine élargit les informations sur le métabolisme général des rétinoïdes (Sima et Bhat, 2009(en publication)).

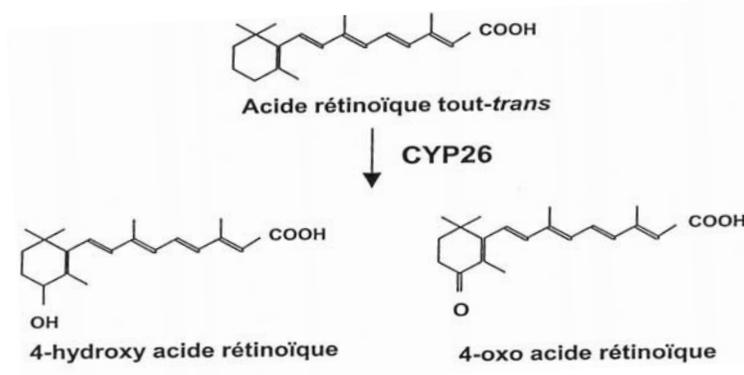
#### **4.2.3.5. Certaines enzymes de la famille des Cytochrome P450**

Mieux connues pour leur rôle dans le catabolisme du RA, certaines isoformes d'enzymes qui font partie de la superfamille des cytochromes P450, peuvent catalyser l'oxydation du RAL en AR (Duester, 1996). Il est ainsi des isoformes de CYP2J4, qui sont bien exprimées dans la muqueuse de l'intestin grêle du rat, qui peuvent oxyder les tout-trans et 9-*cis* RAL vers l'AR et seraient impliquées dans la métabolisation de la Vitamine A provenant directement de l'alimentation (Zhang, 1998). Dans le foie, des isoformes P450A1 peuvent oxyder le tout-trans et 13-*cis* RAL en position C4 et sur les trois RALs

(le tout-trans, 9-cis et 13-cis) dans leur forme carboxylée. La possibilité de production *in-vivo* d'AR par des enzymes de la famille de CYP450 semble être secondaire et plutôt complémentaire avec la production principale d'AR des RALDH, dans le but de contribuer à l'équilibre métabolique des rétinoïdes *in vivo*.

#### 4.3 CATABOLISME DE L'AR - Cytochromes CYP26 / Superfamille P450

Un control rigoureux de l'AR (biosynthèse, catabolisme) est nécessaire vu que le manque et l'excès d'AR ont des effets tératogènes. Des enzymes de type **CYP26** (appartenant à la superfamille des cytochromes P450), dégradent l'AR en métabolites polaires. La P450RAI/CYP26 induite par l'AR et exprimée dans les mêmes tissus que les RALDH (enzymes de synthèse de l'AR), contrôle l'excès tissulaire de l'AR lors de l'embryogénèse (Wouters et al 1992 ; White et al 1997 ; Perlman 2002 ; Blomhoff 2006), en convertissant l'AR en produits polaires (**Fig.14, p.55**). Ces produits, comme le 4-hydroxy AR (métabolite inactif) et le 4-oxo AR (métabolite actif mais non-toxique), bloquent spécifiquement des voies de signalisation de l'AR dans les cellules (Butler et Fontana 1992 ; Formelli et al, 1996). Quatre sous-familles de ces enzymes-hydroxylases ont été identifiées et clonées : **CYP26A1** (Fujii et al., 1997 ; Ray et al., 1997 ; White et al., 1997 ; White et al., 1998 ; Abu-Abed et al., 1998 ; Wang et coll 2002), **CYP26B1** (Nelson, 1999 ; White et al., 2000 ; MacLean et al., 2001 ; ), **CYP26C1** (Reijntjes et al., 2004 ; Tahayato et al., 2003 ; Taimi et al., 2004) et **CYP26D1** (Gu et al., 2005).



**Figure 14.** Catabolisme de l'acide rétinoïque  
(Perlmann 2002)

Ces enzymes CYP26 (A, B, C, D) 1, présentent < 30% de similitude structurale séquentielle avec les autres membres de la superfamille du cytochrome P450. Elles partagent aussi de 40 à 50% de similitude avec les sous-familles de CYP26 mais plus de 90% entre les mammifères d'une même sous-famille (Ray et al., 1997 ; Taimi et al., 2004). Les CYP26 catalysent l'oxydation de l'AR en métabolites inactifs (4-hydroxy-AR, 18-hydroxy-AR et 5,6 et 5,8-époxy-AR) et en métabolite actif l'4-oxo-AR (Reijntjes et al., 2004 ; Blomhoff 2006). Plusieurs glucuronidés peuvent être formés à partir de ROL et RA, probablement destinés pour l'excrétion dans la bile et l'urine (Barua et Olson, 1986). Il semblerait qu'il existe aussi plusieurs opinions quant à une possible activité biologique de ces produits de dégradation de ROL et de l'AR, notamment les 4-hydroxy-AR, 18-hydroxy-AR, l'4-oxo-AR et retinoyl beta-glucuronide (Barua and Sidell, 2004 ; Reijntjes et al., 2005) toutefois leur non-toxicité est reconnue. Découverte d'abord dans les poissons Zébra (White et al. 1997) la CYP26A1 fut ensuite clonée chez l'humain, la souris, le rat et le poulet (Swindell et al., 1997). Elle est retrouvée en quantité importante dans le foie, le duodénum, le colon, le placenta et certaines régions du cerveau (Ray et al. 1997 ; Lampren et al. 2001). Des souris transgéniques KO-CYP26A1<sup>-/-</sup> (Sakai et al., 2001 ; Abu-Abed et al., 2001) meurent *in-utero*, avec des malformations spécifiques pour l'excès d'AR. Ce phénomène disparaît lors d'un croisement de ces souris avec des souris hétérozygotes RALDH2<sup>+/-</sup>, (phénotype faible biosynthèse d'AR) (Niederreither et al., 2002).

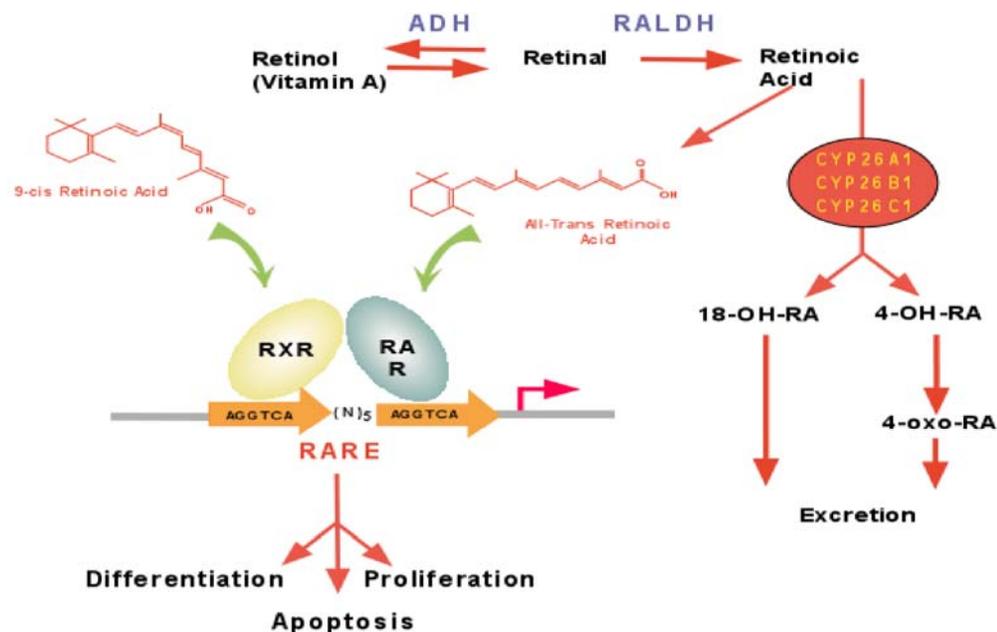
En position proximale, au début de la région du promoteur du gène de la CYP26A1, se trouve un élément fonctionnel RARE (Retinoic Acid Response Element), donc la transcription de ce gène sera induite par la présence de l'AR. Ceci implique un mécanisme direct avec lequel le gène pour CYP26A1 peut ressentir l'évolution de la concentration intracellulaire d'at-AR et le régulariser via le catabolisme oxydatif. Le CYP26B1 a la même activité catalytique que le CYP26A1, mais une autre distribution tissulaire (White et al., 2000). La CYP26C1 peut convertir le at-AR en métabolites polaires hydrosolubles similaires à ceux obtenus par CYP26A1 et CYP26B1, mais elle catabolise beaucoup mieux le 9cis-RA que les deux autres. La CYP26C1 n'est pas systématiquement et largement répandue chez l'adulte mais elle peut être induite par l'augmentation des taux d'AR. Les conditions d'expression des CYP26s sont distinctes pour chacune de ces enzymes et ne se mélangent pas, suggérant leurs rôles individuels dans le catabolisme de l'AR (Reijntjes et al., 2004).

Ces enzymes sont régulées principalement par l'AR car lors d'un excès d'AR il y a expression des CYP26, alors que si le taux d'AR est homéostatique, l'enzyme est bloquée. L'expression de CYP26A1 est aussi activée (peut-être à titre préventif) par une diète chronique élevée en vitamine A à des niveaux non-toxiques. (Yamamoto et al., 2000). Il semblerait aussi que lorsque l'AR est lié et présenté aux CYP26s, par la CRABP-I l'efficacité de sa dégradation catabolique est augmentée (Boylan 1991, 1992). Les CYP26s établissent un gradient d'AR, car leur expression crée une balance entre la présence ou non d'AR dans un tissu. Mais lors du développement embryonnaire, d'autres facteurs peuvent intervenir aussi en parallèle avec l'AR pour ajuster l'expression des CYP26s, afin d'empêcher préventivement toute accumulation dangereuse d'AR en excès, même transitoire. Les CYP26s sont donc très importantes dans la régularisation de la concentration d'AR nécessaire au développement et jouent un rôle important dans la régulation de gènes par l'AR, en gérant sa concentration dans les cellules cibles. (Blomhoff 2006). Plusieurs recherches avec marquage radioactif de ROL et RA, ont étudié le catabolisme des rétinoïdes par analyses des leurs métabolites urinaires, biliaires et fécales et elles ont détecté encore plus de métabolites polaires (ex. rétinoïdes conjugués avec taurine, produits de décarboxylation, d'époxidation ou d'isomérisation, etc. (Frolik, 1984). Il apparaît ainsi que le catabolisme des rétinoïdes, bien que principalement présent à partir de RA, peut aussi avoir lieu à partir de ROL, probablement de façon complémentaire pour augmenter l'efficacité d'un équilibre homéostatique avec un minimum possible de dépenses énergétiques en réactions biochimiques (Blomhoff 2006).

#### **4.4 ACTIVITÉS BIOLOGIQUES GÉNOMIQUES DE L'ACIDE RÉTINOÏQUE**

L'AR est une petite molécule hormonale liposoluble avec des propriétés morphogénétiques et est un puissant modulateur de la formation des axes embryonnaire et du maintien du phénotype des tissus épithéliaux ainsi qu'un important immuno-modulateur chez l'adulte (Morris-Kay et Sokolova, 1996; Guidez and Zelent/Livrea 2000; Blomhoff 2006). L'AR est la forme active principale de la vitamine A et il régule l'expression des gènes en tant que ligand des récepteurs nucléaires spécifiques. Les RARs (retinoic acid receptor) et RXRs (retinoid X receptor) peuvent moduler l'expression génique par l'activation ou la répression de la transcription de gènes (Labrecque 1997, Blomhoff et Blomhoff 2006, (Davidovici et al. 2007). Il en est ainsi pour des gènes impliqués dans

l'autorégulation de l'AR par rétroaction (feed-back) dans la chaîne métabolique, mais aussi pour des gènes impliqués dans l'embryogénèse (Clagett-Dame et DeLuca 2002, Makrakis 2007, Bhat et Manolescu 2008), des gènes comme PPAR (Ziouzenkova et Plutzky 2007) et plusieurs autres familles de gènes. Donc de façon similaire aux stéroïdes, aux hormones thyroïdiennes et à la vitamine D, l'AR exerce son action régulatrice sur divers gènes par l'intermédiaire des RARs et RXRs qui appartiennent à la famille des récepteurs nucléaires aux stéroïdes et aux hormones thyroïdiennes (Million et al. 2001, (Petkovich PM 2001). Les RARs et RXRs sont codés chacun par des gènes indépendants situés sur des chromosomes différents (Mangelsdorf, 1994 ; Davidovici 2007).



**Figure 15** . Schéma de régulation génique par l'AR via les récepteurs RAR, RXR et éléments RARE (Petkovich, P.M. 2001-Retinoic acid metabolism)

L'isomère tout-*trans* de l'AR est un ligand pour les récepteurs nucléaires RARs et le 9-*cis* AR est un ligand plus spécifiquement pour les RXRs mais il peut lier les RARs aussi. L'action biologique de ces isomères d'AR se manifeste par leur liaison-activation des récepteurs nucléaires RAR/RXR, qui stimulent les éléments de réponse à l'AR (RARE) se trouvant sur les promoteurs des gènes et contrôlent l'activité transcriptionnelle répression ou l'expression protéique des gènes (**Fig.15, pag.58**). L'AR-13-*cis* (isotrétionine) est naturellement retrouvé chez les Eucaryotes, dans le sang et les tissus humains (Blaner 2001) mais n'a pas la capacité d'influencer l'activité des gènes (Thielitz et al. 2008).

Ainsi l'atRA remplit toutes les fonctions endocrines connues pour les rétinoïdes, principalement par l'activation de trois récepteurs nucléaires RAR -  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  (Glass 1997 ; Renaud 2000). Son isomère 9cRA contrôle les récepteurs nucléaires distincts RXR -  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ , récepteurs qui influencent par hétérodimérisation les fonctions d'autres récepteurs nucléaires (ex. RAR -  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ , VDR, PPAR  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ , etc.). Ces hétérodimères formés par ces autres récepteurs nucléaires mentionnés avec RXR semblent pouvoir être activés au maximum et fonctionner, seulement avec le ligand spécifique pour le récepteur non-RXR du tandem (atRA, hormone thyroïdienne, EPA, DHA, etc.), à condition que ce ligand soit présent en concentration suffisante. Mais quand les concentrations de ce ligand tombent sous leur niveau maximal (voir sous leur niveau suffisant) pour être efficaces à activer le hétérodimer de leur récepteur nucléaire avec le RXR à eux tous seuls, le 9cRA semble compenser ce manque par son action spécifique sur le RXR permettant à l'hétérodimer en question de fonctionner efficacement quand-même (Zhuang et Napoli 2001). De plus d'autres ligands nucléaires que le 9-cisRA sont capables d'activer les récepteurs nucléaires RXR (ex. acid phytanic, eicosanoids et docosahexanoic acid (Eager et al 1992 ; Kitareewan et al 1996 ; de Urquiza et al 2000 ; Blomhoff 2006). Des études suggèrent que le 9cRA et ses analogues influencent la progression des certaines maladies métaboliques (ex. T2DM) (Nagpal, 2000) et que tous ces effets de 9cRa dans des processus métaboliques, attestent de sa biogénèse contrôlée *in-vivo* ( Napoli/Livrea 2000 ; Zhuang et Napoli 2001).

En conclusion l'activation des RARs et des RXRs par l'AR a lieu dans le contexte de leur dimérisation. Les hétéro-dimères RAR/RXR ou d'autres récepteurs nucléaires avec RXR et les homo-dimères RXR/RXR agissent comme facteurs de transcription dépendantes de leur ligand (l'AR) et via leur élément de réponse à l'acide rétinoïque (RARE), qui est localisé dans la région promotrice de leurs gènes cibles (Mangelsdorf et al. 1995 ; De Thé et al. 1990 ; Blomhoff et Blomhoff, 2006). Le RAR (retinoic acid receptor) est un régulateur transcriptionnel d'une grande variété de gènes ayant dans leur région promotrice un élément RARE. Le RXR (retinoid X receptor) remplit d'avantage le rôle d'un co-régulateur complémentaire des RARs et d'autres récepteurs nucléaires à hormone stéroïdienne : (ex. RAR -  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ , VDR, PPAR  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ , TR, etc.) (McSorley et Daly, 2000 ; Renaud 2000 ; Zhuang et Napoli 2001 ; Davidovici 2007 ; Ziouzenkova 2007). Dans les dernières années, les recherches ont démontré que le complexe RA-RAR/RXR

peuvent aussi réguler l'expression génique indirect des RARE, en régulant la transactivation d'autres facteurs de transcription. Ainsi plus de 100 gènes étaient connus en 2002 pour être régulés par le complexe RA-RAR/RXR indirectement d'une liaison classique à leur élément RARE (Balmer and Blomhoff, 2002). Dans l'ensemble, on peut conclure à une grande diversité régulatrice de l'expression génique, étant donné que le complexe RA-RAR/RXR peut moduler la transcription génique (par activation ou répression) via plusieurs mécanismes distincts, qui peuvent être génomiques (avec ou sans liaison à des éléments RARE) ou même non-génomiques (par des mécanismes ligand-dépendantes ou -indépendantes) (Blomhoff, 2006).

#### 4.4.1 Les récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque (RARs et RXRs)

D'une manière générale les récepteurs nucléaires fonctionnent comme **répresseurs** (lorsque couplés avec un corépresseur et ferment la voie de la transcription génique via une dé-acétylation de histones) (**Fig.16C, p.62**) ou comme **activateurs** pour la transcription des gènes (lorsque couplés avec un co-activateur et ouvrent la voie de la transcription génique via une acétylation de histones) (**Fig.16D, p.62**). En termes d'automatismes cybernétiques, le mécanisme est comparable avec un contact normalement fermé avec temporisation à l'ouverture par un inducteur (ici l'AR). Les RARs et RXRs sont des phosphoprotéines et sont membres de la superfamille des récepteurs nucléaires hormonaux comme les récepteurs nucléaires aux stéroïdes et aux hormones thyroïdiennes (Guidez et Zelent 2000/Livrea ; Million et al. 2001). Trois sous-types  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  existent pour chaque type des récepteurs RARs et RXRs et l'épissage alternatif des gènes transcrits permet l'existence de plusieurs isoformes pour chacun des ces sous-types (Gudas 1994 ; Evans 2004 ; Chambon 2004 ; Blomhoff 2006). Les RARs ressemblent plus aux TR qu'aux RXR. Pour mieux comprendre les RARs et les RXRs, rappelons qu'ils existent deux sous-familles de récepteurs hormonaux nucléaires : **le type I** qui inclut les récepteurs nucléaires des œstrogènes, progestérone et des glucocorticoïdes et **le type II** qui comprend les récepteurs des hormones thyroïdiennes (TR), de la vitamine D3 (VDR) des proliférateurs des peroxysomes (PPAR) et des rétinoïdes RAR, RXR. Les façons de faire les liaisons avec le ligand et l'élément de réponse sont différentes dans les deux sous-familles. Les récepteurs de type I doivent d'abord se fixer sur leur ligand pour pouvoir se lier ensuite à leur élément de réponse qui est une séquence inversée séparé de trois nucléotides.

Les récepteurs de type II peuvent déjà se lier à leur élément de réponse (une répétition directe de six nucléotides) même en l'absence de leur ligand. C'est le cas des RARs et les RXRs qui en tant que récepteurs nucléaires possèdent 4 régions principales distinctes mais interactives (A/B-Modulateur, DBD-Liaison ADN, Charnière et LBD-Liaison Ligand) structurées en 5 domaines successives présentés de gauche à droite dans la (Shulman et Mangelsdorf, 2005) (**Fig.16A, p.62**) qui se décrivent comme suite :

**Le domaine A/B** ou **Modulateur** se trouve à l'extrémité N-terminale. Sa séquence primaire et sa longueur sont variables. Sa fonction d'activation constitutive est indépendante du ligand (*activation function 1* (AF1)). Il permet l'apparition de récepteurs nucléaires isoformes (isoformes parce que des promoteurs et/ou des sites d'initiation distincts ou isoformes peuvent être obtenues par épissage alternatif) qui ont les mêmes sites de liaison à l'ADN et au ligand, mais des propriétés physiologiques différents. (Giguère, 1994 ; Shulman et Mangelsdorf, 2005 ; Brodeur 2006). Il peut avoir des modifications post-traductionnelles (ex. phosphorylation) (Kopf et al. 2000)

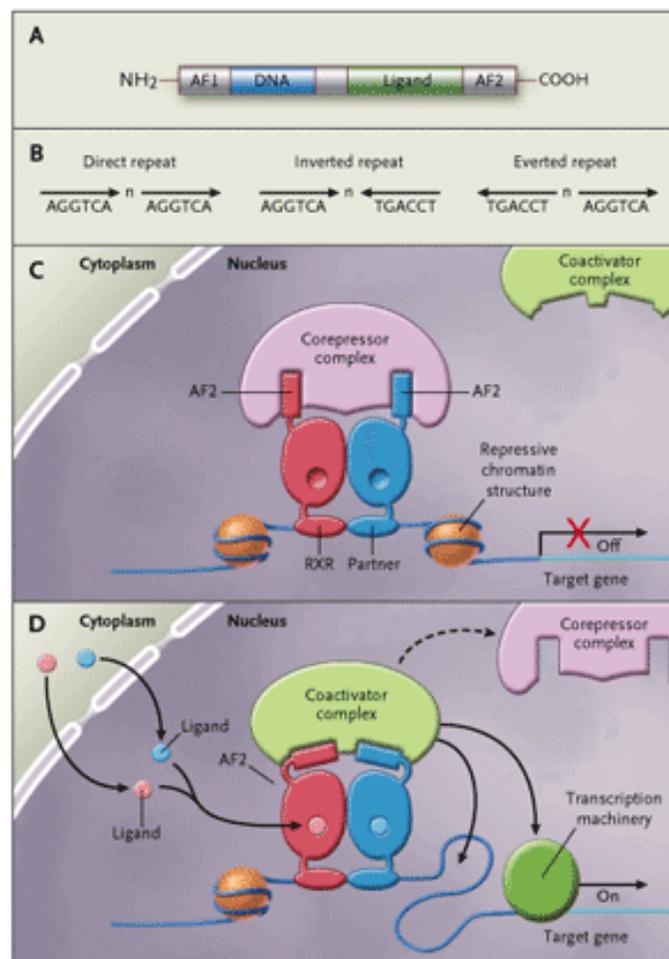
**Le domaine C** ou **domaine DBD de liaison à l'ADN** (DNA Binding Domain, **DBD**) suit immédiatement le domaine A/B. Composé de deux doigts de zinc de 66 à 70 acides aminés. Responsable de l'interaction spécifique avec les éléments de réponse (**RE**) (**HRE**-Hormone response elements ou **RARE**-Retinoic Acide Response Elements ou **RXRE**-Retinoides X Response Elements) présents sur le promoteur (Sonoda et Evans 2007). Les récepteurs vont se lier aux éléments de réponse présents (**RE**) dans la séquence promotrice des gènes répondant à l'AR, via une hélice  $\alpha$  présente dans ce **DBD**. La séquence des AA de cette région est bien préservée dans une même famille et c'est elle qui permet de classer le récepteur dans une superfamille spécifique. (Shulman and Mangelsdorf 2005).

**Le domaine D** ou **région charnière**, lie le domaine C-DBD-ADN avec le domaine E-LBD-Ligand et confère une flexibilité aux récepteurs (qui sont en contexte de dimérisation) pour accueillir diverses structures des domaines **E** (Ligand Binding Domain, **LBD**) et **C** (DNA Binding Domain, **DBD**). Par exemple, le domaine **D** permet donc à chaque hétérodimère formé par des récepteurs nucléaires hétérodimerisés, de lier différentes séquences des différents (**RE**) (**HRE**-Hormone response elements ou **RARE**-Retinoic Acide Response Elements ou **RXRE**-Retinoides X Response Elements) présents sur les différents promoteurs, des différents gènes concernés (Sonoda et Evans 2007).

**Le domaine E** ou **domaine LBD de liaison du Ligand** (Ligand Binding Domain,

LBD) a fonction d'activation de la transcription dépendante du ligand (*activation function 2* (AF2)). Il est responsable de la reconnaissance et la fixation spécifique du ligand (**LBD**) et la dimérisation du récepteur (homo-dimère ou hétéro-dimère). Il est responsable aussi de l'interaction avec des co-activateurs et des corépresseurs. (Giguère, 1994 ; Gudas, 1994 ; Chambon, 1996 ; 2004, Blomhoff 2006).

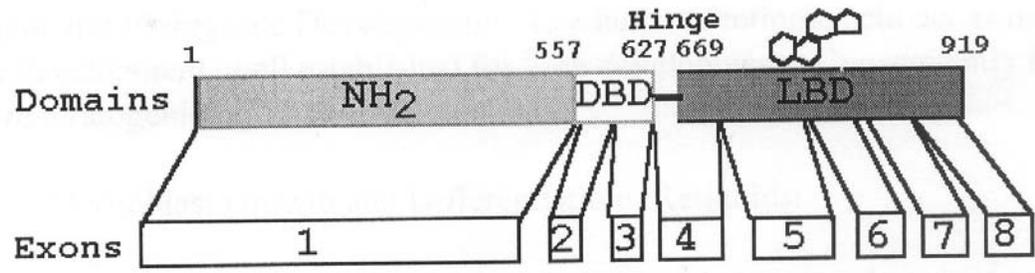
Le **domaine F** se trouve à l'extrémité C-terminale, une petite séquence peu conservée et de fonctionnalité variable, pas toujours présente (Chambon, 1996). Les éléments de réponse à l'AR (**RARE**) et aux rétinoïdes X (**RXRE**) sont une répétition directe 5' AGGTCA 3', espacée par 1 à 5 nucléotides (DRn = DR1 à DR5) (**Fig.16B, p.62**). Le domaine de liaison du ligand contient une poche pour le ligand, mais aussi des régions d'interactions protéine-protéine permettant la formation de dimères (Kersten et al., 1997 ; Balmer and Blomhoff 2005).



**Figure 16. A,B,C,D** Récepteurs à l'AR (RAR et RXR) et RARE. Mécanisme de la transcription génique ( Shulman et Mangelsdorf, 2005 )

#### 4.4.1.1. Les RARs

Le RAR (récepteur à l'AR) a été découvert à la fin des années '80 (Petkovich et al. 1987 ; Giguère et al. 1987). Comme on l'a vu dans l'introduction de récepteurs nucléaires de l'AR, leur architecture ressemble à celle des RXR ainsi qu'à d'autres membres de la superfamille des récepteurs nucléaires de type hormonale. En bref, il s'agit de deux domaines bien conservés dans l'axe évolutif : un domaine DBD pour se lier à l'ADN des RARE sur le promoteur du gène cible et un domaine LBD pour se lier aux ligands hormonaux spécifiques (AR, T3/T4, Vit. D3, etc.). Une jonction souple (hinge) entre les deux domaines DBD et LBD assure une grande liberté d'orientation spatiale-3D, dans l'exercice de leurs couplages ADN/RARE et ligands respectifs. (Fig.17, p.63)



**Figure 17.** Structure de base des RAR et RXR et autres de la superfamille des récepteurs hormonaux (d'après F. Rastinejad, Medical Pharmacology, 2001 )

Plusieurs sous-types de RAR ont été caractérisés sur axe évolutif chez les amphibiens, les oiseaux, les mammifères. Ce sont des récepteurs essentiels à partir de l'embryogénèse, qui contrôlent la régulation de gènes par l'AR. Les sous-types  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  présentent aussi plusieurs isoformes chacun (Ex. RAR $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2, RAR $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\beta$ 3,  $\beta$ 4, et RAR $\gamma$ 1,  $\gamma$ 2) (Mangelsdorf, 1994 ; Chambon 1996, 2004). Les RARs peuvent se coupler avec le tout-*trans* et 9-*cis* AR (Levin et al.1992 ; Evans 2004). Les gènes des RAR $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  sont localisés sur les chromosomes 11, 14 et 15 murins et sur les chromosomes 17, 3 et 12 chez l'humain et semble avoir évolué par duplication d'un gène unique d'un mammifère primitif ancestral (Giguère, 1987,1994 ; Evans 1987,2004). Les différentes isoformes d'RARs gardent leurs spécificités d'expression, tout au long du développement embryonnaire et dans les organismes matures suggérant aussi des fonctions séparées et spécifiques pour ces récepteurs. La répartition des RARs in-vivo varie avec les tissus. Les

isoformes RAR $\alpha$ 1 et  $\alpha$ 2 du gène de RAR $\alpha$ , se différencient par leurs promoteurs distincts. RAR $\alpha$  est bien répartie et hautement exprimé dans certaines régions du cerveau (Giguère et al., 1987 ; de Thé et al., 1989 ; Noji et al. 1989). Parmi eux les RAR $\alpha$ 1 sont majoritaires dans le cerveau, le cœur, les reins, la peau, les muscles, alors que RAR $\alpha$ 2 sont majoritaires dans le foie, les intestins et les poumons (Giguère, 1994 ; (Petkovich M 1992) ; (Davidovici et al. 2007). Pour le gène RAR $\beta$ , c'est parfois l'usage d'un promoteur distinct ou sinon lors d'un même promoteur, c'est l'épissage alternatif qui génère des isoformes. Le gène de RAR $\beta$  est exprimé majoritairement dans les reins, la prostate, l'hypophyse, la glande surrénale et le système nerveux central. Ses isoformes RAR $\beta$ 1 et  $\beta$ 3 ont le même promoteur et sont présentes plus dans la peau et les poumons et le cerveau (Zelent et al., 1991/Livrea 2000 ; Davidovici 2007), alors que les RAR $\beta$ 2 et  $\beta$ 4, aussi générés avec le même promoteur sont présents avec intensités variables dans les reins, le cœur, les muscles, le foie, les poumons, les intestins et le cerveau (Benbrook et al., 1988 ; de Thé et al., 1989). Les RAR $\gamma$ , les RAR $\gamma$ 1 et  $\gamma$ 2 s'expriment dans la peau et les poumons (Zelent et al. 1989, 2000 ; Kastner et al. 1989 ; Noji et al., 1989 ; Davidovici 2007). Les récepteurs RAR $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  contrôlent la régulation de gènes par l'AR tout-*trans*.

Les souris transgéniques avec mutation simple nulle pour les gènes RAR $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  sont viables, mais présentent les mêmes types de perturbations que les nouveau-nés normaux soumis à un régime d'hypovitaminose A chronique (Mark et al., 1999). Par contre, les doubles mutants nuls ne meurent *in utero* ou à la naissance suite aux malformations spécifiques à une carence chronique en vitamine A (Mark et al., 1999). Plusieurs études montrent que l'expression de la CRABP-II augmente l'activité transcriptionnelle des RAR (Dong et al. 1999) ; Budhu et al. 2001). Il a été démontré qu'alors qu'en l'absence de son ligand (AR) la CRABP-II reste localisée prédominant dans le cytoplasme. Elle répond lors de la synthèse cytoplasmique de son ligand (AR) en le liant et se transportant (translocation) ensemble avec l'AR dans le noyau, où elle peut s'associer directement avec le récepteur nucléaire RAR, lui présentant l'AR qui joue ainsi son rôle de ligand nucléaire aussi. (Dong et al. 1999) ;(Delva et al. 1999) ; Budhu and Noy 2002). De plus, le complexe CRABP-II-RAR contrôle et stabilise le cheminement (channeling) du ligand (AR), de la CRABP-II vers le RAR, facilitant ainsi la ligation de l'AR à l'RAR et un meilleur contrôle de l'activité transcriptionnelle subséquente (Delva et al. 1999 ; Budhu et

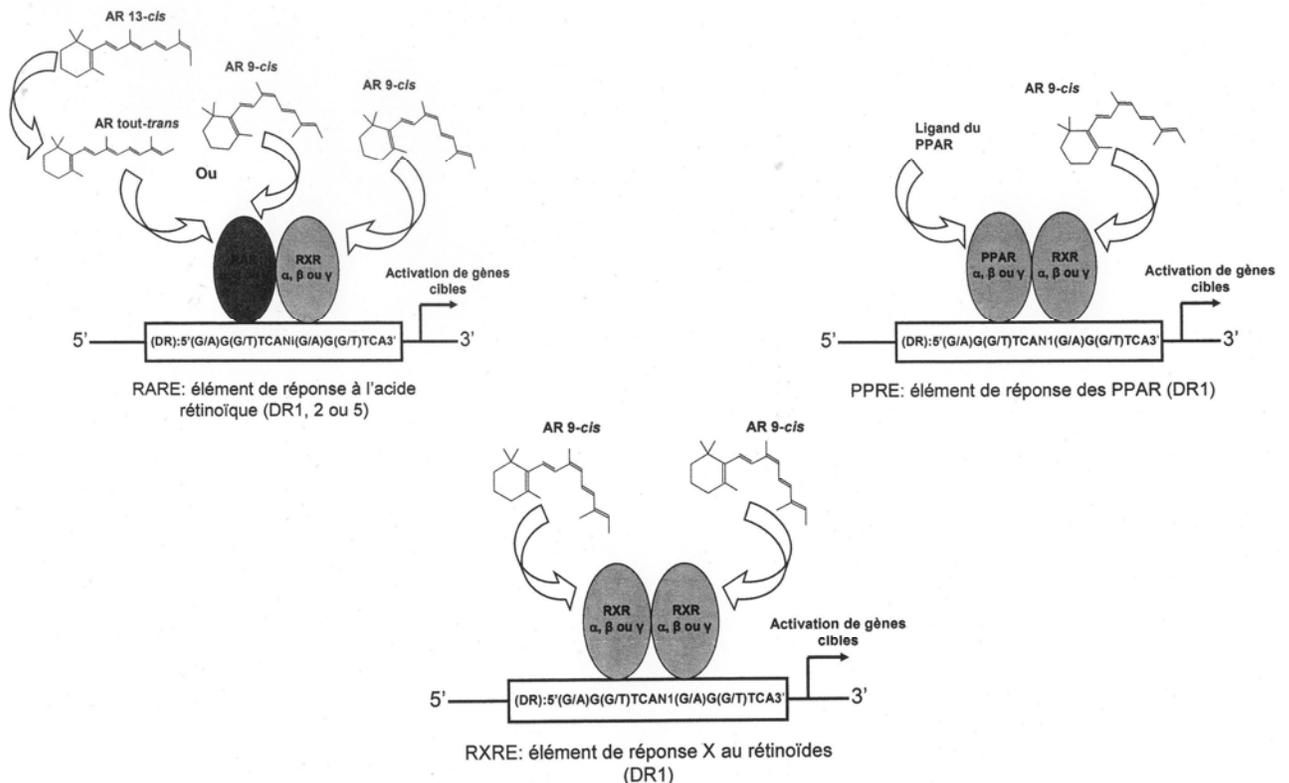
al. 2001 ; Budhu and Noy 2002 ; Blomhoff 2006). La diversité des effets des rétinoïdes dans les tissus s'explique aussi par la diversité des récepteurs nucléaires à l'AR et leurs multiples interactions avec d'autres types de récepteurs nucléaires. (Mangelsdorf 1994 ; Creech Kraft/Livrea 2000 ; Clagett-Dame et DeLuca 2002 ; Blomhoff 2006 ; Davidovici 2007).

#### 4.4.1.2. Les RXRs

Les RXRs (rétinoïdes X récepteurs), une autre classe de récepteurs nucléaires, ressemblants aux RARs et ayant aussi un rôle de facteurs de transcription ont été découverts en 1990 (Mangelsdorf et al. 1990). La séquence en ADNc des RXR à leur domaine C-DBD de liaison à l'ADN est similaire à celle des RAR $\alpha$  (Mangelsdorf et al., 1995 ; Mangelsdorf et Evans, 1995). Trois sous-types de RXR ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ) ont été caractérisés comme étant codés par des gènes différents chez les vertébrés (Gudas, 1994 ; Labreque et al. 1997 ; Szanto et al 2004 ; Blomhoff 2006). Par exemple chez la souris ils sont localisés sur les chromosomes 2, 17 et 1 respectivement (Giguère, 1994). Ces sous-types  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  présentent aussi plusieurs isoformes chacun (Ex. RXR $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2, RXR $\beta$ 1,  $\beta$ 2 et RXR  $\gamma$ 1,  $\gamma$ 2) (Mark et al., 2006).

La distribution tissulaire des RXRs varie selon ses isoformes. Ainsi le RXR $\alpha$  est bien exprimé dans les reins, le foie, la peau, les poumons, la rate, les muscles et un peu moins dans le cerveau, le cœur, l'hypophyse, les testicules, et les intestins (Rowe, 1997 ; Davidovici 2007). RXR $\beta$  est exprimé dans la plupart des tissus, toutefois il est peu présent dans le foie, les testicules et l'intestin. On retrouve le RXR $\gamma$  principalement dans le cœur, les muscles, le foie, le cerveau, les surrénales, le rein, les poumons (Giguère, 1994 ; Mangelsdorf et al.1992 ; Rowe, 1997 ; Davidovici 2007). Les RXR appartiennent au sous-groupe des récepteurs *orphelins* car ils étaient sans ligand hautement spécifique connu lors de leurs découverte (Mangelsdorf et al. 1990) ; Giguère, 1994 ; 2005). L'AR 9-*cis* est le ligand préférentiel des RXRs, bien qu'il existe des rapports d'acceptation de l'AR aussi, comme ligand en conditions de concentrations très élevées d'AR-at (Heyman et al., 1992 ; Levin et al., 1992). Des recherches comparatives, avec des souris transgéniques KO pour les iso- RXRs ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ) montre une prépondérance dans l'activité des RXR $\alpha$  (Krezel et al., 1996).

Les génotypes KO-RXR $\alpha$ -/- meurent in-utero suite à des malformations ophtalmiques et cardiaques typiques pour l'hypovitaminose A embryonnaire chronique (Kastner et al., 1994). Dans l'exercice de leurs activités biologiques, les RXRs se homodimèrisent en RXR/RXR et forment aussi des hétérodimères RAR/RXR avec les RARs et divers autres récepteurs nucléaires (**Fig.18, p.66**) (ex. PPAR/RXR) comme TR, PPAR, VDR. Des recherches sur des souris transgéniques, en multiples combinaisons KO pour divers récepteurs nucléaires impliqués dans les hétéro-dimères des RXR, montrent que le RXR a plus un rôle de régulation-complémentaire de finesse dans diverses voies de signalisation (Steigner et al.1997 ; Kastner et al.1994). Quelques hétérodimers (RXR-RPartenaire) peuvent être activés simplement par le ligand de l'RXR (hétérodimérisation permissive), alors que d'autres non, puisqu'ils demandent absolument le ligand du partenaire pour cela (hétérodimérisation non-permissive) (Shulman 2005 ; Sonoda 2007).



**Figure 18.** Diversité combinatoire : RXR, RAR, PPAR, dans la régulation génique par l'AR (adapté d'après Labo Dr. Pangala V.Bhat /Brodéur H. 2006)

Lors d'une hétérodimérisation **permissive** des RXR avec d'autres récepteurs nucléaires (RXR- RPartenaire), l'hétérodimère peut être activé par les deux ligands indépendamment. Parmi les récepteurs permissifs (a une réponse transcriptionnelle à l'AR 9-*cis*), on trouve les PPARs, LXR, FXR, COUP. (Shulman 2004,2005; Parisotto 2006 ; Sonoda 2007). Lors d'une hétérodimérisation **non-permissive** de RXR avec d'autres récepteurs nucléaires (RXR- RPartenaire), l'hétérodimère RXR- RPartenaire est activé uniquement en présence du ligand du partenaire. Ceci veut dire que l'agoniste (ligand) spécifique du RAR peut à lui seul activer une transcription (via un hétérodimer RXR-RAR), mais RXR ne peut pas faire la même chose (via un hétérodimer RXR-RAR), étant incapable lui, d'induire une transcription en réponse unilatéral à un ligand (agoniste) spécifique pour RXR. Pour partir la transcription, il lui faut ABSOLUMENT la présence du ligand de son partenaire (ici RAR). Ce phénomène appelé "silencing" ou **subordination** de l'RXR est biologiquement important puisqu'il confère identité prioritaire à la voie de signalisation du Partenaire de l'RXR dans un hétérodimer non-permissif et évite ainsi l'activation simultanée de plusieurs voies de signalisation (ex. acide rétinoïque-(AR), hormone thyroïdienne (TR), Vitamine D, etc ).

L'explication biochimique de ce genre de **subordination**, est que l'agoniste (ligand) du RXR est incapable de provoquer, à lui seul, la dissociation du corépresseur sur les hétérodimères RAR/RXR, ce qui empêche le recrutement du co-activateur pour ces hétérodimères. Par conséquent, la seule façon pour un RXR de pouvoir influencer la transcription en réponse à son propre ligand (via un hétérodimer non-permissif genre RXR-RAR) est par la synergie avec des ligands du RAR, ce qui mène à l'augmentation de l'efficacité de l'interaction d'une seule molécule de co-activateur, avec les deux holo-RAR et holo-RXR du hétérodimère. Des exemples de récepteurs non-permissifs (dont RXR reste un partenaire silencieux) sont les TR, VDR, RAR, (Giguère, 1999 ; Shulman 2004,2005; Parisotto 2006 ; Sonoda 2007). En manque de son ligand (agoniste), le récepteur RXR forme des homotétramères. Au moment du couplage d'un ligand (l'AR 9-*cis*), les tétramères se dissocient et il y a changement de conformation du récepteur RXR ce qui évoque une régulation de la formation d'hétérodimères par les RXR avec d'autres récepteurs partenaires (Kersten et al.1998 ; Shulman 2005 ; Sonoda 2007).

Les RXRs sont importants dans l'organisme et sont impliqués dans plusieurs voies métaboliques (comme celle des lipides) (Giguère, 1999 ; Shulman et Mangelsdorf, 2005). Les hétéro-dimères formés par les RXR avec d'autres Partenaires membres de la superfamille des récepteurs nucléaires à stéroïdes et hormone thyroïdienne : (TR), (VDR), avec proliférateurs des peroxysomes (PPAR) ou avec le facteur de transcription COUPTF-II qui est exprimé pendant l'organogenèse, vont se coupler *in vitro* préférentiellement à l'élément spécifique de réponse hormonal (RE) de ces récepteurs Partenaires (Liu et Linney, 1993 ; Nagata et al.1994 ; Dolle et al.1994). Ainsi l'hétéro-dimère RXR-COUPTF-II agit en inhibant la voie de signalisation de l'AR en bloquant l'action de l'hétéro-dimère RAR/RXR (Tsai 1997). Donc la formation de ces hétéro-dimères implique RXR dans la co-régulation de diverses voies métaboliques de signalisation hormonale. Par exemple l'hétéro-dimère PPAR-RXR est impliqué dans le métabolisme des lipides, puisque l'expression des PPAR est induite dans le métabolisme des acides gras où les PPAR sont impliqués dans le stockage et la mobilisation des lipides. Ceci confère aux PPAR la capacité d'être le ligand de nouvelles molécules antiabétiques (ex. TZD, RA, T3/T4 ?) dans le diabète de type 2 (Spiegelman, 1998 ; Blomhoff 2006 ; Ziuouzenkova 2007 ; Manolescu et Bhat 2009). Le **Tableau 4, p.68**, montre des caractéristiques et fonctions des quelques hétéro-dimères communs formés par les RXR.

Hétérodimère	Ligand	Activation/répression transcriptionnelle	Fonctions physiologiques	DR <sub>1</sub>
TR/RXR	hormone thyroïdienne	activation	croissance	4
PPAR/RXR	9-cis AR	activation	contrôle du métabolisme lipidique et glucidique	1
VDR/RXR	vitamine D	activation	croissance, physiologie osseuse	3
COUPTFII/RXR	9-cis AR et tout-trans AR	répression	inhibe la voie de signalisation de l'AR	1

**Tableau 4.** Caractéristiques et fonctions des quelques hétéro-dimères formés par les RXR (adapté d'après Labo Dr. Pangala V.Bhat /Gagnon I. 2002)

Certaines études suggèrent aussi une activité non-génomique pour les RXR et ont questionné la localisation exclusivement nucléaire de RXR et ont démontré qu'il était capable de faire l'aller-retour entre le noyau et le cytoplasme (Katagiri et al., 2000; Prufer and Barsony, 2002). Par exemple RXR (via sa liaison avec TR3) serait responsable de l'export nucléaire de TR3 vers la mitochondrie, phénomène non inductible par le ligand et qui peut au contraire être inhibé par un agoniste de RXR (Cao et al., 2004). Un autre article montre que le traitement des cellules gastriques par l'AR 9-*cis*, induit la translocation du complexe TR3-RXR à la mitochondrie et l'apoptose des cellules (Lin et al., 2004b). Dans ce cas, la translocation serait dépendante de l'activation de RXR par son ligand. Le rôle joué par l'agoniste de RXR reste à préciser ainsi que les signaux potentiels qui induiraient cette translocation suite au signal proapoptotique. Ainsi RXR, via une activité non génomique, peut contribuer à l'induction de l'apoptose dans différents types cellulaires.

#### 4.4.2 RARE - Les éléments de réponse des récepteurs à l'AR- (RARE and RXRE)

Les homodimères et/ou les hétérodimères des RARs, RXRs et autres RPartenaires, contrôlent l'expression des gènes en se liant aux promoteurs, sur des séquences cibles d'ADN qui sont de éléments de réponse à l'acide rétinoïque (RARE) et/ou des éléments de réponse à X-rétinoïdes(RXRE). (Umesono et al.1991; Balmer 2005; Davidovici 2007) . Les séquences d'ADN des RARE sont des répétitions directes (DRn) des deux tronçons de séquence (type 5'-AGGTCA-3'; deux demi-sites (a/g)g(g/t)tca), sens-orientées (5'-3') et espacées de n= 2 ou 5 nucléotides (DRn = DR2-DR5), alors que les séquences ADN des RXRE on typiquement leurs DR séparées par un seul nucléotide (DR1). Ainsi l'hétérodimère RAR/RXR reconnaît les DR1, DR2 et DR5 selon leur polarité de fixation sur l'ADN alors que les DR1 sont reconnus par l'homodimère RXR/RXR. ( Soprano et al 2004; Balmer et Blomhoff 2005).Chez les RAREs et RXREs, la distance (1,2,ou5 nucléotides) entre ces séquences répétées des nucléotides 5'- (a/g)g(g/t)tca)- 3', détermine la nature du dimère et sa polarité de fixation sur l'ADN. Plusieurs RARE type DR5 sont en amont des gènes de RAR $\alpha$ 2 (Leroy et al.1991), RAR $\beta$ 2 (De Thé et al.1990) et RAR $\gamma$ 2 (Lehmann et al.1992). Les RARE des récepteurs nucléaires hormonaux de type II se ressemblent (**Fig.16B, p.62; Fig.18,p.66**).Ainsi pour les RXR et RAR les éléments de réponse (RXRE et RARE) sont formés par deux répétitions directes de la séquence 5'-AGGTCA-3', séparées par un ou 2 et 5 nucléotides respectivement (DR1, DR2 et DR5).

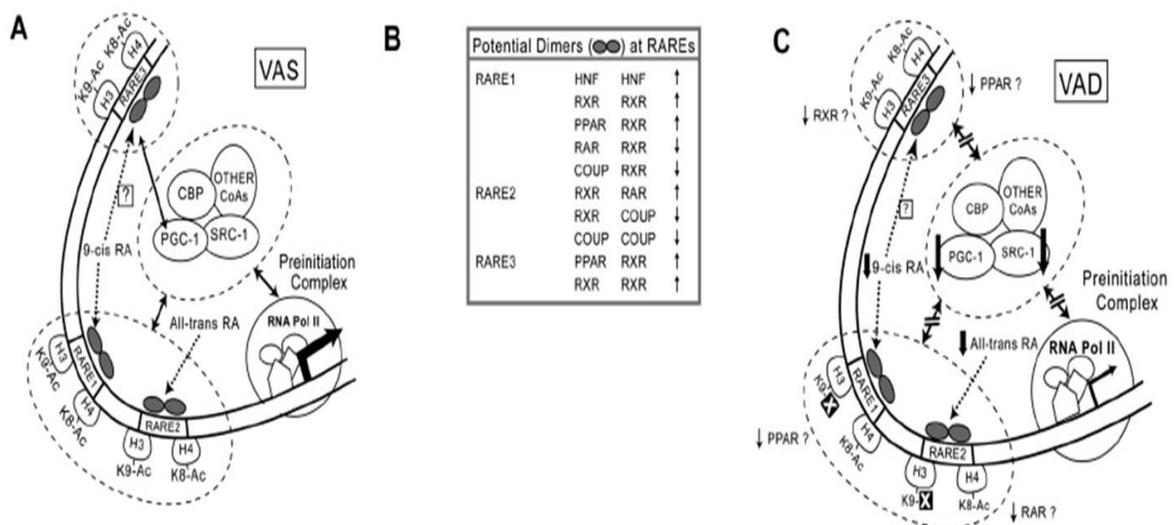
La séquence du domaine de liaison **DBD** des récepteurs nucléaires, à l'ADN de l'élément de réponse **(RE)** (domaine C ou **domaine DBD** pour liaison à l'ADN de l'élément de réponse **(RE)** du promoteur des gènes contrôlés) des récepteurs nucléaires hormonaux est bien préservée sur l'axe évolutif. La régulation de gènes est orientée, bien individualisée et répond uniquement à certains couples de récepteurs nucléaires bien spécifiques. En fait la simple distance/pas-de-nucléotides (ex. DR1,DR2,DR5) entre les répétitions directes de la séquence 5'-AGGTCA-3' sur les RARE et RAXR, peut déjà déterminer la spécificité de liaison des homodimères RXR-RXR ou hétérodimères RXR-RAR ou RXR- RPartenaire receptoriels à l'ADN de l'élément de réponse **(RE)** du promoteur des gènes contrôlés (Umesono et al., 1991; Shulman et Mangeldorf, 2005).

A ce sujet, la longueur de cette distance/pas-de-nucléotides (ex.DR1,DR2,DR5) , influence plus ( que la séquence exacte de nucléotides type 5'-AGGTCA-3' sur les RARE et RAXR) la spécificité d'une liaison ( RXR-RAR ou RXR- RPartenaire à l'ADN de l'élément de réponse **(RE)** du promoteur des gènes contrôlés) (Rastinejad et al., 2000;2001). A titre d'exemple si on modifiait cette distance/pas-de-nucléotides (DR1,DR2,DR5) entre les deux demi-sites 5'- (a/g)g(g/t)tca)- 3' sur l'élément de réponse **(RE)**, il est parfaitement possible de changer les homodimères RXR-RXR ou hétérodimères RXR-RAR ou RXR- RPartenaire receptoriels qui vont se lier à l'ADN de l'élément de réponse **(RE)** du promoteur des gènes contrôlés (Rastinejad 2001).

Selon la règle, les séquences d'ADN des RARE sont des répétitions directes (DR) des nucléotides ( Soprano et al 2004; Balmer et Blomhoff 2005) espacées de 2 ou 5 nucléotides (DR2-DR5), alors que les séquences ADN des RXRE on typiquement leurs DR separées par un seule nucléotide (DR1). Divers auteurs ont examiné plusieurs combinaisons ( Rastinejad 2001, Shaffer 2004) et concluent que les **DR1** lient les hétérodimères de RXR-RAR, -PPAR, -COUP et -HNF-4, les **DR2** lient les hétérodimères de RXR-PPAR et -RAR, les **DR3** lient les hétérodimères RXR-VDR, les **DR4** lient les hétérodimères RXR-TR, -LXR et -CAR, et les **DR5** lient les hétérodimères RXR-RAR et RXR-NGFI-B (Rastinejad 2001). La présence de RXR dans tous ces dimères n'établit pas une régulation unilatérale de ces gènes par l'AR via son récepteur RXR. Cela est fonction d'une dimérisation permissive ou non-permissive. Si la dimérisation est permissive, alors elle permet au ligand de RXR de réguler la transcription à lui seul. Si la dimérisation est non-permissive elle exige la présence du ligand du RPartenaire de RXR pour permettre que des hétérodimères

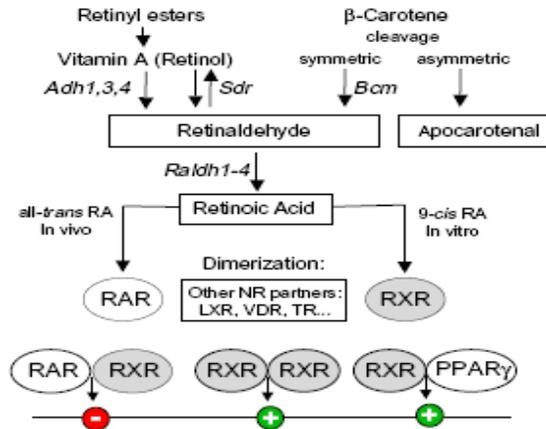
non-permissifs RXR-RPartenaire, deviennent actifs et puissent régulariser la transcription du gène cible (Giguère, 1999; Shulman 2004,2005; Parisotto 2006 ; Sonoda 2007). La polarité du récepteur RXR en 5' ou 3' peut avoir un effet de répression ou d'activation sur la transcription, comme chez les hétérodimères RAR-RXR (DR1) et RXR-RAR (DR5) respectivement (Rastinejad, 2001). Habituellement le récepteur RXR se trouve sur le demi-site en 5' et ses Partenaires sur le demi-site en 3'. Sur un élément DR1, la polarité est inversée, avec RXR en 3' et le Partenaire en 5' (Rastinejad et al., 2000).

Certains gènes possèdent même plusieurs éléments de réponse à l'AR (RAREs) sur leur segment ADN promoteur de la transcription (ex. RARE1, RARE2, RARE3-chacun avec sa répétition directe (DR) de nucléotides). Comme exemple le gène PEPCK (phosphoenolpyruvate carboxykinase) du foie de rat, possède un premier RARE1-DR1 localisé en demi-site 5' entre -451 et -439 pb relativement au lieu du début de la transcription de ce gène (Lucas et al. 1991) mais aussi un deuxième RARE2-DR5 localisé en demi-site 5' entre -337 et -321 pb toujours sur le segment ADN du promoteur de la transcription du gène ( Scott et al. 1996). Les deux peuvent lier les récepteurs RAR et RXR des hétérodimères RAR/RXR. De plus il y a un troisième RARE3-DR1, situé entre -999 et -987 pb sur le promoteur du même gène, qui lui peut lier les RXR (Shin et al. 2002) dans diverses combinaisons de dimères (RAR/RXR, PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$ , PPAR $\alpha$ /RXR $\alpha$  etc. ) pouvant lier aussi le récepteur PPAR $\alpha$  de ces hétérodimères ( **Fig.19,p.71**-donnée a titre informatif)



**Figure 19.** Rétinoïdes et système multi-RARE. Régulation du gène PEPCK par l'AR (Shin et al. 2002)

**En résumé**, le métabolisme des rétinoïdes, de l'alimentation jusqu'au catabolisme est orienté vers le contrôle optimal de l'AR (**Tab.5, p.72**). L'AR contrôle l'expression génique (répression ou induction), principalement comme ligand pour les RAR et RXR qui ensemble avec d'autres récepteurs nucléaires, assurent par couplage aux éléments de réponse (RARE) (et pas seulement) une régulation très diversifiée de la transcription de gènes, avec en résultat une grande diversité des fonctions biologiques. (**Fig.20,p.72**)



**Figure 20.** Régulation génique par l'AR, dans le contexte du métabolisme général des rétinoïdes (d'après Ziouzenkova, 2008)

Enzymes métaboliques	tout-trans	9-cis	13-cis	Référence Pubmed
<b>Famille ADH</b>				
ADH1	+ (Rol/Ral)	+ (Rol/Ral)	-	15096205, 10358022
ADH3	+ (Rol)	?	?	11959987, 12782305, 12027900, 8239669
ADH4	+ (Rol/Ral)	+ (Rol/Ral)	+ (Rol/Ral)	9600267, 15096205, 8239669
<b>Famille RALDH</b>				
RALDH1	+ (Ral)	+ (Ral)	+* (Ral)	8329181, 1527087, 8110799, 12754104
RALDH2	+ (Ral)	+ (Ral)	+ (Ral)	11983430
RALDH3	+ (Ral)	?	?	1158573, 11013254
RALDH4	-	+ (Ral)	+/- (Ral)	12519776, 1100779
<b>Famille CYP26</b>				
CYP26A1	+ (RA)	- (RA)	- (RA)	9716180, 9740237
CYP26B1	+ (RA)	- (RA)	- (RA)	14532297
CYP26C1	+ (RA)	+ (RA)	- (RA)	14532297
Protéines de liaison	tout-trans	9-cis	13-cis	Référence Pubmed
<b>CRBPs</b>				
CRBPI	+ (Rol)	- (Rol)	+ (Rol)	6537950, 3611082, 7781925
CRBPII	+ (Rol/Ral)	- (Rol)	+ (Rol)	1542003, 3611082, 7781925
CRBPIII	+ (Rol)	+ (Rol)	+ (Rol)	11022035
<b>CRABPs</b>				
CRABPI	+ (RA)	-	-	1653241, 8382035, 8380496, 7704533, 8408005, 7947970
CRABPII	+ (RA)	-	-	8408005, 8382035, 8380496, 7947970
Récepteurs	tout-trans	9-cis	13-cis	Référence Pubmed
RARs	+ (RA)	+ (RA)	-	8380496, 2825025
RXR	-	+ (RA)	-	8380496, 1309942

**Tableau 5.** Quelques spécificités de substrat (rétinoïdes) des protéines du métabolisme de l'AR (adapté d'après Labo Dr. Pangala V.Bhat /Brodeur H. 2006)

## 5.) EFFETS PHYSIOLOGIQUES ET IMPLICATIONS CLINIQUES

En dehors du mécanisme de la vision, les effets physiologiques de la vitamine A sont l'expression phénotypique du couplage de l'AR en tant que ligand aux récepteurs nucléaires RAR et RXR. Plusieurs voies métaboliques sont influencées simultanément ou subséquentement par la vitamine A et les rétinoïdes, de sorte qu'un déficit en vitamine A affecte tant l'intégrité épithéliale, que l'immunité ou la vision, etc. Ainsi un trouble grave de métabolisme de la vitamine A dans un système physiologique, peut engendrer des conséquences pathologiques en cascade sur d'autres fonctionnalités de l'organisme. Lorsque nécessaire, une supplémentation thérapeutique avec ROL ou AR peut prévenir ou annuler les impacts pathologiques d'une hypovitaminose A (Thompson et al., 1964 ; Olson/Livrea 2000 ; Blomhoff 2006 ; Moise 2007). On estime à plus de 500 le nombre de gènes directement ou indirectement contrôlés par l'AR (Balmer and Blomhoff 2002) ; Blomhoff 2006). La **régulation directe** d'un gène par l'AR est réalisée via les récepteurs nucléaires RAR et RXR, qui sont impliqués dans l'activation ou bien la répression du gène suite à leur action sur un élément de réponse (RARE) localisé dans le promoteur du gène (Guidez and Zelent/Livrea 2000 ; Balmer et Blomhoff 2002 ; Blomhoff 2006 ; Davidovici 2007 ; Ziouzenkova 2007 ; Nezzar 2007). Les gènes ainsi régulés peuvent être ceux responsables du métabolisme et la biologie spécifique des rétinoïdes mais aussi d'autres gènes (Balmer et Blomhoff, 2002).

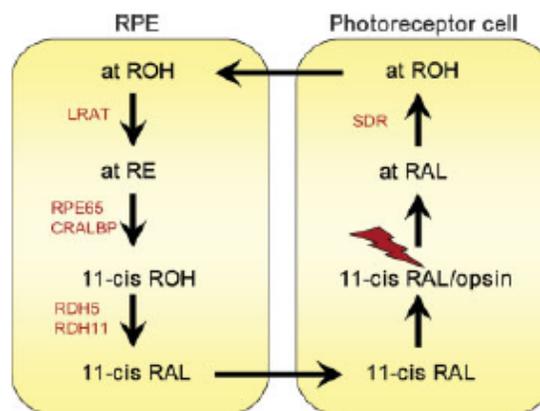
On peut parler aussi de **régulation indirecte** (ou subséquente) lorsqu'un gène est activé par un autre gène qui lui est absolument sujet à une **régulation directe** par l'AR. La régulation indirecte peut également avoir lieu au niveau de la stabilité de l'ARNm. On ne connaît pas encore d'une manière exhaustive tous les gènes appartenant à l'une ou l'autre de ces deux catégories (Balmer et Blomhoff, 2005). L'AR est un agent bénéfique dans plusieurs maladies mais les rétinoïdes en excès sont toxiques *In-vivo* (l'AR l'est plus que le ROL) et provoquent des troubles spécifiques aux hypervitaminoses A excessives (développement, métabolisme, mortalité, etc.) dont des malformations embryonnaires (Lohnes et al., 1994 ; Creech Kraft/Livrea 2000 ; Duester 2000 ; Clagett-Dame et De Luca 2002 ; Nadeau 2005/NUT 5050/UdeM). Le déficit en rétinoïdes est aussi néfaste de sorte que dans le cas des rétinoïdes on peut vraiment dire que trop est aussi mauvais que pas assez.

Les recherches ont démontré que le complexe RA-RAR/RXR peut aussi réguler indirectement l'expression génique des RARE, en régulant la transactivation d'autres facteurs de transcription. En conclusion il y a une grande diversité dans la régulation de l'expression génique, car le complexe RA-RAR/RXR peut moduler la transcription génique (par activation ou répression) via des mécanismes distincts, qui peuvent être génomiques (avec ou sans liaison à des éléments RARE) ou même non-génomiques (par des mécanismes ligand-dépendants ou -indépendants) (Blomhoff, 2006). L'AR possède également des activités non-génomiques *in-vivo* (Blomhoff 2006) comme modulateur de l'activité de certaines enzymes (ex. PKC $\alpha$ -protéine kinase C- (Radomska-Pandya et al. 2000, Ochoa et al. 2003), stimulateur du turnover de certains neurotransmetteurs (acétylcholine dans les synapses neuronales en formation – Liao et al 2004), blocage de la Ca<sup>2+</sup>-ATPase (calcium-magnésium-dépendent adénosine triphosphatase) par compétition avec les activateurs thyroïdiens T3 et T4( thyroxine) (Nutrition Reviews 1989/ Blomhoff 2006).

## 5.1 LA VISION

Les difficultés de vision crépusculaire et nocturne sont connues depuis l'antiquité. En 1917 une recherche nutritionnelle a démontré l'implication d'une hypovitaminose chronique de la Vit A dans les pathologies de la vue chez les enfants (Bloch, 1919). Plusieurs études ont expliqué ensuite l'implication des rétinoïdes dans un cycle visuel, d'isomérisation des ROL et RAL lors d'une constitution-reconstitution de pigments photosensibles, qui se répète rapidement dans l'œil (quelques minutes et moins) (Wald 1939 ; Dowling 1960 ; Vogt 1983 ; Matsui 1988 ; Shimazaki 1995 ; Gardner 1995 ; Han 1998 ; Crouch et Ma/Livrea 2000 ; Baehr et al 2003 ; Kumbalasiri et Provencio 2005). Chez les vertébrés, notamment dans les cellules épithéliales pigmentaires (RPE) et les cellules photo-réceptrices de l'œil, les rétinoïdes forment un cycle visuel dans lequel le 11-*cis* RAL est couplé à l'opsine pour former la rhodopsine (pigment mauve) (Crouch et Ma/Livrea 2000 ; Baehr 2003 ; Radu et al 2004 ; Moiseyev et al 2005). Le complexe est photosensible et sous l'influence de la lumière, le 11-*cis* RAL isomérisé en tout-*trans* RAL et le nouveau complexe tout-*trans* RAL-opsine prend une couleur jaune. Ensuite le tout-*trans* RAL est libéré de l'opsine pour être réduit en tout-*trans* ROL. Dans le processus de son estérification en RE-tout-*trans*, le at-ROL est presque simultanément isomérisé et hydrolysé pour former le 11-*cis* ROL.

Le cycle visuel repart lorsque le 11-cis ROL est oxydé à nouveau en 11-*cis* RAL (McCaffery et al, 1996 ; Yamamoto et al 1999 ; Duester 2000 ; Wolf, 2001 ; Golapalli and Rando, 2004),(Fig.21, p.75). L'AR n'est pas directement impliqué dans le cycle visuel. Dans le cycle visuel les acteurs principaux sont les isomères 11cis-ROL et 11-cis RAL, ensemble avec leur protéine cellulaire de liaison CRALBP. Cette protéine de liaison peut lier les deux isomères 11cis (ROL et RAL) et est exprimée dans les cellules épithéliales pigmentées de la rétine, les cellules de Muller et dans la glande pinéale (épiphyse). L'isomérisation du at-ROL en 11cis-ROL est extrêmement réduite en absence du CRALBP (KOMice-/-) ce qui affecte le cycle de la vue. La CRALBP semble avoir un rôle d'accepteur de 11cis-ROL suite a la réaction d'isomérohydrolyse et facilite son oxydation en 11cis-RAL (Saari et al 2001 ; Blomhoff 2006). L'acuité de la vision est un marqueur d'une hypovitaminose A chronique et indique une baisse de Vit A circulante, donc une baisse marquée des réserves de Vit A dans le foie. Une telle carence en Vit.A affecte aussi la structure même de l'œil car les cellules épithéliales, la conjonctive et la cornée, s'assèchent et se kératinisent (tâche de Bitot, dermomalacie, etc.) (Crouch et Ma/Livrea 2000 ; McLaren et Friggs 2002, Blomhoff 2006). Dans les cas d'une hypovitaminose A pas trop grande, il est possible de renverser ces effets par une alimentation et une supplémentation adéquates en Vit A.



**Figure 21.** Le cycle visuel des rétinoïdes chez les vertébrés (Blomhoff and Blomhoff, 2006)

## 5.2 TÉGUMENTS, PEAU ET L'INTÉGRITÉ ÉPITHÉLIALE

Les tissus épithéliaux/tégumentaires (ex. la peau, les diverses muqueuses) couvrent les surfaces des divers organes et structures du corps, ayant un rôle protecteur de première ligne, contre des facteurs exogènes (physiques, chimiques ou biologiques), potentiellement

nuisibles à l'organisme. En fonction de leurs localisations, les divers tissus épithéliaux possèdent aussi de multiples fonctions (sécrétoire, absorbante, métabolismes diverses, barrière physique par l'intégrité épithéliale, etc.) qui sont influencées directement ou indirectement par la concentration en Vit. A et son métabolite l'AR. (Magro et Crowson 1997 ; Kang et Fisher/Livrea 2000 ; Davidovici 2007). Par exemple les cellules prismatiques simples de la base de l'épiderme tégumentaire, se différencient en kératinocytes vers la surface de la peau, par un processus synchronisé avec une diminution métaboliquement normale de la concentration d'AR. Mais dans les cas d'hypovitaminose A chronique sévère, le métabolisme des divers tissus tégumentaires et épithéliaux est gravement perturbé et diverses maladies peuvent apparaître (dessèchement-momification, kératoses, scléroses, liquéfaction cornéenne, cancers). Divers cancers originant des organes internes (ex. les intestins, les poumons et l'estomac) débutent à l'épithélium de ces organes.

À un stade précoce ces processus dégénératifs sont réversibles par l'augmentation d'apport de rétinoïdes l'AR et le ROL étant régulièrement employé pour traiter des affections comme l'acné, le psoriasis et le vieillissement prématuré de la peau, etc. (Kang et Fisher/Livrea 2000 ; Geilen/Livrea 2000 ; Bajogli/Livrea 2000). Dans des buts thérapeutiques bien spécifiques, l'industrie pharmaceutique a produit plusieurs crèmes, lotions ou comprimés qui contiennent du ROL, de l'AR tout-*trans* ou 13-*cis* ou des principes actifs pour augmenter la quantité endogène d'AR dans les tissus via son axe métabolique (ex. augmenter la synthèse et/ou retarder son catabolisme). (Klein/Livrea 2000 ; Dawson/Livrea 2000 ; Blomhoff 2006 ; Moise 2007 ; Davidovici 2007). La recherche s'oriente vers l'obtention de rétinoïdes synthétiques qui peuvent avoir les mêmes effets bénéfiques mais sans les effets secondaires de l'AR en excès.

### **5.3 LE SYSTÈME IMMUNITAIRE**

Des recherches et observations dans des zones géographiques connues pour des phénomènes de malnutrition endémique, ont établi plusieurs corrélations directes entre les risques et l'incidence des infections divers et les carences nutritionnelles en rétinoïdes. Des enfants en bas âge avec un signe clair d'hypovitaminose A (Bitot, xérophtalmie), sont beaucoup plus souvent sujets à des infections opportunistes que les enfants du même groupe d'âge qui ont un apport suffisant en Vit. A (Semba/Livrea 2000 ; Stephensen, 2001 ; Blomhoff 2006).

Les infections les plus communes comme la diarrhée, les infections respiratoires et la rougeole, ont pour conséquence un encore plus grand appauvrissement du corps en Vit.A (pertes, absorption perturbée, etc.) causant un cercle vicieux de dégradation des fonctions vitales de l'organisme, parfois même le décès. Autant l'immunité innée que celle acquise, sont perturbées par une carence pathologique chronique de la Vit A. D'autre part les téguments et les muqueuses des voies respiratoires, intestinales et uro-génitales, barrières de protection physico-chimique normalement efficaces, s'assèchent, diminuent leurs sécrétions et présentent une faible résistance aux infections (Semba/Livrea 2000 ; (Stephensen 2001). La formule leucocytaire est perturbée dans le sens d'une augmentation des neutrophiles, mais leur efficacité est abaissée dans l'ensemble. Les macrophages perdent leur capacité de phagocytose et les lymphocytes T leur efficacité antivirale (Ross/Livrea 2000 ; Stephensen, 2001). Dans le processus de l'immunité acquise, la vitamine A peut affecter la production et la maturation des lymphocytes et augmenter ou diminuer la production d'anticorps par les cellules B et de cytokines par les cellules T (Ross/Livrea 2000 ; (Villamor and Fawzi 2005) ; Blomhoff 2006).

#### **5.4 DIVERS CANCERS. Leucémie aigüe pro-myélocytaire**

Les propriétés de l'AR d'inducteur de différenciation cellulaire et d'apoptose par inhibition mitotique font de lui un excellent antiproliférateur, qui est utilisé dans la chimoprévention et le traitement de différentes formes de cancer (léucémie, sein, peau, poumon, prostate, etc), souvent, en combinaison avec d'autres agents (interféron, radiothérapies, chirurgie, etc.) (Bertram/Livrea 2000 ; Toma/Livrea 2000 ; Lotan/Livrea 2000 ; Fenaux/Livrea 2000 ; Niles 2004 ; (Bertram and Vine 2005) ; (Moise et al. 2007). La perturbation métabolique des récepteurs à l'AR ainsi que des altérations de la synthèse des rétinoïdes sont souvent impliqués dans les processus pathologiques de la carcinogénèse (Bertram/Livrea 2000 ; Klein/Livrea 2000 ; Moise 2007). Par exemple, le promoteur de RALDH2 est hyperméthylé dans le cancer de la prostate. Ceci rend le gène silencieux empêchant ainsi la production d'AR. (Kim et al., 2005) Un autre exemple, dans les cellules mammaires cancéreuses MCF-7, RALDH3 n'est pas exprimé et les cellules ne peuvent pas synthétiser l'AR à partir de ROL (Toma/Livrea 2000 ; Mira-y-Lopez et al., 2000 ; Rexer et al., 2001 ; Parisotto et Bhat 2008).

Une translocation chromosomale t (15 ; 17) (Larson et al., 1984 ; deThé et al., 1991) qui résulte de la fusion du gène PML sur le chromosome humain 15 avec le gène RAR $\alpha$  sur le chromosome 17 (Benett 1976, 1980; Kakizuka et al., 1991 ; Guidez et Zelent/Livrea 2000 ; Fenaux/Livrea 2000) est spécifique dans la leucémie aigüe promyélocytaire. Puisque la rupture dans le gène RAR $\alpha$  est toujours dans le second intron, les protéines de fusion (PML/RAR $\alpha$  et RAR $\alpha$ /PML), varient en longueur selon le point de rupture dans le gène PML (Chomienne et al., 1996 ; Guidez et Zelent/Livrea 2000). Chez les patients malades de cette forme de leucémie, le développement des cellules promyélocytaïres est arrêté au niveau de leur différenciation. La conséquence est une accumulation de granulocytes dans la moëlle osseuse et le sang qui mène à des hémorragies mortelles (Tallman 1992 ; Fenaux et Degos/Livrea 2000 ; Lengfelder et al., 2005).

Le récepteur mutant PML/RAR $\alpha$  comme le RAR $\alpha$  normal, peut inhiber la transcription des gènes, mais malheureusement le couplage du ligand AR sur ce récepteur mutant PML/RAR $\alpha$ , ne déverrouille pas le promoteur et n'active pas la machinerie de transcription des gènes, comme cela se passe avec le récepteur RAR $\alpha$  normal (Melnick et Licht, 1999 ; Guidez et Zelent/Livrea 2000 ; Fenaux et Degos/Livrea 2000). La cause de cette situation, réside peut-être dans une liaison plus forte avec les corépresseurs SMRT et N-CoR, dans le cas du récepteur mutant PML/RAR $\alpha$  que dans le cas du récepteur RAR $\alpha$  normal et uniquement des doses plus grandes d'AR pourront induire la dissociation du complexe (Huang 1988 ; Head 1994 ; Bassan 1995 ; Melnick et Licht, 1999). Un autre mécanisme d'inhibition de la transcription des gènes est la capture du récepteur RXR par le récepteur mutant PML/RAR $\alpha$ , ce qui empêche les dimérisations normales des RXR avec d'autres récepteurs nucléaires comme VDR et PPAR (Melnick et Licht, 1999 ; Guidez et Zelent/Livrea 2000 ; Fenaux et Degos/Livrea 2000).

Le traitement de la leucémie aigüe promyélocytaire (APL) avec l'AR, basé sur le fait que des concentrations thérapeutiques d'AR, permettent une dissociation entre les corépresseurs et le récepteur mutant PML/RAR $\alpha$  et par conséquent induisent la transcription de gènes responsables de la différenciation des cellules promyélocytaïres, a permis des guérisons spectaculaires et même une rémission complète de la maladie ( Huang 1988 ; Dombret 1992 ; Head 1994 ; Bassan 1995 ). Pour prévenir l'installation précoce d'une résistance rétinolde-spécifique, le traitement à l'AR peut être combiné à

d'autres traitements de chimiothérapie classique avec anthracyclines ou cytosine arabinoside (AraC) (Bernard 1973 ; Thomas 1991 ; Lengfelder et al., 2005). Il faut néanmoins surveiller attentivement ces thérapies pour éviter le plus possible les effets secondaires néfastes d'un excès d'AR (le syndrome d'AR). Une greffe de moelle osseuse peut aussi être utilisée.

### **5.5 ORGANOGÉNESE ET DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE**

Depuis les années 1930, on sait que la vitamine A a un effet majeur sur le développement embryonnaire. Une hypovitaminose A chronique sévère chez la mère enceinte, engendre des malformations congénitales qui peuvent mener à la mort de l'embryon. Paradoxalement les excès en Vit.A et surtout en AR engendrent les mêmes effets. (Creech Kraft/Livrea 2000 ; Ross et al., 2000 ; Clagett-Dame et DeLuca 2002). L'administration locale d'AR exogène sur des régions précises du cœur d'embryons de cailles a mené à la duplication du cœur (*cardia bifida*), au *situs inversus* et d'autres anomalies (Dickman et Smith, 1996; Osmond et al., 1991). Avec l'identification des récepteurs nucléaires spécifiques pour les rétinoïdes (RAR et RXR) l'impact de la vitamine A sur l'embryogénèse fut grandement attribué à son métabolite actif, l'AR, le ligand de ces récepteurs (RAR et RXR). Des recherches combinées sur des souris transgéniques KO de plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme du ROL, ont permis de voir que les effets positifs du ROL sur la sauvegarde des fœtus sont dus à sa transformation en AR dans les cellules des embryons. Ainsi, dans l'embryogénèse, l'AR est impliqué d'une façon essentielle dans les développements du cœur et le système cardio-vasculaire, reins et système urogénital, l'œil, système nerveux central, système respiratoire, etc. (Zile 1998 ; Creech Kraft/Livrea 2000). Parmi d'autres organes affectés, il y a l'oreille interne (Romand et al., 2001), le pharynx (Niederreither et al., 2003) les sommités et la formation de l'asymétrie du corps (Vermot et al., 2006). Chez les souris RALDH2-KO le développement du cœur et la différenciation des cardiomyocytes sont affectés par le manque d'AR dû à la non-expression de RALDH2 (Niederreither et al.2001). Il y a arrêt dans l'organogénèse rénale de ces souris RALDH2-K.O., ce qui montre le besoin d'AR pour la néphrogénèse et le développement normal des reins. (Niederreither et al.1999 ; Goodyer 2005 ; Manolescu et Bhat 2008). Les embryons peuvent être rescapés par apport d'AR à la souris gestante (*at-RA*, 25mg/kgCorps/2 fois par jour) confirmant que la RALDH2 est critique dans la synthèse de l'AR embryonnaire (Berggren et al. 2001).

Un apport adéquat d'AR assure aussi la néphrogenèse et le développement rénal normal (Makrakis, 2007 ; Manolescu et Bhat 2008). Il existe cependant certaines anomalies chez ces animaux, comme des troncs plus courts (Niederreither et al., 1999, 2000, 2001, 2002). L'AR administré prévient les malformations jusqu'au jour 8,5 environ, par la suite, si de l'AR est encore administré, des effets tératogènes semblables à de l'hypervitaminose A peuvent être observés (Creech Kraft/Livrea 2000 ; Mic et al., 2002 ; Clagett-Dame et DeLuca 2002).

## **5.6 AUTRES IMPLICATIONS BIOLOGIQUES DES RÉTINOÏDES**

Les rétinoïdes sont très impliqués dans les multiples voies métaboliques de plusieurs systèmes de l'organisme, majoritairement via leurs récepteurs nucléaires RAR et RXR. Pour énumérer quelques implications de plus (par rapport à celles déjà mentionnées préalablement dans différents chapitres de ce Mémoire) les rétinoïdes régulent l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme des triglycérides qui est très important pour la santé cardiovasculaire (Staels, 2001 ; Silha 2007). Ils sont aussi essentiels pour le développement du système nerveux central du fœtus, mais également pour les fonctions du cerveau adulte car ils sont impliqués dans la mémoire et l'apprentissage et dans la prévention de la maladie d'Alzheimer (Lane et Bailey, 2005). De plus, plusieurs gènes régulés par l'AR et les hormones thyroïdiennes dans le cerveau font partie de processus pathologiques retrouvés dans plusieurs maladies neuronales dégénératives (Palha et Goodman, 2005).

Une autre pathologie influencée par le status de la Vit.A est le syndrome d'alcoolisme fœtal, dans lequel les malformations crânio-faciales des fœtus correspondent aux organes qui nécessitent la vitamine A et ses métabolites (AR) pour une bonne organogénèse. Dans le syndrome d'alcoolisme fœtal, la synthèse d'AR est inhibée par la présence d'éthanol qui compétitionne d'une façon préférentielle avec le ROL pour l'oxydation par les rétinol-déshydrogénases (RDH). A rappeler aussi l'implication des RXR et de ses partenaires d'hétérodimérisation (ex. PPAR, TR) et des molécules des voies métaboliques des rétinoïdes en général (ex. RBP, CRBP, CRABP, RDH, RALDH, CYP26A) dans le syndrome métabolique caractérisé par de l'obésité, de l'hypertension, la résistance à l'insuline, le diabète de type II et les maladies cardiovasculaires (Shulman et Mangelsdorf, 2005 ; Gavi 2007 ; Aeberli 2007 ; Manolescu et Bhat 2009).

## 6.) HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

La Vitamine A (ROL), par son métabolite actif AR- acide rétinoïque, est essentielle pour un déroulement normal de l'embryogénèse, ayant un rôle important dans le développement de plusieurs organes, dont les reins. Chez les humains la formation de néphrons se termine après 36 semaines de gestation et des études montrent qu'une baisse du niveau maternel de Vit. A durant la grossesse, affecte le nombre final de néphrons du nouveau-né. Chez les animaux il en résulte jusqu'à 20% des néphrons de moins et à long terme possiblement l'hypertension ou défaillance rénale. Dans l'embryon, les taux d'AR font l'objet d'un équilibre métabolique de finesse, étant donné que l'excès comme l'insuffisance d'AR engendrent des malformations. Outre un apport adéquat de ROL de la mère, les différentes molécules de métabolisme de l'AR (transport et liaisons (RBP, CRBP, CRABP), oxydation cellulaire du ROL vers RAL et ensuite RA (RDH, RALDH) catabolisme de l'AR (CYP26A1, B1) affectent les taux d'AR dans l'organogénèse. Une déficience fœtale de Vitamine A causée par un apport déficitaire de ROL ou une conversion déficitaire du ROL en AR peut engendrer une hypoplasie rénale subtile et plusieurs études ont démontré que l'enzyme RALDH2 joue un rôle primordial dans la synthèse d'AR nécessaire pour le développement embryonnaire et donc le développement rénal.

### 6.1 LES HYPOTHÈSES

Dans le plasma des humains adultes normaux la variation des taux du ROL circulant n'est pas très importante mais nous avons observé de grandes variations des taux d'AR, dans le contexte d'une population Nord-Américaine qui n'est pas exposée à des pénuries alimentaires de rétinoïdes. Ceci nous a orienté à vérifier aussi les taux de ROL et surtout son métabolite actif, l'AR dans le sang de cordon ombilical de nouveaux nés. Notre hypothèse postule une possible corrélation entre ces taux d'AR avec d'éventuels polymorphismes du gène ALDH1A2 codant pour la RALDH2 et éventuellement avec d'autres gènes impliqués dans le métabolisme de ROL et RA (CRABP2, CYP26A1 et B1). Il est concevable que ces types de polymorphismes génétiques (s'ils existent) puissent influencer la dynamique de l'AR et ainsi les variations des taux embryonnaires d'AR responsables du bon développement rénal, situation probablement encore décelable dans le sang de cordon ombilical.

## 6.2 LES OBJECTIFS

L'**objectif général** de cette étude est d'apporter des éléments pour une meilleure compréhension du rôle des rétinoïdes dans l'organogenèse et le développement rénal. Nous travaillons avec du sang de cordon ombilical provenant des nouveau-nés d'une population Nord-Américaine ayant un apport alimentaire suffisant de rétinoïdes. Les **objectifs** plus **spécifiques** de cette étude sont :

**a.)** l'investigation de la variation des niveaux de rétinoïdes circulants (ROL et AR) dans le sang du cordon ombilical et d'éventuelles corrélations entre eux.

**b.)** l'identification d'éventuelles corrélations entre ces taux de ROL et AR avec des éventuels polymorphismes de gènes impliqués dans le développement rénal de l'embryon par la biosynthèse, liaison et influence sur l'activité biologique ou le catabolisme de l'AR (RALDH2, CRABP2, CYP26A1,B1). Étant donné l'importance de la RALDH2 dans le développement rénal- (première RALDH exprimée dans l'embryon, avec une expression dans le rein à 7,5 jours déjà) - et l'organogénèse globale - (seul gène impliqué dans la biosynthèse de l'AR dont la déficience totale testé avec souris nulles (K.O.), mène à une mortalité prénatale) - nous avons choisi d'investiguer d'avantage des polymorphismes du RALDH1A2 codant pour l'enzyme RALDH2. Le même genre de considérations (sur leur présence dans le développement rénal) nous ont conduit au choix d'étude des CRABP2 et des CYP26A1 et B1. Comme **objectif collatéral**, nous proposons d'évaluer si la Vit A du sang de cordon ombilical est un bon prédicteur pour la taille des reins des nouveau-nés (en investiguant des possibles corrélations entre le volume rénal des nouveau-nés (déjà mesurés par ultrasonographie) et les taux circulants de ROL et AR dans le sang de cordon ombilical que nous avons mesurés avec des techniques HPLC standardisées dans notre Laboratoire.

Autant pour contribuer à notre objectif général que pour bien organiser le travail sur nos objectifs spécifiques de recherche, (autre la revue de littérature générale sur les Rétinoïdes de ce Mémoire de Maîtrise, qui est elle aussi orientée vers le rôle de la Vitamine A dans le développement embryonnaire et l'organogénèse), nous avons synthétisé et publié un article de revue de littérature axé sur le rôle de la Vitamine A dans le néphrogenèse et le développement rénal. Pour les objectifs spécifiques et collatéraux, nous avons utilisé des méthodes d'investigation courantes dans le laboratoire de biologie moléculaire ( dont une large part fut donnée aux analyses par HPLC- chromatographie liquide à haute pression

pour les rétinoïdes), physiologie et nutrition ainsi que les analyses statistiques appropriées des variables.

S'agissant d'un Mémoire de Maîtrise par articles, nous avons publié dans des journaux scientifiques reconnus la revue de littérature orientée sur les spécificités des rétinoïdes dans le développement rénal et les résultats d'investigations ultérieures sont actuellement en cours de publication, ensemble avec leur présentation dans ce Mémoire.

Dans le contexte de la rédaction, des informations développées dans un chapitre préalable sont parfois reprises, mais brièvement cette fois, au début d'un chapitre ultérieur, dans le but d'assurer une cohérence globale de l'œuvre par liaisons et références *in-situ* de l'information (et pas uniquement par des renvois à répétition).

La même logique d'articulation harmonieuse des informations d'un chapitre à l'autre s'applique aussi aux choix des Tableaux et Figures, dont l'usage généreux fut inspiré par l'adagio académique voulant que souvent...*une image vaut milles mots*.

Nous avons voulu rendre hommage à nos professeurs et aux chercheurs (euses) pionniers dans les domaines évoqués dans notre présent travail et nous les avons cités en texte et dans notre bibliographie, indifféremment de l'année de leurs découvertes, à côté des études plus récentes sur les sujets scientifiques respectifs.

**CHAPITRE 2: *RÔLE OF VITAMIN A IN DETERMINING  
NEPHRON MASS AND POSSIBLE RELATIONSHIP TO  
HYPERTENSION***

*- Article 1 -*

*The Journal of Nutrition – The American Society for Nutrition*



## Role of Vitamin A in Determining Nephron Mass and Possible Relationship to Hypertension<sup>1,2</sup>

Pangala V. Bhat\* and Daniel-Constantin Manolescu

Laboratory of Nutrition and Cancer, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, CHUM-Hotel Dieu, and the Department of Medicine, Université de Montréal, H2W 1T8 Montreal, Canada

### Abstract

Vitamin A (retinol) and its analogs (retinoids) are important regulators of cell proliferation, differentiation, immune function, and apoptosis. The kidneys are target organs for vitamin A action. Retinoic acid (RA), a vitamin A metabolite, is involved in embryonic kidney patterning through the control of receptor tyrosine kinase expression, which modulates ureteric bud branching morphogenesis. Vitamin A status of the mother profoundly affects kidney organogenesis of the newborn. In rodents, mild vitamin A deficiency results in a 20% reduction of nephron number. In adult humans, nephron number varies between 0.3 and 1.3 million per kidney, which is accepted as normal. However, recent studies indicate that humans at the low end of nephron number are predisposed to primary hypertension. Because RA regulates nephron mass, its optimal availability during nephrogenesis is critical. RA levels in the embryo are affected by several factors, such as maternal vitamin A nutrition and disturbances in retinol metabolism. Maternal vitamin A deficiency during pregnancy is widespread in developing countries and segments of these populations may be exposed to low vitamin A during fetal life when nephron number is determined. Infants are likely to be born with suboptimal nephrons and may develop primary hypertension later in life. Although maternal vitamin A deficiency is not common in developed countries, congenital nephron number nevertheless varies widely, indicating low fetal RA levels due to common variants of the enzymes that convert retinol to RA. These infants might require heightened surveillance for hypertension later in life.

### Fetal vitamin A metabolism

Fetal vitamin A is acquired from the maternal circulation via the placenta. Vitamin A is transported bound to retinol-binding protein from mothers to their fetus (1). However, recent studies indicate that a large amount of vitamin A is also transported bound to lipoproteins that may be taken up by the fetus (2). Maternal vitamin A levels are influenced by the dietary intake of retinoids. In the diet, vitamin A is present in preform as carotenoids and retinyl esters from plants and animal sources, respectively. Once taken up by fetal tissue, metabolic enzymes convert

retinol to the active metabolite retinoic acid (RA),<sup>3</sup> which then regulates vitamin A signaling (3).

RA is formed from retinol by a 2-step oxidation process (4). First, retinol is oxidized to retinal by retinol dehydrogenases and then retinal is further converted to RA by retinal dehydrogenases (RALDH). Retinol oxidation is ubiquitous, whereas retinal oxidation is highly tissue specific during development. Although several enzymes (alcohol dehydrogenases [ADH], short-chain dehydrogenases/reductases) that catalyze retinol oxidation to retinal have been described, only ADH3 and retinol dehydrogenase 10 have recently been shown to play a role in embryogenesis (4,5). On the other hand, the enzymes (RALDH) that convert retinal to RA are well characterized and their specific role in RA formation during development has been clearly established (6).

RALDH are cytoplasmic enzymes that include 3 isozymes, now commonly referred to as RALDH1–3, the specificities of which for retinal substrates have been determined (7–9). RALDH1–3 begins to express at embryonic day (E) 9, E7.5, and E8.75, respectively, in mouse embryos (10,11), indicating that the fetus can synthesize its own RA after E7.5 and needs RA from the maternal circulation for early embryonic development. Among the RALDH1–3, RALDH2 is indispensable, generating RA during fetal life, as evidenced by its expression pattern in the embryo and the early embryo lethality of RALDH2 knockout mice (12). RALDH1 appears to play a role in RA generation, because it is needed for the maintenance of adulthood (6). RALDH3 expression is highly restricted to the ocular and nasal regions and its deletion causes choanal atresia with respiratory death in early postnatal life (13).

The enzyme that catabolizes RA in the fetus, CYP26A1, is a member of the cytochrome P450 system and is expressed from E8 onwards in mice. CYP26A1 inactivation causes spina bifida resembling the teratogenic effects of RA excess and this phenotype is rescued by RALDH2 inactivation (14). RALDH2 and CYP26A1 set the fine-tuning of RA levels in many embryonic tissues. The enzymatic steps involved in the activation of retinol and degradation of RA are summarized in **Figure 1**.

### Kidney development

Human kidneys begin to develop at 4–5 wk of gestation. During nephrogenesis, inductive interactions between the ureteric bud epithelium and metanephric mesenchyme result in the formation of the collecting duct system and optimal nephron number. These 2 developmental pathways are regulated by several

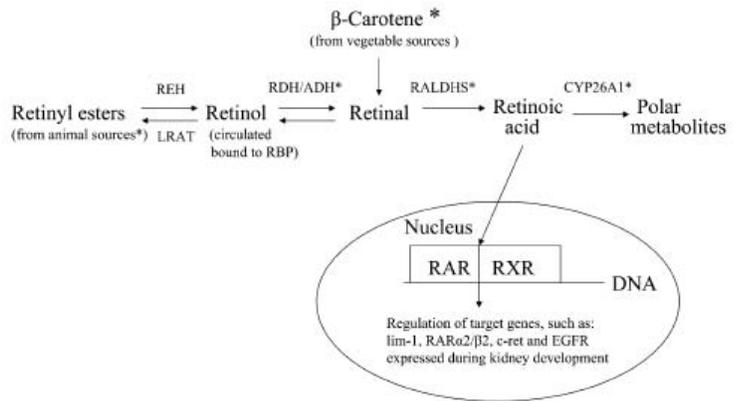
<sup>1</sup> Supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR).

<sup>2</sup> P. V. Bhat and D.-C. Manolescu, no conflicts of interest.

\* To whom correspondence should be addressed. E-mail: pangala.v.bhat@umontreal.ca.

<sup>3</sup> Abbreviations used: ADH, alcohol dehydrogenase; E, embryonic day; RA, retinoic acid; RALDH, retinal dehydrogenase; RAR, retinoic acid receptor.

**FIGURE 1** Metabolism and action of vitamin A. Retinyl esters and  $\beta$ -carotene from the diet are converted into retinol, which is esterified to retinyl esters in the liver by lecithin retinol acyl transferase (LRAT). In the liver, retinyl esters are hydrolyzed by retinyl ester hydrolase (REH) to retinol that is transported bound to retinol-binding protein (RBP). Retinol is taken up by the peripheral tissues where it is successively oxidized to retinal by retinol (RDH)/ADH and to RA by RALDH. RA is also generated from retinal formed by the cleavage of  $\beta$ -carotene. RA enters the nucleus and binds to RAR and retinoic acid x receptor (RXR) that regulate target genes. RA also undergoes oxidation by CYP26A1 to polar metabolites. \* indicates the possible dietary and metabolic routes that may affect RA homeostasis, which may result in impaired nephrogenesis, perhaps ultimately leading to the development of hypertension in adulthood.



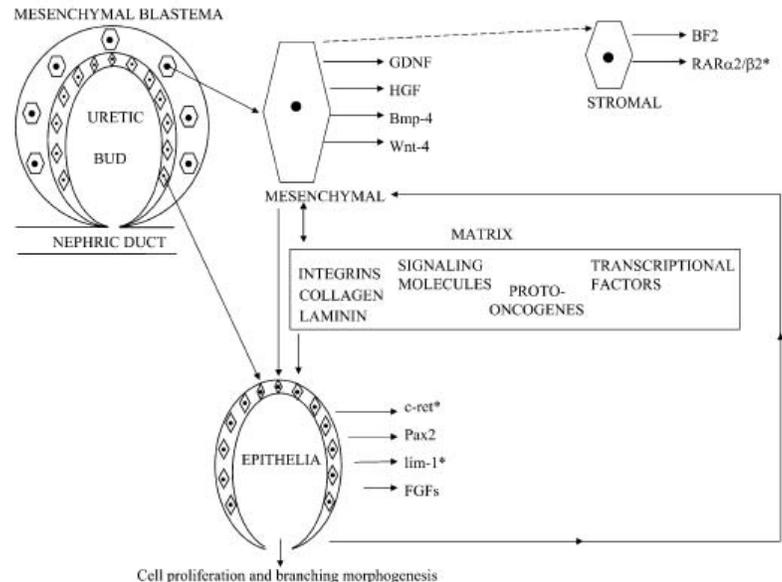
transcriptional factors and protooncogenes, polypeptide growth factors acting as signaling molecules, and their receptors. Gene disruption studies have shown the involvement of at least 11 genes that are crucial for metanephric kidney development (15). They are: WT1 (a transcriptional factor with a zinc finger domain), Pax2 (a transcriptional factor of the paired box family), BF-2 (a transcriptional factor of the winged helix family), c-ret (a receptor tyrosine kinase, a protooncogene), GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor), a member of the transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ) family and ligand for c-ret, PDGFR $\beta$  (platelet-derived growth factor, a receptor tyrosine kinase), PDGF B (a PDGF and ligand for PDGFR $\beta$ ), BMP-7 (bone morphogenetic protein, another member of the TGF- $\beta$  family), Wnt-4 (a secreted glycoprotein),  $\alpha$ 8 $\beta$ 1, and  $\alpha$ 3 $\beta$ 1 (integrins). Figure 2 illustrates the essential events that take place during early nephrogenesis and some of the genes involved in this process.

By ~36 wk of gestation, new nephron formation is almost complete. Recent studies indicate that an unfavorable prenatal environment, such as vitamin A deficiency or protein-energy malnutrition, profoundly influences the process of nephrogenesis (16).

**Vitamin A and congenital nephron number**

In the early 1950s, Wilson et al. (17) observed that maternal vitamin A deficiency resulted in renal hypoplasia in rats that could be prevented by vitamin A administration to pregnant animals, suggesting the direct involvement of vitamin A in kidney development. Studies on RA receptor (RAR) knockout mice demonstrated the specific role of vitamin A in renal organogenesis (18). Furthermore, renal agenesis was found in mice deficient in the RA-generating enzyme RALDH2, indicating the need for RA for proper kidney development (12). RA restored nephron endowment to normal in the offspring of rats subjected to maternal protein restriction (19). Recent studies have shown that, in kidney development, RA acts on mesenchymal cells expressing RAR $\alpha$  and  $\beta$ , stimulating these cells to release key branching morphogens (20,21). RA has been found to induce kidney tubulogenesis in tissue culture by enhancing the deposition of laminin (22). Retinoids promote branching nephrogenesis in the E14 fetal kidney in vitro (23). Interestingly, in vitro studies have revealed that retinoids modulate nephron number in a dose-dependent manner, suggesting the need for optimal retinoid levels in the fetal kidney for normal nephrogenesis. This is supported by the fact that even modest maternal

**FIGURE 2** The principal process and molecular events associated with early nephrogenesis. The ureteric bud invades mesenchymal blastema (left) and initiates reciprocal signaling (middle, arrows) between the epithelial ureteric tip and mesenchymal cells. The mesenchyme expresses GDNF, HGF (hepatic growth factor), Bmp-4, and Wnt4. c-ret, Pax2, lim-1, and FGF (fibroblast growth factors) are expressed in the epithelia (ureteric bud). In addition to mesenchymal-epithelial interactions, cell-matrix interactions involving signaling molecules, protooncogenes, and transcriptional factors also play an important role in this process. Mesenchymal blastema express stem cells that include stromal cells which express BF2 and RAR $\alpha$ 2/ $\beta$ 2. \* indicates genes regulated by RA.



vitamin A deficiency (a 50% decrease in circulating vitamin A concentrations) reduces nephron number by 20% in 21-d-old fetuses (24). In that study, the authors also observed a close correlation between nephron number and circulating vitamin A in term fetuses. Recent experiments compared vitamin A levels in pregnant women from Bangalore (India) and Montreal (Canada) with the kidney sizes of their offspring and determined that circulating retinol concentrations and kidney sizes were lower in the Bangalore group compared with the Montreal group (25).

Several genes expressed during renal organogenesis that are regulated by RA have been identified. Transcriptional factors, such as the Hox family, hepatic nuclear factor 1, *lim-1*, *RAR $\alpha$ 2*, and  *$\beta$ 2*, are potential targets of RA. In addition, c-ret, epidermal growth factor receptor, and transferrin receptor, which are important for nephron formation, are regulated by RA (26). Thus, a growing number of studies point to the strong involvement of vitamin A in nephrogenesis, with adequate vitamin A supply being crucial in determining final nephron numbers.

#### Nephron number and primary hypertension

Recently, several studies provided evidence that low nephron number, as a result of prenatal growth restriction, leads to hypertension later in life (27,28). Restriction of food or protein during pregnancy elicits a lower number of nephrons with the development of hypertension in adult offspring (29). Using the conditional knockout approach, Poladia et al. (30) demonstrated a link between reduced nephron number and hypertension in mice. In a recent investigation, hypertensive patients had fewer glomeruli and larger mean glomerular volume than nonhypertensive people (31). A wide variance in nephron number has been observed in adults (0.3–1.3 million nephrons/kidney), which was once considered normal. However, Brenner et al. (32) have suggested that humans at the low end of the nephron endowment spectrum are susceptible to primary hypertension due to a relatively high glomerular filtration rate in each available nephron. This is supported by animal experiments showing lower nephron number in inbred hypertensive compared with normotensive control rats (33). In another study, a significant decrease in nephron number in mice, because of heterozygous mutations of the *GDNF* gene, resulted in the development of hypertension in adulthood (34). An interesting observation was reported by Keller et al. (35), who compared the kidneys of 10 people who had died in accidents and who had hypertension with kidneys from 10 age-matched, normotensive controls. They discovered that the kidneys from hypertensive people had significantly fewer glomeruli (46.6%) per kidney than the matched controls. In addition, glomerular volume was greater (233% of control values) in hypertensive kidneys, indicating that glomeruli overwork in people with hypertension to restore total glomerular volume per kidney to normal. In another recent investigation, Hoy et al. (36) noted racial differences in nephron number in Australian adults. Aborigines had significantly fewer nephrons compared with Caucasians, with a higher incidence of end-stage renal disease in the former group. These studies strongly support the hypothesis that reduced nephron endowment results in glomerular hypertrophy, which may lead to hypertension later in life.

In conclusion, recent experiments in mice and humans support the hypothesis that perturbations in maternal nutrition have a greater impact on nephrogenesis, which may evoke hypertension in later life. One nutritional factor that affects fetal renal development is insufficient vitamin A. Vitamin A deficiency may occur at the nutrition level or through a defect in

metabolism (Fig. 1). Potentially reversible maternal nutritional vitamin A deficiency is widespread in developing countries, so that infants born to these mothers may have suboptimal nephrons and may be at a high risk of developing primary hypertension later in life. If this is the case, the public health implications for developing countries are enormous. In developed countries, maternal vitamin A deficiency is rare. However, congenital nephron number varies widely, suggesting that suboptimal RA levels are caused by the possible presence of common variants of vitamin A-metabolizing enzymes (see Fig. 1). Future research identifying common variant enzymes involved in vitamin A metabolism, such as *RALDH2*, which is essential for fetal RA synthesis, or *CYP26A1*, which catabolizes RA, should clarify the role of these vitamin A-metabolizing enzymes in nephrogenesis and hypertension.

#### Acknowledgment

The authors thank Ovid Da Silva for editing the manuscript.

#### Literature Cited

- Quadro L, Hamberger L, Gottesman ME, Wang F, Colantuoni V, Blaner WS, Mendelsohn CL. Pathways of vitamin A delivery to the embryo: insights from a new tunable model of embryonic vitamin A deficiency. *Endocrinology*. 2005;146:4479–90.
- Moise AR, Noy N, Palczewski K, Blaner WS. Delivery of retinoid-based therapies to target tissues. *Biochemistry*. 2007;46:4449–58.
- Chambon P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J*. 1996;10:940–54.
- Molotkov A, Fan X, Deltour L, Foglio MH, Martras S, Farrés J, Parés X, Duester G. Stimulation of retinoic acid production and growth by ubiquitously-expressed alcohol dehydrogenase *Adh3*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99:5337–42.
- Sandell LL, Sanderson BW, Moiseyev G, Johnson T, Mushegian A, Young K, Rey JP, Ma JX, Staehling-Hampton K, et al. *RDH10* is essential for synthesis of embryonic retinoic acid and is required for limb, craniofacial, and organ development. *Genes Dev*. 2007;21:1113–24.
- Duester G, Mic FA, Molotkov A. Cytosolic retinoid dehydrogenases govern ubiquitous metabolism of retinol to retinaldehyde followed by tissue-specific metabolism to retinoic acid. *Chem Biol Interact*. 2003;143:201–10.
- Bhat PV. Role of retinal dehydrogenase type 1 (*RALDH1*) in retinoic acid biosynthesis. In: Weiner H, editor. *Enzymology and molecular biology of carbonyl metabolism*; 12. Purdue University Press, West Lafayette, Indiana; 2005. p. 66–72.
- Gagnon I, Duester G, Bhat PV. Kinetic analysis of mouse retinal dehydrogenase 2 (*RALDH2*) for retinal substrates. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1596:156–62.
- Grun F, Hirose Y, Kawauchi S, Ogura T, Umesono K. Aldehyde dehydrogenase 6, a cytosolic retinaldehyde dehydrogenase prominently expressed in sensory neuroepithelia during development. *J Biol Chem*. 2000;275:41210–8.
- Haselbeck RJ, Hoffmann I, Duester G. Distinct functions for *Aldh1* and *RALDH2* in the control of ligand production for embryonic retinoid signalling pathways. *Dev Genet*. 1999;25:353–64.
- Mic FA, Molotkov A, Fan F, Cuenca AE, Duester G. *RALDH3*, a retinaldehyde dehydrogenase that generates retinoic acid, is expressed in the ventral retina, otic vesicle and olfactory pit during mouse development. *Mech Dev*. 2000;97:227–30.
- Niederreither K, Subbarayan V, Dolle P, Chambon P. Embryonic retinoic acid synthesis is essential for early mouse post-implantation development. *Nat Genet*. 1999;21:444–8.
- Dupe V, Matt M, Garnier JM, Chambon P, Mark M, Ghyselinck NB. A new born lethal defect due to inactivation of retinaldehyde dehydrogenase type 3 is prevented by maternal retinoic acid treatment. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:14036–41.
- Niederreither K, Abu-Abed S, Schuhbaur B, Petkovich M, Chambon P, Dolle P. Genetic evidence that oxidative derivatives of retinoic acid are

- not involved in retinoid signalling during mouse development. *Nat Genet.* 2002;31:84–8.
15. Lipschutz JH. Molecular development of the kidney: a review of the results of gene disruption studies. *Am J Kidney Dis.* 1998;31:383–97.
  16. Moritz KM, Dodic M, Wintour EM. Kidney development and the fetal programming of adult disease. *Bioessays.* 2003;25:212–20.
  17. Wilson JG, Roth CB, Warkany J. An analysis of the syndrome of malformations induced by maternal vitamin A deficiency. Effects of restoration of vitamin A at various times during gestation. *Am J Anat.* 1953;92:189–217.
  18. Mendelsohn C, Lohmes D, Decimo D, Lufkin T, LeMeur M, Chambon P, Mark M. Function of retinoic acid receptors (RARs) during development. II Multiple abnormalities at various stages of organogenesis in RAR double mutants. *Development.* 1994;120:2749–71.
  19. Makrakis J, Zimanyi MA, Black MJ. Retinoic acid enhances nephron endowment in rats exposed to maternal protein restriction. *Pediatr Nephrol.* 2007;22:1861–7.
  20. Batourina E, Gim S, Bello N, Shy M, Clagett-Dame M, Srinivas S, Constantini F, Mendelsohn C. Vitamin A controls epithelial/mesenchymal interactions through ret expression. *Nat Genet.* 2001;27:74–8.
  21. Mendelsohn C, Batourina E, Fung S, Gilbert T, Dodd J. Stromal cells mediate retinoid-dependent functions essential for renal development. *Development.* 1999;126:1139–48.
  22. Humes HD, Cieslinski DA. Interaction between growth factors and retinoic acid in the induction of kidney tubulogenesis in tissue culture. *Exp Cell Res.* 1992;201:8–15.
  23. Vilar J, Gilbert T, Moreau E, Merlet-Benichou C. Metanephros organogenesis is highly stimulated by vitamin A derivatives in organ culture. *Kidney Int.* 1996;49:1478–87.
  24. Lelièvre-Pégurier M, Vilar J, Ferrier M, Moreau E, Freund N, Gilbert T, Merlet-Benichou C. Mild vitamin A deficiency leads to inborn nephron deficit in the rat. *Kidney Int.* 1998;54:1455–62.
  25. Goodyer P, Kurpad A, Rekha S, Muthayya S, Dwarkanath P, Iyengar A, Philip B, Mhaskar A, Benjamin A, et al. Effects of maternal vitamin A status on kidney development: a pilot study. *Pediatr Nephrol.* 2007;22:209–14.
  26. Gilbert T, Merlet-Benichou C. Retinoids and nephron mass control. *Pediatr Nephrol.* 2000;14:1137–44.
  27. Merlet-Benichou C, Gilbert T, Muffat-Jolly M, Lelievre-Pegorier M, Leroy B. Intrauterine growth retardation leads to a permanent nephron deficit in the offspring. *Pediatr Nephrol.* 1994;8:175–80.
  28. Manning J, Vehaskari VM. Low birth weight-associated adult hypertension in the rat. *Pediatr Nephrol.* 2001;16:417–22.
  29. Woods LL. Maternal nutrition and predisposition to later kidney disease. *Curr Drug Targets.* 2007;8:906–13.
  30. Poladia DP, Kish K, Kutay B, Bauer J, Baum M, Bates CM. Link between reduced nephron and hypertension: studies in a mutant mouse model. *Pediatr Res.* 2006;59:489–93.
  31. Hoy WE, Bertram JF, Denton RD, Zimanyi M, Samuel T, Hughson MD. Nephron number, glomerular volume, renal disease and hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2008;17:258–65.
  32. Brenner BM, Garcia DL, Anderson S. Glomeruli and blood pressure. Less of one, more the other? *Am J Hypertens.* 1988;1:335–47.
  33. Azuma H, Nadeau K, Mackenzie HS, Brenner BM. Nephron mass modulates the hemodynamic, cellular, and molecular response of the rat renal allograft. *Transplantation.* 1997;63:519–28.
  34. Cullen-McEwen LA, Drago J, Bertram JF. Ephron endowment in glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) heterozygous mice. *Kidney Int.* 2001;60:31–6.
  35. Keller G, Zimmer G, Mall G, Ritz E, Amann K. Nephron number in patients with primary hypertension. *N Engl J Med.* 2003;348:101–8.
  36. Hoy WE, Hughson MD, Singh GR, Douglas-Denton R, Bertram JF. Reduced nephron number and glomerulomegaly in Australian Aborigines: a group at high risk for renal disease and hypertension. *Kidney Int.* 2006;70:104–10.

**CHAPITRE 3: *RETINOIC ACID LEVELS IN CORD BLOOD FROM HEALTHY MONTREAL NEWBORNS ARE ASSOCIATED WITH ALDH1A2 AND CRABP2, TWO IMPORTANT GENES IN KIDNEY DEVELOPMENT***

*– Article 2 –*

**Retinoic acid levels in cord blood from healthy Montreal newborns are associated with *ALDH1A2* and *CRABP2***

Daniel-Constantin Manolescu<sup>1\*</sup>, Reyhan El Kares<sup>2\*</sup>, Lajmi Lakhal-Chaieb<sup>3</sup>, Alexandre Montpetit<sup>4</sup>, Pangala V. Bhat<sup>1</sup>, Paul Goodyer<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Nutrition and Cancer, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, CHUM-Hotel Dieu, and the Department of Medicine, Université de Montreal, Montreal, Québec, Canada

<sup>2</sup>McGill University, Department of Pediatrics, Montreal Children's Hospital Research Institute 4060 Ste Catherine west, Montreal, Québec, Canada H3Z2Z3

<sup>3</sup>Département de mathématiques et statistique, Université Laval, Québec, Canada

<sup>4</sup>McGill University and Genome Québec Innovation Centre, Montreal, Québec, Canada

\* Authors 1 and 2 made equal contribution to the work

Address correspondence to:

Paul Goodyer, MD  
Montreal Children's Hospital  
2300 Tupper Street  
Montreal, QC, Canada H3H 1P3  
TEL: (514) 412-4461

**ABSTRACT**

Retinoic acid (RA), a vitamin A-derived morphogen, is a critical regulator of gene expression during embryonic development. In rodents, moderate maternal vitamin A deficiency leads to subtle morphogenetic defects in the embryo; inactivation of genes in the RA pathway cause major disturbances of embryogenesis. In North America, maternal vitamin A deficiency is rare, but we hypothesized that there may be common variants of RA pathway genes that influence circulating levels of RA in human newborns. In this study, we use a modified High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) method to quantify ROL and RA levels in umbilical cord blood of 145 healthy term Caucasian infants from Montreal and show that the distribution is skewed. While 67% of the values were very low (under 10nmol/L), two newborn subsets are associated with moderate and high cord levels of RA. Variation in RA level could not be explained by parallel variation in its precursor, retinol(ROL). However, high cord levels of RA were associated with newborn heterozygosity for a variant *RALDH1A2*<sup>rs12591551A</sup> allele (p=0.035) or homozygosity for a variant *CRABP2*<sup>rs12724719A</sup> allele (p=0.013). These genes encode proteins involved in fetal RA synthesis (RALDH2) and facilitating transcriptional effects of RA (CRABP2), respectively. We speculate that individual variation in RA pathway genes may account for subtle variations in human embryogenesis.

**Key words:** retinol-ROL, retinoic acid-RA, cord blood, HPLC, SNP, RALDH2, CRABP2

## INTRODUCTION

In Western countries, pregnant women consume about 1-2 mg/day of the pro-vitamin A, beta-carotene from oranges, green leafy vegetables and fortified beverages. Between 10-25% of this is converted to retinol (ROL), which circulates in maternal blood loosely bound to retinol binding protein (RBP) (Ross S. A. et al. 2000). During passage through the placenta, unbound ROL is transferred to the fetal circulation, where it is picked up by fetal RBP or chylomicrons and delivered to fetal tissues (Clagett-Dame and DeLuca 2002, Gudas 1994, Ross S. A. et al. 2000). There it is converted to retinal and then to retinoic acid (RA) by the embryonic retinal dehydrogenase, RALDH2 (Wang X. et al. 1996a). In mice, targeted disruption of *Raldh2* arrests development at midgestation (Niederreither et al. 1999b, Niederreither et al. 2000, Niederreither et al. 2001) ; administration of exogenous RA to the mother allows development of *Raldh2*<sup>-/-</sup> embryos proceed (Niederreither et al. 1999b).

Within fetal tissues, RA may exit the cell, may be targeted for degradation by binding to CRABP1 (Boylan and Gudas 1991, 1992), or may be transferred to the nucleus via CRABP2 (Bastie et al. 2001, Budhu A. et al. 2001, Budhu A. S. and Noy 2002b, Dong et al. 1999, Jing et al. 1997) where it associates with heterodimeric nuclear receptors (RAR $\alpha,\beta,\gamma$ ) that regulate transcription of target genes (Bailey and Siu 1988). Fetal RA is catabolized primarily by *CYP26A1*, a member of the cytochrome p450 system (Abu-Abed et al. 2003, Marlier and Gilbert 2004). Mice lacking either *Cyp26a1* or *Cyp26b1* die perinatally and exhibit abnormalities consistent with those seen in RA excess, including spina bifida, truncation of the tail and abnormalities affecting the kidneys, urogenital tract and hindgut (Abu-Abed et al. 2001, Sakai et al. 2001, Yashiro et al. 2004).

Despite the vast literature attesting to the powerful effects of RA on embryogenesis and cell physiology, very little is known about the circulating levels of RA among human newborns. Neither is there appreciable understanding of the factors which influence individual newborn RA level. Here we report umbilical cord serum RA levels in 145 healthy term newborn Caucasian infants from Montreal. We show that RA level is unrelated to serum ROL concentration but that a subset of newborns bearing common variants of RALDH2 and CRABP2 genes have significantly elevated levels of umbilical cord RA.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Reagents**

The authentic standard retinoids (retinol and retinoic acid) were purchased from Sigma-Aldrich (St-Louis, MO). The purity of the retinoids was verified by high pressure liquid chromatography (HPLC). Retinoids were handled under yellow light to prevent photoisomerization. HPLC grade solvents were purchased from Fisher Scientific (Toronto, Ontario).

### **Study subjects**

Healthy white infants who were born to mothers with uncomplicated pregnancies were recruited with informed parental consent at the prenatal clinic visit (n = 145) at the Royal Victoria Hospital (Montreal, Quebec Canada). The study was approved by the Montreal Children's Hospital Research Ethics Board. Mothers with twins, diabetes, intrauterine growth restriction, genetic abnormalities, renal malformations or hydronephrosis, or delivery < 36 weeks and who had newborns with low serum albumin were excluded.

### **Cord Blood Analyses**

At birth, cord blood was obtained for isolation of leukocyte DNA and retinoid (ROL and RA) assay. Genomic DNA was isolated with the FlexiGene DNA kit (Qiagen, Mississauga, ON, Canada) according to the manufacturer's protocol. DNA was quantified using the Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit \*2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA). To measure retinoids the cord blood was collected in a 7 ml vacutainer tube containing a silica-gel based clotting activator previously wrapped with aluminum foil to minimize the exposure to light. The blood was immediately processed in a dark room and serum was collected by centrifugation at 10,000 rpm at 4°C. Serum samples were stored in 1.5 ml brown Eppendorfs cryotubes, coded and stored at -80°C until analysis.

### **Extraction of retinoids from cord blood for HPLC analysis**

Retinoids from the blood samples were extracted by butanol/acetonitrile (equal volumes) essentially as described by McClean et al. (McClean et al. 1982) except that the method was adapted to a smaller sample volume. Serum samples stored at -80°C were defrosted on ice and centrifuged for 10 min at 4°C at 3000 rpm to obtain a clear supernatant. 200 µL of

serum was transferred to a borosilicate tube wrapped in aluminium foil and 200  $\mu\text{L}$  of butanol/acetonitrile (1:1) was added. The mixture was vortexed for 1 min and then added 72 mg of hydrated  $\text{K}_2\text{PO}_4$  in 20  $\mu\text{L}$  of water and vortexed again for 30 sec. The extraction mixture was centrifuged at 3000 rpm for 15 min in a Sorval RC3C Plus centrifuge precooled to 4°C. 100  $\mu\text{L}$  of clear supernatant was injected onto HPLC. Recovery studies were performed with the addition of retinoids (5ng-50 ng /100  $\mu\text{L}$  range) to 3 separate cord blood samples.

### **HPLC analysis of retinoids**

HPLC system consisted of a Shimadzu LC-10ADVP equipped with a SIL-HTC autosampler and cooling system (Man-Tech, Guelph, Ontario). Retinoids were separated on a Partisil 10-ODS analytical column (250 X 4.5 mm, Grace Discovery Sciences, Illinois, USA), and eluted with a mobile phase of acetonitrile:water 65:35), containing 10 mM ammonium acetate, at a flow rate of 1.2 ml/min. Retinoids were detected in a photodiode array detector (Shimadzu Model SPD-M10 AVP) that collected spectra between 200 and 500 nm. Calibration curves for retinoic acid (RA,  $\lambda=340\text{nm}$ ) and retinol (ROL,  $\lambda=326\text{nm}$ ) were obtained using standard pure solutions of retinoids. Characteristic UV spectra and retention times identified each retinoid, and peak areas were measured at  $\lambda_{\text{max-330}}$  in a Shimadzu SZ-228 data system. The detection limit for retinoids was 2 pg.

### **Choice of SNPs**

The NCBI dbSNP database was screened for coding and non-coding SNPs in *ALDH1A2*, *CYP26A1*, *CYP26B1*, *CRABP1* and *CRABP2* genes with minor allele frequency of >5% in Caucasian populations. The htSNPs were chosen from a region that spanned *ALDH1A2*, *CYP26A1*, *CYP26B1*, *CRABP1* and *CRABP2* genes plus 10 kb at both the 5' and 3' flanking segments, using the HapMap human genome database ([http://www.hapmap.org/cgi-perl/gbrowse/hapmap\\_B36/](http://www.hapmap.org/cgi-perl/gbrowse/hapmap_B36/)). All known SNPs from the Centre d'Étude du Polymorphisme Humain (CEPH) population (white individuals from Western Europe who settled in Utah) for the *ALDH1A2*, *CYP26A1*, *CYP26B1*, *CRABP1* and *CRABP2* genes regions were downloaded into Haploview (Haploview version 4.1) (Barrett et al. 2005) and a plot of linkage disequilibrium (LD) between SNPs was obtained. Using Haploview's pairwise "Tagger" program (de Bakker et al. 2005) we chose htSNP ( $r^2>0.8$ ) that occurred in at least 5% of the population.

### **SNP Genotyping**

For each subject, 15 ng of genomic DNA was used for multiplex genotyping, using Sequenom iPLEX PCR technology (Sequenom, San Diego CA). This system involves extension of the PCR amplicon with modified nucleotides to distinguish SNP alleles by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight technology. Primers for SNP detection were designed using MassARRAY AssayDesign software (Sequenom). At the SNPs genotyping 10 samples were excluded in reason of their DNA quality.

### **Statistical methods**

A total of 145 patients were investigated. We analyzed data with R software (<http://cran.r-project.org>, version 2.7.1). Genotype frequencies for each SNP were examined for divergence from Hardy-Weinberg equilibrium. Chi-squared test was conducted for genotype analysis. The dependency between RA and ROL was tested by Kendall's tau. Since exact values for RA can not be known below a certain limit of detection, we adapted the methodology of Oakes to left-censored data (Oakes 1982) to estimate Kendall's tau.

## **RESULTS**

### **HPLC analysis**

Numerous retinoids, in addition to retinol and retinyl esters, are present in plasma at nanomolar concentrations (about 5–10 nM). These include all-trans retinoic acid, 13-cis retinoic acid, 13-cis-4-oxo retinoic acid and others (Barua and Sidell 2004, Wyss and Bucheli 1997). We optimized an extraction procedure adapted to HPLC separation (McClellan et al. 1982) for measuring RA in cord blood of 145 infants in Montreal. **Figure 1** shows an HPLC chromatogram of an umbilical cord serum sample. RA and ROL are present and well separated (**Figure 1A**) and their presence was confirmed by characteristic UV absorption maxima for retinoic acid (RA,  $\lambda=340\text{nm}$ ) and retinol (ROL,  $\lambda=326\text{nm}$ ) standards (**Figure 1B**). In this HPLC system the isomers of RA such as 13-cis/9-cis are not separated and therefore, the retinoids eluting as peak 1 constitute a mixture of RAs. Note that in **Figure 1A** there is a shift in the elution times of RA and ROL compared to the elution times of standard retinoids (**Figure 1B**). This could be due to the presence of lipids in the cord blood which interfere with interactions between retinoids and column materials. Addition of dipotassium phosphate to the extraction mixture enhanced the recovery of

retinoids. Recovery studies, with known amounts of retinoids added to the blood samples, resulted in yields of RA and ROL > 99%. However, repeated freezing and thawing of the blood samples resulted in significant loss of retinoids. Storage of blood samples at -20°C for 1 year resulted in 63% loss of retinoids. Of course, those damaged samples were excluded from calculations.

### **Retinoic acid and Retinol levels in cord blood**

Marked variations in RA levels (0.07-550 nmol/l) were observed in the 145 cord samples analyzed. The distribution was skewed, with the appearance of three distinct subgroups: 1) two thirds of the samples (97 infants) fell below a RA concentration of 10nmol/L and in 58% of samples (84 infants), RA was below the limit of detection (0.07 nmol/L); 2) RA concentrations in 28% of samples were spread between 10 and 100nmol/L; 3) in 5% of samples (8 infants) RA concentrations were substantially higher (100-550 nmol/L) (**Figure 2**). The skewed distribution of umbilical cord RA could not be explained by parallel variation in its precursor, ROL. ROL was normally distributed, with an average of 1150.03nmol/L and values ranging between 51.4 and 3892.71nmol/l. Mean cord retinol levels in the three subgroups were 1294nmol/L (Group 1) 793nmol/L (group2) and 1194nmol/L (Group 3), respectively (**Table 1**). In fact, there was weak inverse correlation between ROL and RA levels (Kendall tau = -0.2733,  $p < 0.01$ ).

### **Association between cord retinoic acid and SNPs in genes encoding enzymes of RA synthesis and degradation.**

Since the skewed distribution of RA levels could not be explained by variation in ROL, we explored the possibility that circulating levels of RA were influenced by variation in genes involved in RA synthesis (*RALDH1A2*) or degradation (*CYP26A1*; *CYP26B1*). Each subject was genotyped for single nucleotide polymorphisms (SNPs) spanning each candidate gene. SNP frequencies were similar to those of the HapMap Caucasian (CEPH) population, indicating no appreciable genetic drift in our cohort. Genotype distributions for each SNP locus conformed to Hardy-Weinberg predictions. Using the allelic exact test, we found an association between the A allele in the *RALDH1A2*<sup>rs12591551(A/C)</sup> genotype AC and high levels of RA ( $p=0.0347$ ), ( **Figure 3**). In clear 25 heterozygous (rs12591551AC) babies (19% of the cohort) showed a 2.4 fold increase in their group mean cord RA level (62.2 nmol/L), ( $p=0.0347$ ), compared to 109 babies (81% of the cohort) who were

homozygous for the wildtype allele (rs12591551CC) (mean RA=26nmol/L), (p=0.04). None of the SNPs within the *CYP26A1*, *CYP26B1* genes showed significant association with RA levels.

**Association between RA and SNPs in genes encoding intracellular RA binding proteins.**

We also considered the possibility that circulating levels of RA in the fetus were influenced by variation in genes encoding intracellular RA binding proteins (*CRABP1* and *CRABP2*). We chose htSNPs and cSNPs in the CEPH population and all subjects were genotyped at these loci; SNP frequencies in our cohort were similar to those of the CEPH population, indicating no appreciable genetic drift. Genotype distributions for each SNP locus conformed to the expected Hardy-Weinberg. Using the Chi-square test we identified an association between the *CRABP2*<sup>rs12724719A/A</sup> genotype and the high levels of RA (p=0.0127), (**Figure 4**). In clear 4 homozygous *CRABP2*<sup>rs12724719A/A</sup> newborns (3 % of the cohort) showed a 4.4 fold increase in their group mean umbilical cord RA level (141.3 nmol/L), (p=0.0127), compared to 99 babies (75% of the cohort) who were homozygous *CRABP2*<sup>rs12724719G/G</sup> ( mean RA = 32.3 nmol/L) (p=0.03).

**DISCUSSION**

We used a refined HPLC method to measure RA levels in umbilical cord blood of health term newborn Montreal babies. Interestingly, the majority of infants had low circulating RA level (<10umol/L). However, the distribution of RA levels in our cohort was skewed by two apparent subpopulations of newborns with much higher RA levels ranging from 10-100nmol/L and >100nmol/L, respectively. Fetal RA is derived from fetal metabolism of maternally supplied retinol in developing tissues, but we found no relationship between umbilical cord RA and the corresponding level of umbilical cord retinol. We reasoned, therefore, that individual variation in newborn blood RA likely reflects variation in fetal genes involved in ROL metabolism, RA degradation or RA delivery to the nucleus where it exerts its effects on transcription of target genes.

To determine whether fetal RA levels might be influenced by common variants of the human *RALDH2* gene, we screened a panel of SNPs spanning the *RALDH2* locus and found an *RALDH2* SNP in a putative regulatory region of the 3' flanking sequence that was associated with increased cord RA. Babies with one or more *RALDH1A2*<sup>rs12591551(A)</sup>

alleles had a 2.4-fold increase in umbilical cord RA level compared to those who were homozygous for the wildtype allele. Two thirds of infants with this allele have cord blood RA > 10 nmol/L whereas two thirds of all infants have cord blood <10nmol/L. This suggests a dominant genetic model in which the presence of one A allele is sufficient to enhance RALDH2 expression in fetal tissues, increase intracellular RA pools and, thereby, raise circulating RA levels in cord blood. It seems unlikely that umbilical cord RA level is determined by maternal RALDH2 genotype, since this gene is expressed primarily in fetal tissues.

Intracellular RA bound to CRABP1 is targeted for degradation in fetal tissues by CYP26A1 and CYP26B1 members of the cytochrome P450 system. This pathway clearly is a powerful regulator of the intracellular RA pool in fetal tissues. Mice with inactivation of *Cyp26A1* or *Cyp26B1* genes die in utero (Abu-Abed et al. 2001, Sakai et al. 2001, Yashiro et al. 2004). However, these genes are highly conserved and no common variants of these two human CYPs were associated with umbilical cord RA in our cohort.

Intracellular RA may also bind to CRABP2 which facilitates delivery to the nucleus where it activates RAR transcriptional regulation of target genes. In our cohort, the four babies who were homozygous for the *CRABP2*<sup>rs12724719A/A</sup> allele had substantially increased levels of cord blood RA compared to newborns who were homozygous GG for the wildtype G allele (141.3 vs 32.3 nmol/L, respectively). However, the presence of a heterozygous *CRABP2*<sup>rs12724719A/G</sup> allele had no significant effect on cord RA, suggesting a recessive genetic mechanism in which homozygosity for a slightly dysfunctional CRABP2 allele reduces the level of CRABP2 expression, thereby increasing the intracellular pool of free RA. Since compromised RA signaling is known to induce feedback upregulation of RALDH2 expression, this might further increase RA level in fetal tissues – and consequently in umbilical cord RA.

## CONCLUSION

Our studies show for the first time that the distribution of RA level in human neonates is skewed by the presence of two subgroups with relatively high RA. We show that this is unrelated to the availability of circulating ROL substrate but is affected by fetal genotype for variant alleles of the RALDH2 and CRABP2 genes.

## REFERENCES

1. Ross, S.A., et al., *Retinoids in embryonal development*. *Physiol Rev*, 2000. **80**(3): p. 1021-54.
2. Gudas, L.J., *Retinoids and vertebrate development*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(22): p. 15399-402.
3. Clagett-Dame, M. and H.F. DeLuca, *The role of vitamin A in mammalian reproduction and embryonic development*. *Annu Rev Nutr*, 2002. **22**: p. 347-81.
4. Wang, X., P. Penzes, and J.L. Napoli, *Cloning of a cDNA encoding an aldehyde dehydrogenase and its expression in Escherichia coli. Recognition of retinal as substrate*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(27): p. 16288-93.
5. Niederreither, K., et al., *Embryonic retinoic acid synthesis is essential for early mouse post-implantation development*. *Nat Genet*, 1999. **21**(4): p. 444-8.
6. Niederreither, K., et al., *Retinoic acid synthesis and hindbrain patterning in the mouse embryo*. *Development*, 2000. **127**(1): p. 75-85.
7. Niederreither, K., et al., *Embryonic retinoic acid synthesis is essential for heart morphogenesis in the mouse*. *Development*, 2001. **128**(7): p. 1019-31.
8. Boylan, J.F. and L.J. Gudas, *Overexpression of the cellular retinoic acid binding protein-I (CRABP-I) results in a reduction in differentiation-specific gene expression in F9 teratocarcinoma cells*. *J Cell Biol*, 1991. **112**(5): p. 965-79.
9. Boylan, J.F. and L.J. Gudas, *The level of CRABP-I expression influences the amounts and types of all-trans-retinoic acid metabolites in F9 teratocarcinoma stem cells*. *J Biol Chem*, 1992. **267**(30): p. 21486-91.
10. Jing, Y., S. Waxman, and R. Mira-y-Lopez, *The cellular retinoic acid binding protein II is a positive regulator of retinoic acid signaling in breast cancer cells*. *Cancer Res*, 1997. **57**(9): p. 1668-72.
11. Bastie, J.N., et al., *The novel co-activator CRABP II binds to RARalpha and RXRalpha via two nuclear receptor interacting domains and does not require the AF-2 'core'*. *FEBS Lett*, 2001. **507**(1): p. 67-73.
12. Budhu, A., R. Gillilan, and N. Noy, *Localization of the RAR interaction domain of cellular retinoic acid binding protein-II*. *J Mol Biol*, 2001. **305**(4): p. 939-49.
13. Budhu, A.S. and N. Noy, *Direct channeling of retinoic acid between cellular retinoic acid-binding protein II and retinoic acid receptor sensitizes mammary carcinoma cells to retinoic acid-induced growth arrest*. *Mol Cell Biol*, 2002. **22**(8): p. 2632-41.
14. Dong, D., et al., *Distinct roles for cellular retinoic acid-binding proteins I and II in regulating signaling by retinoic acid*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(34): p. 23695-8.
15. Bailey, J.S. and C.H. Siu, *Purification and characterization of a murine cellular retinoic acid-binding protein*. *Biochem Cell Biol*, 1988. **66**(7): p. 750-7.
16. Abu-Abed, S., et al., *Developing with lethal RA levels: genetic ablation of Rarg can restore the viability of mice lacking Cyp26a1*. *Development*, 2003. **130**(7): p. 1449-59.
17. Marlier, A. and T. Gilbert, *Expression of retinoic acid-synthesizing and -metabolizing enzymes during nephrogenesis in the rat*. *Gene Expr Patterns*, 2004. **5**(2): p. 179-85.
18. Abu-Abed, S., et al., *The retinoic acid-metabolizing enzyme, CYP26A1, is essential for normal hindbrain patterning, vertebral identity, and development of posterior*

- structures. *Genes Dev*, 2001. **15**(2): p. 226-40.
19. Sakai, Y., et al., *The retinoic acid-inactivating enzyme CYP26 is essential for establishing an uneven distribution of retinoic acid along the antero-posterior axis within the mouse embryo*. *Genes Dev*, 2001. **15**(2): p. 213-25.
  20. Yashiro, K., et al., *Regulation of retinoic acid distribution is required for proximodistal patterning and outgrowth of the developing mouse limb*. *Dev Cell*, 2004. **6**(3): p. 411-22.
  21. McClean, S.W., et al., *Liquid-chromatographic assay for retinol (vitamin A) and retinol analogs in therapeutic trials*. *Clin Chem*, 1982. **28**(4 Pt 1): p. 693-6.
  22. Barrett, J.C., et al., *Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps*. *Bioinformatics*, 2005. **21**(2): p. 263-5.
  23. de Bakker, P.I., et al., *Efficiency and power in genetic association studies*. *Nat Genet*, 2005. **37**(11): p. 1217-23.
  24. Oakes, D., *A concordance test for independence in the presence of censoring*. *Biometrics*, 1982. **38**(2): p. 451-5.
  25. Wyss, R. and F. Bucheli, *Determination of endogenous levels of 13-cis-retinoic acid (isotretinoin), all-trans-retinoic acid (tretinoin) and their 4-oxo metabolites in human and animal plasma by high-performance liquid chromatography with automated column switching and ultraviolet detection*. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 1997. **700**(1-2): p. 31-47.
  26. Barua, A.B. and N. Sidell, *Retinoyl beta-glucuronide: a biologically active interesting retinoid*. *J Nutr*, 2004. **134**(1): p. 286S-289S.

## Tables and Figures legends

**Table 1. Umbilical cord serum RA variations versus mean ROL levels in three groups (G1, G2 and G3)**

**Figure 1. (A and B) HPLC chromatogram of (A) umbilical cord serum sample and (B) standard, retinoids. RA and ROL are both present and well separated.**

**Figure 2. Distribution of umbilical cord RA levels in term newborns**

The distribution of umbilical cord RA levels in our cohort was skewed, with the appearance of three distinct subgroups: 67% of the samples fell below 10nmol/L (Group1); 28% of samples were between 10 and 100nmol/L (Group2); 5% were >100nmol/L (Group3).

**Figure 3. ALDH1A2 SNP location and frequencies**

rs12591551 variant is located in intron 7 of the *ALDH1A2* gene. \*Genotype (AC) is associated with higher values of umbilical cord serum RA ( $p=0.0347$ ).

**Figure 4. CRABP2 SNP location and frequencies**

rs12724719 variant is located in the 3' region of CRABP2 gene. \*Genotype (AA) is associated with higher values of umbilical cord serum RA ( $p=0.0127$ ).

**Table 1**

	G1 (RA<10nmol/L)	G2 (10nmol/L<RA<100nmol/L)	G3 RA>100nmol
Number of Newborn	97	40	8
%	67	28	5
Mean ROL levels (nmol/L)	1294	793	1194

Umbilical cord serum RA variations versus mean of ROL levels  
in the three groups (G1, G2 and G3).

Figure 1

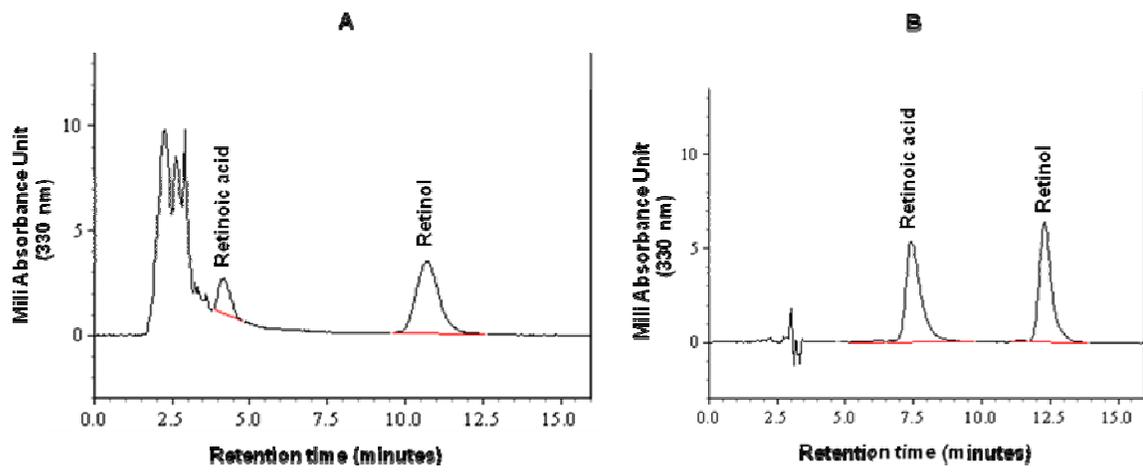
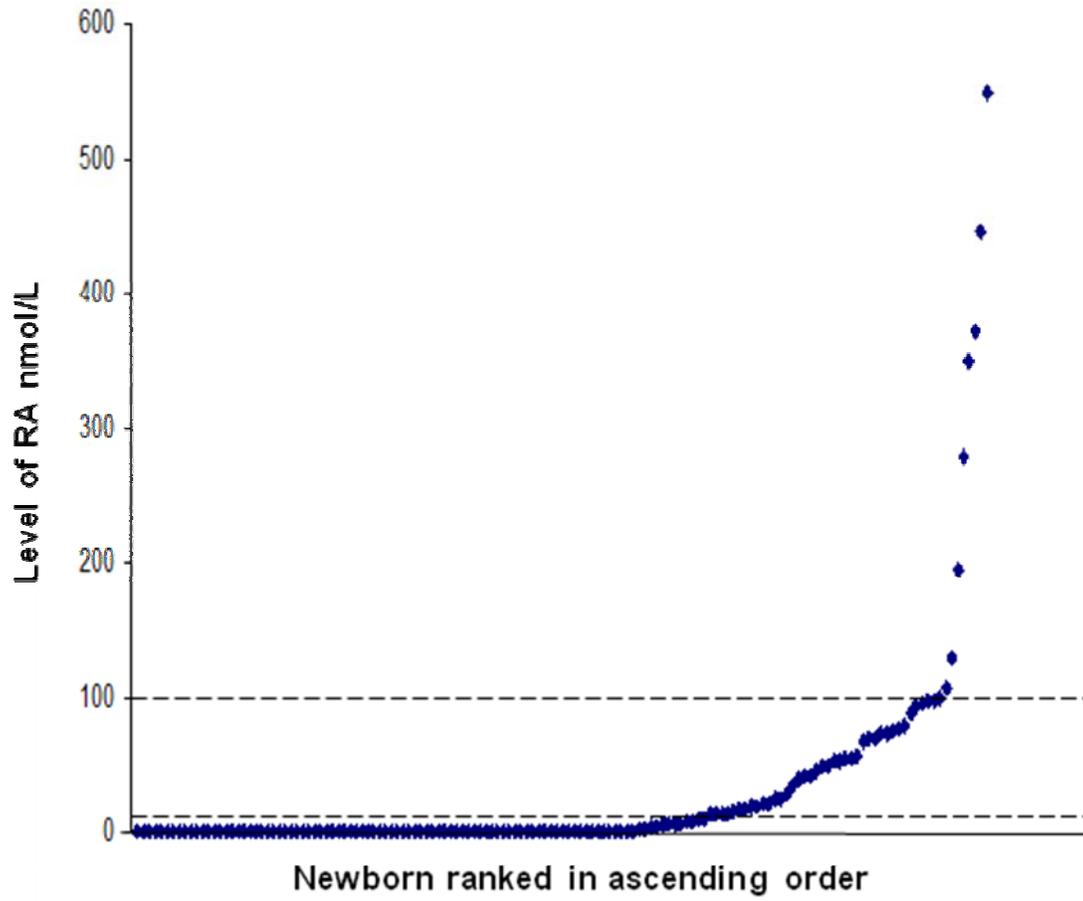
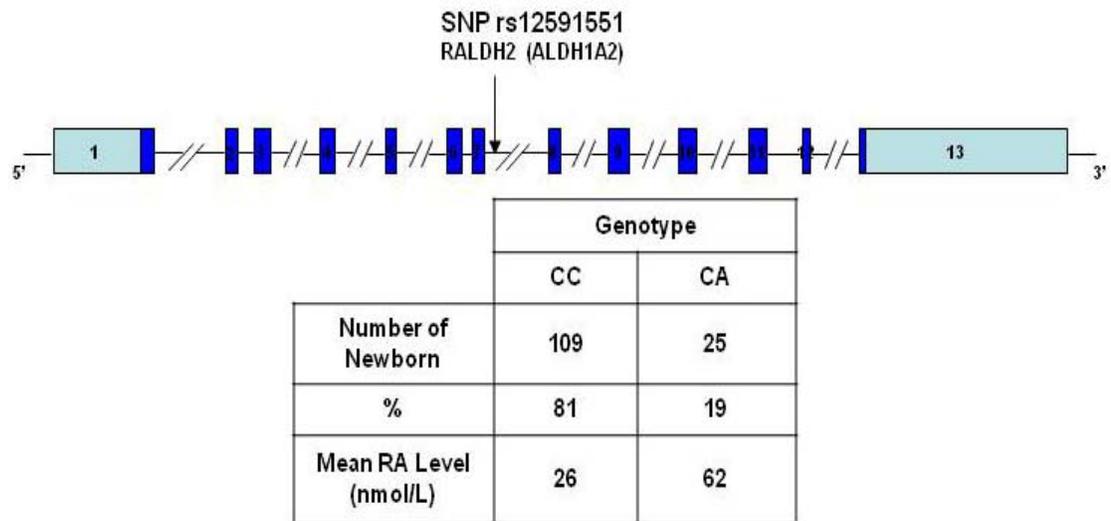
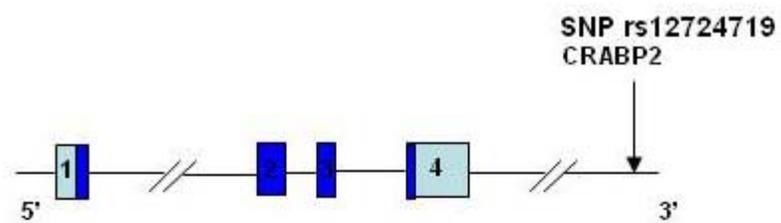


Figure 2



**Figure 3**

**Figure 4**

	Genotype		
	GG	AG	AA
Number of Newborn	99	30	4
%	75	22	3
Mean RA Level (nmol/L)	32	20	141

## **CHAPITRE 4 : DISCUSSIONS ET CONCLUSIONS GLOBALES DES TRAVAUX**

#### 4.1. But

Dans l'embryogénèse, divers organes (comme par exemple les reins du fœtus) produisent de grandes quantités de RA, à partir du ROL, suggérant ainsi un besoin de RA pour une organogénèse normale (Bhat 1997, Bhat and Manolescu 2008, Goodyer et al. 2007). Il est donc envisageable que des variantes polymorphiques de la **RALDH2**, **CRABP2** et/ou du **CYP26A1, B1** peuvent influencer les niveaux fœtaux de biosynthèse, de catabolisme et/ou de l'activité biologique de l'AR- (et ainsi influencer le développement rénal voir l'organogénèse en général)- décelable dans le sang de cordon ombilical des nouveau-nés. Le but de ce projet est d'apporter des éléments à une meilleure compréhension du rôle des rétinoïdes dans l'organogénèse et le développement rénal. Nous travaillons ici avec le sang du cordon ombilical de bébés d'une population Nord-Américaine ayant un apport alimentaire suffisant de rétinoïdes. Durant nos travaux nous avons procédé à :

a.) l'investigation par HPLC de la variation des niveaux de rétinoïdes circulants (ROL et AR) dans le sang du cordon ombilical et d'éventuelles corrélations entre eux.

b.) identification des éventuelles corrélations entre les taux de d'AR et ROL dans le sang de cordon ombilical des nouveau-nés à terme en santé et des éventuelles variantes polymorphiques pour des gènes impliqués dans le métabolisme embryonnaire de l'AR et dans l'organogénèse et le développement rénal (RALDH2, CRABP2 et CYP26 A1, B1).

c.) vérifications des possibles corrélations pour voir si le niveau des rétinoïdes (ROL et/ou RA) dans le sang de cordon ombilical à la naissance, pourrait être un bon prédicteur pour la taille des reins des nouveau-nés (elle était déjà mesurée par ultrasonographie)

#### 4.2. Discussions

La Vitamine A (rétinol ROL et l'acide rétinoïque AR) joue un rôle important dans des processus métaboliques (développement embryonnaire et organogénèse, croissance cellulaire, différenciation des tissus, vision, immunité, etc.) qui affectent plusieurs organes, dont les reins. Il a déjà été démontré, autant dans études sur les animaux que sur l'humain, que les facteurs de l'environnement fœtal (dont la Vitamine A est parmi les plus importants), affectent l'organogénèse. Le besoin des rétinoïdes, en tant que précurseurs d'AR, pour un bon développement embryonnaire a été démontré pour la première fois sur

l'animal il y a 70 ans. Chez l'humain, malgré des rapports d'anophtalmie et autres malformations concernant la descendance des femmes assujetties à la malnutrition (Willhite et al. 1989), le besoin et l'importance majeure d'une diète adéquate en caroténoïdes, ROL et RE pour le développement prénatal et néonatal, furent mieux documentées après des études d'intervention (Muhilal et al. 1988, Rahmatullah and Roche 1988, Sommer et al. 1986). Parmi les nouveau-nés avec un petit poids ou poids sous la normale, on a démontré aussi l'incidence plus grande des bas taux de ROL hépatique et circulant (Gebre-Medhin et al. 1984, Shah et al. 1987, Shenai et al. 1985).

Il est donc évident qu'une diète déficitaire en rétinoïdes de la mère enceinte, augmente le risque des problèmes d'embryogénèse et développement fœtal et retarde la croissance intra-utérine. Depuis les années 80, on a démontré que les rétinoïdes contrôlent le développement des vertébrés par leur action sur deux types de récepteurs nucléaires ; les récepteurs nucléaires d'acide rétinoïque (RARs)  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  (Brand et al. 1988, Krust et al. 1989, Petkovich M et al.) et les rétinoïdes-x-récepteurs (RXR) (Giguere et al.). Un niveau optimal des métabolites actifs de la Vitamine A, qui contrôlent les voies de signalisation des ces récepteurs nucléaires, est nécessaire pour un développement embryonnaire adéquat. Un taux insuffisant, mais également trop important du ligand rétinoïque pour ces récepteurs nucléaires, est également dommageable pour l'embryon. Durant son développement, l'embryon lui-même règle très précisément la synthèse spatio-temporelle des métabolites actifs de la Vitamine A, pour s'assurer que les taux adéquats des ligands rétinoïques actifs, pour les récepteurs nucléaires des gènes impliqués, sont disponibles pour des activations génomiques séquentielles durant l'embryogénèse. Une déficience fœtale d'AR – due, soit à une déficience primaire en ROL dans la diète de la mère enceinte, ou à des dérèglements métaboliques dans la biosynthèse, l'accomplissement de son activité biologique et/ou le catabolisme de l'AR - peut causer des dérèglements dans la morphogénèse embryonnaire.

Durant le développement des reins, le at-AR va actionner les récepteurs nucléaires pour at-RA (RAR-  $\alpha$  et RAR- $\beta$ ) des cellules du mésenchyme, en stimulant ces cellules à émettre des embranchements spécifiques durant cette période de la morphogénèse (Batourina et al. 2001, Mendelsohn et al. 1999). Lorsque des reins fœtaux de rat de niveau E14 sont cultivés ex-vivo en absence de ROL, l'adition d'at-AR (0.1-1  $\mu$ M) accélère ce processus d'embranchement de la néphro-genèse de 2 à 3 fois (Gilbert and Merlet-Bénichou 2000, Lelièvre-Pégorier et al. 1998, Vilar et al. 1996).

Il s'ensuit que la production locale d'at-AR dans le tissu fœtal est grandement dépendante de la disponibilité de ROL dans la circulation maternelle. Une déficience maternelle sévère en ROL cause le ralentissement, des malformations ou l'arrêt dans l'organogénèse rénale chez les rats, phénomène observé déjà depuis 1953 (WILSON et al. 1953). Même une déficience modeste (maximum de 50% du niveau circulant de ROL chez la mère enceinte) est associée avec une réduction du poids (24%) et le nombre des néphrons (20%) des reins mesurés post-natal (14 jours). (Gilbert and Merlet-Bénichou 2000). Même dans les plages des valeurs de basse-normalité du ROL circulant, on peut observer une relation claire de linéarité entre le nombre de néphrons du fœtus et nouveau-né et le niveau de ROL circulant maternel (Lelièvre-Pégorier et al. 1998). Peu est connu sur les facteurs qui déterminent le nombre des néphrons chez l'humain, mais des études récentes sur les rongeurs suggèrent que l'embranchement de la néphro-génèse est hautement dépendant de l'at-AR synthétisé dans le rein fœtal à partir du ROL circulant qui lui provient de la mère. Durant la grossesse, les niveaux de ROL maternel sont déterminés par l'apport primaire alimentaire des rétinoïdes. Le ROL fœtal est ensuite acquis via le placenta et converti d'abord en RAL et ensuite en AR dans les cellules des tissus périphériques cibles de l'embryon. Justement dans les reins du fœtus, la conversion du ROL circulant en AR est plus grande que dans n'importe quel autre organe (Bhat 1997, Bhat and Manolescu 2008).

**La RALDH2** semble être l'enzyme essentielle qui génère de l'AR très tôt dans la vie fœtale (Wang X. et al. 1996a) notamment dans les reins en développement. Le KO ciblé de la RALDH2 dans le modèle murin est létal très tôt dans l'embryogénèse alors que la RALDH2 est fortement exprimé dans les reins et les testicules des embryons des souris normales (Niedereither K., 1999). Dans la souris adulte, l'expression de la RALDH2 est régulée vers le bas. Le gène humain de la RALDH2 (10 exons) a été localisé sur le chromosome 15q21.3 et il encode pour l'expression d'une protéine de 518 aminoacides. Trois isoformes ont été rapportées et la région du promoteur a été caractérisée (Ono et al. 1998). Dans l'embryogénèse, le contrôle des niveaux de conversion du ROL vs. AR est gouverné majoritairement par les enzymes oxydantes du RAL, enzymes de type rétinol-déshydrogénases (RALDH) même si les alcool-déshydrogénases ADH et les déshydrogénases/réductases à courte chaîne ont aussi une contribution mineure de par leur rôle d'oxydation du ROL en RAL (Duester 1996).

**Le CRABP2**, récepteur cytosolique type « cellular retinoic acid binding protein 2 » d'environ 14kDa, est stimulée par l'AR dans plusieurs tissus (Kato et al. 1985, Zheng and Ong 1998) et elle est plus spécifique dans le rein en développement. Des études montrent que l'expression de la CRABP2 augmente l'activité transcriptionnelle des RAR (Dong et al. 1999 ; Budhu et al. 2001). Il a été démontré qu'en l'absence de son ligand (AR) la CRABP2 reste localisée de façon prédominante dans le cytoplasme. Elle répond lors de la synthèse cytoplasmique de son ligand (AR) en le liant et se transportant (translocation) ensemble avec l'AR dans le noyau, où elle peut s'associer directement avec le récepteur nucléaire RAR, lui présentant l'AR qui joue ainsi son rôle de ligand nucléaire aussi. (Delva et al. 1999 ; Budhu and Noy 2002). De plus, le complexe CRABP2-RAR contrôle et stabilise le cheminement (channeling) du ligand (AR), de la CRABP2 vers le RAR, facilitant ainsi la ligation de l'AR a l'RAR pour un meilleur contrôle de l'activité transcriptionnelle subséquente (Dong et al. 1999 ; Delva et al. 1999 ; Budhu et al. 2001 ; Budhu and Noy, 2002 ; Blomhoff 2006). CRABP2 et CRABP1 sont des récepteurs cytosoliques pour l'AR importants, qui remplissent plusieurs fonctions communes mais aussi spécifiques dans le métabolisme de l'AR, parmi lesquelles : stabilisation et protection de l'AR contre l'oxydation, la dégradation et/ou l'isomérisation hâtive non-métabolique, solubilisation de l'AR, régulation du métabolisme de l'AR (Boylan and Gudas 1992, Fiorella and Napoli 1994), régulation de l'accès de l'AR à des compartiments cellulaires divers (noyau, mitochondries, microsomes de la membrane du Réticule Endoplasmatique) (Gaub et al. 1998, Gustafson et al. 1996, Ong 1994, Ruff and Ong 2000), co-activateurs pour les récepteurs nucléaires d'AR( RAR et RXR) (Delva 1999, Dong 1999, Clagett-Dame and DeLuca 2002), etc. Les deux protéines CRABP (1 et 2) sont abondamment exprimées dans l'embryogénèse, (Blomhoff and Blomhoff 2006, Maden 1994) mais leur expression tissulaire est spécifique et variable selon les stades de développement et le type de cellules. (Dollé et al. 1990, Ong 1994) la CRABP2 étant plus spécifique dans le rein en développement.

**Le CYP26A1**, membre de la famille des cytochromes P450, est impliqué dans le premier palier de dégradation de l'AR, sur l'axe catabolique de la Vitamine A, dans les reins du fœtus. Ce gène est exprimé dans les reins du fœtus des rongeurs, à partir du niveau E18 de développement embryonnaire (Marlier and Gilbert 2004). Ensemble avec la

RALDH2, le CYP26A1 semble régulariser le niveau d'at-RA dans plusieurs tissus embryonnaires. Les fœtus des souris transgéniques K.O. pour le CYP26A1, développent la malformation Spina-bifida (spécifique pour les excès fœtaux tératogènes d'AR) et ce phénotype est annihilée ou diminué par l'inactivation de la RALDH2 (Niederreither et al. 2002). Le gène pour le CYP26A1 humain est localisé sur le chromosome 10q23-24 (White et al. 1998) et il encode sur 8 exons une protéine de 497 acides aminés, comportant deux isoformes (NCBI).

Il est envisageable que des variantes polymorphiques des gènes de la **RALDH2**, **CRABP2** et/ou du **CYP26A1** peuvent influencer le niveau fœtal d'AR par le niveau de biosynthèse, d'activité biologique et/ou celui de son catabolisme- (et ainsi influencer le développement rénal voir l'organogénèse en général)-situation éventuellement encore décelable dans le sang de cordon ombilical des nouveau-nés.

Le développement des reins humains, commence à 4-5 semaines de gestation, quand le bourgeon urétique émerge du conduit néphrique et commence son arborisation. Des signaux de chaque branche stimulent les cellules mésenchymales adjacentes à former des néphrons repartis en grappes sur l'arborescence du système collecteur. Du fait que la formation des nouveaux néphrons finit à 36 semaines de gestation, l'expansion de l'embranchement urétique a ce moment (un moins avant naissance) déterminera le nombre et le fonctionnement des néphrons de l'organisme pour la vie (Goodyer et al. 2007).

Des études préalables suggèrent qu'une hypoplasie rénale subtile peut avoir un impact à long terme sur la santé et que les individus nés avec un nombre réduit de néphrons ont des réserves fonctionnelles rénales réduites et un risque accru pour développer une hypertension systémique plus tard dans la vie (Brenner et al. 1988, Hoy et al. 2001, Keller et al. 2003, Mackenzie et al. 1996). Ceci même dans la plage basse de la normale actuelle de variation individuelle de 0.3 à 1.3 million néphrons per rein,(Clark and Bertram 1999, Nyengaard and Bendtsen 1992).Des patients adultes avec une hypertension essentielle systémique présentent 45% de néphrons en moins que les contrôles du même âge ayant une pression sanguine normale (Keller et al. 2003). Il appert approprié d'étudier les possibles mécanismes pouvant mener in-vivo à une déficience fonctionnelle en Vitamine A (ex. des quantités basses de RAL en conséquence d'un déficit primaire de ROL dans la diète de la mère enceinte et/ou un métabolisme sous-optimal du ROL et de son métabolite actif AR dans les tissus fœtaux).

Comme pour la plupart des pays développés, la diète d'une population de Montréal est suffisamment riche en ROL. Il est donc logique d'explorer d'abord si jamais il y a un possible métabolisme sous-optimal du ROL dans les tissus fœtaux. Un tel métabolisme sous-optimal du ROL pourrait être dû à des variations génétiques humaines dans la biosynthèse d'at-RA (variations pour la RALDH2), dans les protéines cytosoliques de liaison pour l'AR (CRABP2) qui influencent l'activité biologique de régulateur de transcription génique de l'AR, ou encore dans le catabolisme d'AR (variations pour la CYP26A1). Ces situations peuvent mener à des niveaux insuffisants d'AR ou une activité biologique insuffisante dans les reins fœtaux pour soutenir une néphrogénèse maximale adéquate et elles sont éventuellement décelables dans le sang de cordon ombilical des nouveau-nés.

Par conséquent, afin de pouvoir explorer la variabilité génétique entre les individus, pour le métabolisme fœtal du ROL de provenance maternelle vers l'AR (synthèse, lien et transport intracellulaire, dégradation), nous avons procédé d'abord à la mesure des niveaux de ROL et AR dans leur sang de cordon ombilical par une méthode HPLC spécialement développée et standardisée dans ce but (décrite dans notre deuxième article). Nous avons comparé ensuite ces taux de ROL et AR. En parallèle et en aveugle, nous avons séquencé l'ADN génomique leucocytaire provenant du sang de cordon-ombilical, à la recherche des possibles variations génétiques polymorphiques pour l'expression de RALDH2, CRABP2, CYP26A1, B1. Des variations géniques peuvent porter leurs éventuelles polymorphismes dans des différentes séquences d'ADN sur le gène en question (dans ce travail, des SNP (single nucléotide polymorphismes) intéressants furent trouvés dans l'intron 7 du gène ALDH1A2/SNP(rs12591551:A/C) (**Fig.3 p.105**) et dans la région 3' du gène CRABP2/SNP(rs12724719:A/G) (**Fig.4 p. 106**)

Nous avons ensuite comparé et analysé ces deux séries pour observer si des corrélations statistiquement significatives pouvaient être mises en évidence (ex. l'incidence d'un polymorphisme spécifique avec un phénotype de valeurs extrêmes pour les ROL et RA ombilicales circulants). Nous avons aussi évalué s'il existe des corrélations entre les niveaux d'AR et ROL circulants dans le sang de cordon ombilical ou si les niveaux ROL and RA ombilicales circulants au moment de la naissance peuvent être directement associés au volume des reins des nouveau-nés à terme du groupe de nouveau-nés de Montréal (déjà mesuré par ultrasonographie).

Dans ces contextes, **on observe une** grande variation  $\Delta$  RA (0.07-550.27 nmol/l) dans la cohorte de 145 échantillons, pour des groupes de valeurs stables de ROL, ce qui suggère une variation dans la génétique individuelle du métabolisme du ROL. Les taux d'AR sont distribués en trois groupes : **G1) 67% soit 2/3 d'échantillons** (97 enfants) < 10 nmol/l, dont 84 enfants (58% du total) < 0.07nmol/l (limite détectable). **G2) 10nmol/l< 28% d'échantillons** (40 enfants) < 100 nmol/l. **G3) 100nmol/l < 5% d'échantillons** (8 enfants) < 550nmol/l. Variation  $\Delta$  ROL (51.39-3892.70 nmol/l) soit une moyenne de 1150.03nmol/l pour la cohorte ou alors G1/ROL=1294nmol/l, G2/ROL=793nmol/l et G3/ROL=1194nmol/l pour les moyennes en répartition du ROL sur les trois groupes d'AR préalables. Étant donné que des enzymes générant atRA ( RALDH ) sont exprimées après 7 jours dans l'embryon de la souris , il est possible de ne pas trouver de grandes quantités de atRA (venant directement de la mère) dans le sang de cordon ombilical (confirmé par les analyses présentes), parce que le bébé produit déjà son propre atRA tissulaire à partir du atROL venant de la mère, lequel continue à se trouver en grande quantité dans le sang, en tant que nutriment important.

L'absence de corrélation significative des valeurs-taux ombilicaux circulants de ROL et AR avec les volumes des reins des nouveaux nés, montre que la valeur des ces rétinoïdes dans le sang du cordon ombilical à la naissance, n'est pas un prédicteur du volume rénal des nouveau-nés. Éventuellement des mécanismes rénaux compensatoires (hypertrophie précoce) ou des mécanismes cataboliques accélérés pour les rétinoïdes de transfert maternel (peut-être une accélération spécifique de leur catabolisme en fin de grossesse et au moment de la naissance) biaisent ces types de corrélations. Aucune corrélation statistique significative n'a été trouvée entre les SNP des gènes CYP26A1 et CYP26B1 et les valeurs ombilicales d'AR et de ROL.

Les génotypes **hétérozygote CA** (19% des cas) **du SNP (rs12591551:A/C) du gène ALDH1A2** et celui **homozygote AA** (5% des cas) **du SNP (rs12724719:A/G) du gène CRABP2** sont associés ( $p=0.035$  et  $0.013$ ) à des valeurs moyennes hautes d'AR (62nmol/L et 141nmol/l) dans le sang de cordon ombilical. Ils pourraient avoir un rôle protecteur pour l'embryon et l'organogénèse du fœtus, dans un contexte de déficience maternelle primaire ou secondaire en Vitamine A, pouvant ainsi évoquer un mécanisme évolutif adaptatif.

### 4.3. CONCLUSIONS

Dans l'embryogénèse, divers organes (ex. les reins du fœtus) produisent de grandes quantités de RA, à partir du ROL, suggérant ainsi un besoin de RA pour une organogénèse normale (Bhat 1997, Bhat and Manolescu 2008, Goodyer et al. 2007). Par conséquent, il est approprié de continuer à investiguer les mécanismes les plus probables menant vers une déficience métabolique fonctionnelle de la Vit. A (ROL). Ça peut être une quantité sous-optimale de atRA ou encore une activité biologique sous-optimale de l'AR, à cause d'une éventuelle mutation dans l'ADN des enzymes et autres protéines qui modulent son métabolisme et ses fonctions biologiques (RALDH2, CRABP2 ou CYP26A1). Sur un plan plus large (ex. des études géographiques), il faudrait aussi considérer les déficiences d'apport alimentaire de Vitamine A (ROL) dans la diète, situation observée dans les pays en développement. Dans nos présentes expériences, nous ne trouvons pas de corrélation significative entre les rétinoïdes mesurés (ROL avec le RA), dans le sang de cordon ombilical à la naissance. Nous n'avons pas trouvé de corrélation entre des SNP des gènes CYP26A1 et CYP26B1 et les valeurs d'AR ou de ROL dans le sang du cordon ombilical. Les valeurs de ROL et de l'AR dans le cordon ombilical à la naissance, ne sont pas des prédicteurs du volume rénal des nouveau-nés. Par contre, on observe de grandes variations d'AR, pour des groupes proches des mêmes valeurs de ROL, ce qui suggère une variation dans la génétique individuelle du métabolisme de la Vitamine A (ROL et AR). Les génotypes **hétérozygote CA** (19% des cas) du SNP (**rs12591551:A/C**) du gène **ALDH1A2** et celui **homozygote AA** (5% des cas) du SNP (**rs12724719:A/G**) du gène **CRABP2** sont associés ( $p=0.035$  et  $0.013$ ) à des valeurs moyennes hautes d'AR (62nmol/L et 141nmol/L respectif) dans le sang de cordon ombilical.

Nos présentes études montrent, pour la première fois chez les nouveau-nés humains, une variation spécifique des taux d'AR ombilical, avec la présence des sous-groupes (2 ici) possédant des hauts taux d'AR circulants dans leur sang de cordon ombilical, non-pas en relation avec les taux du ROL circulant (le rétinoïde substrat initial dans le métabolisme d'AR), mais plutôt avec le génotype fœtal des variantes alléliques des gènes impliqués dans la biosynthèse embryonnaire de l'AR (ici RALDH2 et CRABP2). Ces gènes codent pour des protéines impliqués dans le métabolisme et les fonctions biologiques de l'AR : - la RALDH2- enzyme qui oxyde le RAL pour obtenir de l'AR et la

CRABP2 – protéine de liaison cytoplasmique de l'AR et son transport dans le noyau, pour remplir son rôle de modulateur dans les transcriptions géniques. Il est donc logique de considérer que des variations individuelles dans l'expression des gènes ainsi impliqués dans la biosynthèse et l'activité biologique embryonnaire de l'AR (ici RALDH2 et CRABP2), peuvent induire des variations subtiles dans l'embryogénèse humaine, surtout dans des contextes géographiques et/ou populationnelles pouvant engendrer une déficience maternelle primaire ou secondaire en Vitamine A.

Ainsi des variantes communes des gènes qui interviennent dans le métabolisme de la Vitamine A (ROL), peuvent affecter un grand nombre de bébés à naître, par leur effet sur la quantité effective du métabolite actif (RA), son activité biologique et son homéostasie, pouvant aggraver ou protéger contre une déficience de la Vitamine A déjà présente chez la mère. Les pays pauvres sont plus à risque, à cause d'un apport plus bas en Vitamine A.

#### **4.4. PERSPECTIVES ET PROPOSITIONS**

Pour mieux caractériser des phénotypes spécifiques, l'analyse de plus d'échantillons de sang de cordon ombilical est nécessaire pour mieux observer une corrélation entre et avec les niveaux de rétinoïdes (atROL et atRA) dans le sang ombilical. Il serait intéressant aussi de procéder aux mêmes types d'investigations (d'une façon comparative) chez des nouveau-nés à terme, mais également chez des nouveau-nés prématurés. Il serait intéressant aussi de mesurer les niveaux circulantes de atRA et atROL des mères enceintes, à des périodes de gestation variables durant l'organogénèse du fœtus et les comparer avec les niveaux de atROL et atRA du sang de cordon ombilical de leurs bébés, ainsi qu'avec le volume moyen des certains organes (reins par exemple) ajusté pour la taille des bébés, à la naissance. Le génotypage subséquent à des phénotypes atypiques ou marginaux pour ces gènes (RALDH2, CRABP2, CYP26A1, B1) et aussi d'autres gènes intéressants dans le métabolisme des rétinoïdes (RBP4), pourrait continuer à donner de bons résultats. Le même type d'investigations appliqué dans un contexte géographique ou populationnel connu pour un déficit indigène en Vitamine A, pourrait compléter le tableau.

## BIBLIOGRAPHIE

- Abu J, Batuwangala M, Herbert K, Symonds P. 2005. Retinoic acid and retinoid receptors: potential chemopreventive and therapeutic role in cervical cancer. *Lancet Oncol* 6: 712-720.
- Abu-Abed S, Dolle P, Metzger D, Beckett B, Chambon P, Petkovich M. 2001. The retinoic acid-metabolizing enzyme, CYP26A1, is essential for normal hindbrain patterning, vertebral identity, and development of posterior structures. *Genes Dev* 15: 226-240.
- Abu-Abed S, Dolle P, Metzger D, Wood C, MacLean G, Chambon P, Petkovich M. 2003. Developing with lethal RA levels: genetic ablation of Rarg can restore the viability of mice lacking Cyp26a1. *Development* 130: 1449-1459.
- Armstrong J, Redfern C, Veal G. 2005. 13-cis retinoic acid and isomerisation in paediatric oncology--is changing shape the key to success? *Biochem Pharmacol* 69: 1299-1306.
- Arnhold T, Tzimas G, Wittfoht W, Plonait S, Nau H. 1996. Identification of 9-cis-retinoic acid, 9,13-di-cis-retinoic acid, and 14-hydroxy-4,14-retro-retinol in human plasma after liver consumption. *Life Sci* 59: PL169-177.
- Aström A, Tavakkol A, Pettersson U, Cromie M, Elder J, Voorhees J. 1991. Molecular cloning of two human cellular retinoic acid-binding proteins (CRABP). Retinoic acid-induced expression of CRABP-II but not CRABP-I in adult human skin in vivo and in skin fibroblasts in vitro. *J Biol Chem* 266: 17662-17666.
- Bailey JS, Siu CH. 1988. Purification and characterization of a murine cellular retinoic acid-binding protein. *Biochem Cell Biol* 66: 750-757.
- Balmer J, Blomhoff R. 2002. Gene expression regulation by retinoic acid. *J Lipid Res* 43: 1773-1808.
- Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. 2005. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21: 263-265.
- Barua AB, Sidell N. 2004. Retinoyl beta-glucuronide: a biologically active interesting retinoid. *J Nutr* 134: 286S-289S.
- Bashor M, Toft D, Chytil F. 1973. In vitro binding of retinol to rat-tissue components. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70: 3483-3487.
- Bastie JN, Despouy G, Balitrand N, Rochette-Egly C, Chomienne C, Delva L. 2001. The novel co-activator CRABPII binds to RARalpha and RXRalpha via two nuclear receptor interacting domains and does not require the AF-2 'core'. *FEBS Lett* 507: 67-73.
- Batourina E, Gim S, Bello N, Shy M, Clagett-Dame M, Srinivas S, Costantini F, Mendelsohn C. 2001. Vitamin A controls epithelial/mesenchymal interactions through Ret expression. *Nat Genet* 27: 74-78.

- Batten M, Imanishi Y, Maeda T, Tu D, Moise A, Bronson D, Possin D, Van Gelder R, Baehr W, Palczewski K. 2004. Lecithin-retinol acyltransferase is essential for accumulation of all-trans-retinyl esters in the eye and in the liver. *J Biol Chem* 279: 10422-10432.
- Bertram J, Vine A. 2005. Cancer prevention by retinoids and carotenoids: independent action on a common target. *Biochim Biophys Acta* 1740: 170-178.
- Bhat P. 1997. Tissue concentrations of retinol, retinyl esters, and retinoic acid in vitamin A deficient rats administered a single dose of radioactive retinol. *Can J Physiol Pharmacol* 75: 74-77.
- Bhat P, Manolescu D. 2008. Role of vitamin A in determining nephron mass and possible relationship to hypertension. *J Nutr* 138: 1407-1410.
- Blaner W. 2001. Cellular metabolism and actions of 13-cis-retinoic acid. *J Am Acad Dermatol* 45: S129-135.
- . 2007. STRA6, a cell-surface receptor for retinol-binding protein: the plot thickens. *Cell Metab* 5: 164-166.
- Blaner W, Das K, Mertz J, Das S, Goodman D. 1986. Effects of dietary retinoic acid on cellular retinol- and retinoic acid-binding protein levels in various rat tissues. *J Lipid Res* 27: 1084-1088.
- Blaner W, Bonifácio M, Feldman H, Piantedosi R, Saraiva M. 1991. Studies on the synthesis and secretion of transthyretin by the human hepatoma cell line Hep G2. *FEBS Lett* 287: 193-196.
- Blaner W, Obunike J, Kurlandsky S, al-Haideri M, Piantedosi R, Deckelbaum R, Goldberg I. 1994. Lipoprotein lipase hydrolysis of retinyl ester. Possible implications for retinoid uptake by cells. *J Biol Chem* 269: 16559-16565.
- Blaner W, O'Byrne S, Wongsiriroj N, Kluwe J, D'Ambrosio D, Jiang H, Schwabe R, Hillman E, Piantedosi R, Libien J. 2008. Hepatic stellate cell lipid droplets: A specialized lipid droplet for retinoid storage. *Biochim Biophys Acta*.
- . 2009. Hepatic stellate cell lipid droplets: a specialized lipid droplet for retinoid storage. *Biochim Biophys Acta* 1791: 467-473.
- Blomhoff R, Blomhoff H. 2006. Overview of retinoid metabolism and function. *J Neurobiol* 66: 606-630.
- Blomhoff R, Green M, Berg T, Norum K. 1990. Transport and storage of vitamin A. *Science* 250: 399-404.
- Blomhoff R, Green M, Green J, Berg T, Norum K. 1991. Vitamin A metabolism: new perspectives on absorption, transport, and storage. *Physiol Rev* 71: 951-990.
- Boylan JF, Gudas LJ. 1991. Overexpression of the cellular retinoic acid binding protein-I (CRABP-I) results in a reduction in differentiation-specific gene expression in F9 teratocarcinoma cells. *J Cell Biol* 112: 965-979.

- . 1992. The level of CRABP-I expression influences the amounts and types of all-trans-retinoic acid metabolites in F9 teratocarcinoma stem cells. *J Biol Chem* 267: 21486-21491.
- Brand N, Petkovich M, Krust A, Chambon P, de Thé H, Marchio A, Tiollais P, Dejean A. 1988. Identification of a second human retinoic acid receptor. *Nature* 332: 850-853.
- Brenner B, Garcia D, Anderson S. 1988. Glomeruli and blood pressure. Less of one, more the other? *Am J Hypertens* 1: 335-347.
- Brodeur H, Gagnon I, Mader S, Bhat P. 2003. Cloning of monkey RALDH1 and characterization of retinoid metabolism in monkey kidney proximal tubule cells. *J Lipid Res* 44: 303-313.
- Budhu A, Noy N. 2002a. Direct channeling of retinoic acid between cellular retinoic acid-binding protein II and retinoic acid receptor sensitizes mammary carcinoma cells to retinoic acid-induced growth arrest. *Mol Cell Biol* 22: 2632-2641.
- Budhu A, Gillilan R, Noy N. 2001. Localization of the RAR interaction domain of cellular retinoic acid binding protein-II. *J Mol Biol* 305: 939-949.
- Budhu AS, Noy N. 2002b. Direct channeling of retinoic acid between cellular retinoic acid-binding protein II and retinoic acid receptor sensitizes mammary carcinoma cells to retinoic acid-induced growth arrest. *Mol Cell Biol* 22: 2632-2641.
- Clagett-Dame M, DeLuca HF. 2002. The role of vitamin A in mammalian reproduction and embryonic development. *Annu Rev Nutr* 22: 347-381.
- Clark A, Bertram J. 1999. Molecular regulation of nephron endowment. *Am J Physiol* 276: F485-497.
- Collins M, Mao G. 1999. Teratology of retinoids. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39: 399-430.
- Custodio V, et al. 2009. Vitamin A deficiency among Brazilian school-aged children in a healthy child service. *Eur J Clin Nutr* 63: 485-490.
- Davidovici B, Tüzün Y, Wolf R. 2007. Retinoid receptors. *Dermatol Clin* 25: 525-530, viii.
- de Bakker PI, Yelensky R, Pe'er I, Gabriel SB, Daly MJ, Altshuler D. 2005. Efficiency and power in genetic association studies. *Nat Genet* 37: 1217-1223.
- de Botton S, et al. 2005. Autologous and allogeneic stem-cell transplantation as salvage treatment of acute promyelocytic leukemia initially treated with all-trans-retinoic acid: a retrospective analysis of the European acute promyelocytic leukemia group. *J Clin Oncol* 23: 120-126.
- de Urquiza A, Liu S, Sjöberg M, Zetterström R, Griffiths W, Sjövall J, Perlmann T. 2000. Docosahexaenoic acid, a ligand for the retinoid X receptor in mouse brain. *Science* 290: 2140-2144.

- Deltour L, Foglio M, Duester G. 1999. Metabolic deficiencies in alcohol dehydrogenase Adh1, Adh3, and Adh4 null mutant mice. Overlapping roles of Adh1 and Adh4 in ethanol clearance and metabolism of retinol to retinoic acid. *J Biol Chem* 274: 16796-16801.
- Delva L, Bastie J, Rochette-Egly C, Kraïba R, Balitrand N, Despouy G, Chambon P, Chomienne C. 1999. Physical and functional interactions between cellular retinoic acid binding protein II and the retinoic acid-dependent nuclear complex. *Mol Cell Biol* 19: 7158-7167.
- Dole K, Gilbert C, Deshpande M, Khandekar R. Prevalence and determinants of xerophthalmia in preschool children in urban slums, Pune, India--a preliminary assessment. *Ophthalmic Epidemiol* 16: 8-14.
- Dollé P, Ruberte E, Leroy P, Morriss-Kay G, Chambon P. 1990. Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins. I. A systematic study of their differential pattern of transcription during mouse organogenesis. *Development* 110: 1133-1151.
- Dong D, Ruuska SE, Levinthal DJ, Noy N. 1999. Distinct roles for cellular retinoic acid-binding proteins I and II in regulating signaling by retinoic acid. *J Biol Chem* 274: 23695-23698.
- Duester G. 1996. Involvement of alcohol dehydrogenase, short-chain dehydrogenase/reductase, aldehyde dehydrogenase, and cytochrome P450 in the control of retinoid signaling by activation of retinoic acid synthesis. *Biochemistry* 35: 12221-12227.
- . 2000. Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function: production of visual pigment and retinoic acid. *Eur J Biochem* 267: 4315-4324.
- . 2008. Retinoic acid synthesis and signaling during early organogenesis. *Cell* 134: 921-931.
- Dupé V, Matt N, Garnier J, Chambon P, Mark M, Ghyselinck N. 2003. A newborn lethal defect due to inactivation of retinaldehyde dehydrogenase type 3 is prevented by maternal retinoic acid treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 14036-14041.
- During A, Nagao A, Terao J. 1998. beta-carotene 15,15'-dioxygenase activity and cellular retinol-binding protein type II level are enhanced by dietary unsaturated triacylglycerols in rat intestines. *J Nutr* 128: 1614-1619.
- E X, Zhang L, Lu J, Tso P, Blaner W, Levin M, Li E. 2002. Increased neonatal mortality in mice lacking cellular retinol-binding protein II. *J Biol Chem* 277: 36617-36623.
- Eager N, Brickell P, Snell C, Wood J. 1992. Structural and functional evidence for activation of a chick retinoid X receptor by eicosanoids. *Proc Biol Sci* 250: 63-69.
- Eckhoff C, Nau H. 1990. Identification and quantitation of all-trans- and 13-cis-retinoic acid and 13-cis-4-oxoretinoic acid in human plasma. *J Lipid Res* 31: 1445-1454.

- Eichele G, Thaller C. 1987. Characterization of concentration gradients of a morphogenetically active retinoid in the chick limb bud. *J Cell Biol* 105: 1917-1923.
- Fiorella P, Napoli J. 1994. Microsomal retinoic acid metabolism. Effects of cellular retinoic acid-binding protein (type I) and C18-hydroxylation as an initial step. *J Biol Chem* 269: 10538-10544.
- Fraser P, Bramley P. 2004. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog Lipid Res* 43: 228-265.
- Fujii H, Sato T, Kaneko S, Gotoh O, Fujii-Kuriyama Y, Osawa K, Kato S, Hamada H. 1997. Metabolic inactivation of retinoic acid by a novel P450 differentially expressed in developing mouse embryos. *EMBO J* 16: 4163-4173.
- Gagnon I, Duester G, Bhat P. 2002. Kinetic analysis of mouse retinal dehydrogenase type-2 (RALDH2) for retinal substrates. *Biochim Biophys Acta* 1596: 156-162.
- Gaub M, Lutz Y, Ghyselinck N, Scheuer I, Pfister V, Chambon P, Rochette-Egly C. 1998. Nuclear detection of cellular retinoic acid binding proteins I and II with new antibodies. *J Histochem Cytochem* 46: 1103-1111.
- Gebre-Medhin M, Ewald U, Plantin L, Tuvemo T. 1984. Elevated serum selenium in diabetic children. *Acta Paediatr Scand* 73: 109-114.
- Gestl S, Green M, Shearer D, Frauenhoffer E, Tephly T, Weisz J. 2002. Expression of UGT2B7, a UDP-glucuronosyltransferase implicated in the metabolism of 4-hydroxyestrone and all-trans retinoic acid, in normal human breast parenchyma and in invasive and in situ breast cancers. *Am J Pathol* 160: 1467-1479.
- Ghyselinck N, et al. 1999. Cellular retinol-binding protein I is essential for vitamin A homeostasis. *EMBO J* 18: 4903-4914.
- Giguere V, Ong E, Segui P, Evans R. Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. *Nature* 330: 624-629.
- Gilbert T, Merlet-Bénichou C. 2000. Retinoids and nephron mass control. *Pediatr Nephrol* 14: 1137-1144.
- Glass C, Rosenfeld M, Rose D, Kurokawa R, Kamei Y, Xu L, Torchia J, Ogliastro M, Westin S. 1997. Mechanisms of transcriptional activation by retinoic acid receptors. *Biochem Soc Trans* 25: 602-605.
- GLOVER J, REDFEARN E. 1954. The mechanism of the transformation of beta-carotene into vitamin A in vivo. *Biochem J* 58: xv-xvi.
- Goodman D, Blomstrand R, Werner B, Huang H, Shiratori T. 1966. The intestinal absorption and metabolism of vitamin A and beta-carotene in man. *J Clin Invest* 45: 1615-1623.

- Goodyer P, et al. 2007. Effects of maternal vitamin A status on kidney development: a pilot study. *Pediatr Nephrol* 22: 209-214.
- Gorry P, Lufkin T, Dierich A, Rochette-Egly C, Décimo D, Dollé P, Mark M, Durand B, Chambon P. 1994. The cellular retinoic acid binding protein I is dispensable. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 9032-9036.
- Gottesman M, Quadro L, Blaner W. 2001. Studies of vitamin A metabolism in mouse model systems. *Bioessays* 23: 409-419.
- Graham T, et al. 2006. Retinol-binding protein 4 and insulin resistance in lean, obese, and diabetic subjects. *N Engl J Med* 354: 2552-2563.
- Gudas LJ. 1994. Retinoids and vertebrate development. *J Biol Chem* 269: 15399-15402.
- Gundersen T, Blomhoff R. 2001. Qualitative and quantitative liquid chromatographic determination of natural retinoids in biological samples. *J Chromatogr A* 935: 13-43.
- Gustafson A, Donovan M, Annerwall E, Dencker L, Eriksson U. 1996. Nuclear import of cellular retinoic acid-binding protein type I in mouse embryonic cells. *Mech Dev* 58: 27-38.
- Harrison E. 2005. Mechanisms of digestion and absorption of dietary vitamin A. *Annu Rev Nutr* 25: 87-103.
- Hathcock J, Hattan D, Jenkins M, McDonald J, Sundaresan P, Wilkening V. 1990. Evaluation of vitamin A toxicity. *Am J Clin Nutr* 52: 183-202.
- Heyman R, Mangelsdorf D, Dyck J, Stein R, Eichele G, Evans R, Thaller C. 1992. 9-cis retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor. *Cell* 68: 397-406.
- Hollander D. 1981. Intestinal absorption of vitamins A, E, D, and K. *J Lab Clin Med* 97: 449-462.
- Horton C, Maden M. 1995. Endogenous distribution of retinoids during normal development and teratogenesis in the mouse embryo. *Dev Dyn* 202: 312-323.
- Hoy W, Wang Z, VanBuynder P, Baker P, McDonald S, Mathews J. 2001. The natural history of renal disease in Australian Aborigines. Part 2. Albuminuria predicts natural death and renal failure. *Kidney Int* 60: 249-256.
- HUANG H, GOODMAN D. 1965. VITAMIN A AND CAROTENOIDS. I. INTESTINAL ABSORPTION AND METABOLISM OF 14C-LABELLED VITAMIN A ALCOHOL AND BETA-CAROTENE IN THE RAT. *J Biol Chem* 240: 2839-2844.
- Hébuterne X, Wang X, Johnson E, Krinsky N, Russell R. 1995. Intestinal absorption and metabolism of 9-cis-beta-carotene in vivo: biosynthesis of 9-cis-retinoic acid. *J Lipid Res* 36: 1264-1273.
- Jiang J, Lin L, Lian G, Greiner T. 2008. Vitamin A deficiency and child feeding in Beijing and Guizhou, China. *World J Pediatr* 4: 20-25.

- Jing Y, Waxman S, Mira-y-Lopez R. 1997. The cellular retinoic acid binding protein II is a positive regulator of retinoic acid signaling in breast cancer cells. *Cancer Res* 57: 1668-1672.
- Kalua K, Patel D, Muhit M, Courtright P. 2008. Causes of blindness among children identified through village key informants in Malawi. *Can J Ophthalmol* 43: 425-427.
- Kanai M, Raz A, Goodman D. 1968. Retinol-binding protein: the transport protein for vitamin A in human plasma. *J Clin Invest* 47: 2025-2044.
- Kane J, Chen G, Hamilton R, Hardman D, Malloy M, Havel R. Remnants of lipoproteins of intestinal and hepatic origin in familial dysbetalipoproteinemia. *Arteriosclerosis* 3: 47-56.
- Kane M, Chen N, Sparks S, Napoli J. 2005. Quantification of endogenous retinoic acid in limited biological samples by LC/MS/MS. *Biochem J* 388: 363-369.
- Kato M, Blaner W, Mertz J, Das K, Kato K, Goodman D. 1985. Influence of retinoid nutritional status on cellular retinol- and cellular retinoic acid-binding protein concentrations in various rat tissues. *J Biol Chem* 260: 4832-4838.
- Kavanagh K, Jörnvall H, Persson B, Oppermann U. 2008. Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families : the SDR superfamily: functional and structural diversity within a family of metabolic and regulatory enzymes. *Cell Mol Life Sci* 65: 3895-3906.
- Keller G, Zimmer G, Mall G, Ritz E, Amann K. 2003. Nephron number in patients with primary hypertension. *N Engl J Med* 348: 101-108.
- Kiefer C, Hessel S, Lampert J, Vogt K, Lederer M, Breithaupt D, von Lintig J. 2001. Identification and characterization of a mammalian enzyme catalyzing the asymmetric oxidative cleavage of provitamin A. *J Biol Chem* 276: 14110-14116.
- Kim C. 2008. Roles of retinoic acid in induction of immunity and immune tolerance. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 8: 289-294.
- Kitareewan S, et al. 1996. Phytol metabolites are circulating dietary factors that activate the nuclear receptor RXR. *Mol Biol Cell* 7: 1153-1166.
- Krust A, Kastner P, Petkovich M, Zelent A, Chambon P. 1989. A third human retinoic acid receptor, hRAR-gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 5310-5314.
- Lampron C, Rochette-Egly C, Gorry P, Dollé P, Mark M, Lufkin T, LeMeur M, Chambon P. 1995. Mice deficient in cellular retinoic acid binding protein II (CRABP II) or in both CRABPI and CRABP II are essentially normal. *Development* 121: 539-548.
- Lee J, Newman R, Lippman S, Huber M, Minor T, Raber M, Krakoff I, Hong W. 1993. Phase I evaluation of all-trans-retinoic acid in adults with solid tumors. *J Clin Oncol* 11: 959-966.

- Lelièvre-Pégorier M, Vilar J, Ferrier M, Moreau E, Freund N, Gilbert T, Merlet-Bénichou C. 1998. Mild vitamin A deficiency leads to inborn nephron deficit in the rat. *Kidney Int* 54: 1455-1462.
- Li E, Norris A. 1996. Structure/function of cytoplasmic vitamin A-binding proteins. *Annu Rev Nutr* 16: 205-234.
- Li E, Tso P. 2003. Vitamin A uptake from foods. *Curr Opin Lipidol* 14: 241-247.
- Liao Y, Ho S, Liou J. 2004. Non-genomic regulation of transmitter release by retinoic acid at developing motoneurons in *Xenopus* cell culture. *J Cell Sci* 117: 2917-2924.
- Lidén M, Eriksson U. 2005. Development of a versatile reporter assay for studies of retinol uptake and metabolism in vivo. *Exp Cell Res* 310: 401-408.
- Liu W, Hellman P, Li Q, Yu W, Juhlin C, Nordlinder H, Rollman O, Akerström G, Törmä H, Melhus H. 1996. Biosynthesis and function of all-trans- and 9-cis-retinoic acid in parathyroid cells. *Biochem Biophys Res Commun* 229: 922-929.
- Loudig O, Babichuk C, White J, Abu-Abed S, Mueller C, Petkovich M. 2000. Cytochrome P450RAI(CYP26) promoter: a distinct composite retinoic acid response element underlies the complex regulation of retinoic acid metabolism. *Mol Endocrinol* 14: 1483-1497.
- Luo T, Wagner E, Dräger U. 2009. Integrating retinoic acid signaling with brain function. *Dev Psychol* 45: 139-150.
- Mackenzie H, Lawler E, Brenner B. 1996. Congenital oligonephropathy: The fetal flaw in essential hypertension? *Kidney Int Suppl* 55: S30-34.
- Maden M. 1994. Distribution of cellular retinoic acid-binding proteins I and II in the chick embryo and their relationship to teratogenesis. *Teratology* 50: 294-301.
- . 2004. Retinoids in lung development and regeneration. *Curr Top Dev Biol* 61: 153-189.
- Makrakis J, Zimanyi M, Black M. 2007. Retinoic acid enhances nephron endowment in rats exposed to maternal protein restriction. *Pediatr Nephrol* 22: 1861-1867.
- Mangelsdorf D. 1994. Vitamin A receptors. *Nutr Rev* 52: S32-44.
- Mangelsdorf D, Ong E, Dyck J, Evans R. 1990. Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway. *Nature* 345: 224-229.
- Marlier A, Gilbert T. 2004. Expression of retinoic acid-synthesizing and -metabolizing enzymes during nephrogenesis in the rat. *Gene Expr Patterns* 5: 179-185.
- McClellan SW, Ruddel ME, Gross EG, DeGiovanna JJ, Peck GL. 1982. Liquid-chromatographic assay for retinol (vitamin A) and retinol analogs in therapeutic trials. *Clin Chem* 28: 693-696.

- Mendelsohn C, Batourina E, Fung S, Gilbert T, Dodd J. 1999. Stromal cells mediate retinoid-dependent functions essential for renal development. *Development* 126: 1139-1148.
- Moise A, Noy N, Palczewski K, Blaner W. 2007. Delivery of retinoid-based therapies to target tissues. *Biochemistry* 46: 4449-4458.
- Morriss-Kay G, Sokolova N. 1996. Embryonic development and pattern formation. *FASEB J* 10: 961-968.
- Muhilal, Permeisih D, Idjradinata Y, Muherdiyantiningsih, Karyadi D. 1988. Vitamin A-fortified monosodium glutamate and health, growth, and survival of children: a controlled field trial. *Am J Clin Nutr* 48: 1271-1276.
- Nagao A. 2004. Oxidative conversion of carotenoids to retinoids and other products. *J Nutr* 134: 237S-240S.
- Nagpal S, Chandraratna R. 2000. Recent developments in receptor-selective retinoids. *Curr Pharm Des* 6: 919-931.
- Napoli J. 1996. Biochemical pathways of retinoid transport, metabolism, and signal transduction. *Clin Immunol Immunopathol* 80: S52-62.
- . 2000. A gene knockout corroborates the integral function of cellular retinol-binding protein in retinoid metabolism. *Nutr Rev* 58: 230-236.
- . 2001. 17beta-Hydroxysteroid dehydrogenase type 9 and other short-chain dehydrogenases/reductases that catalyze retinoid, 17beta- and 3alpha-hydroxysteroid metabolism. *Mol Cell Endocrinol* 171: 103-109.
- Napoli J, Race K. 1988. Biogenesis of retinoic acid from beta-carotene. Differences between the metabolism of beta-carotene and retinal. *J Biol Chem* 263: 17372-17377.
- Nayak N, Harrison E, Hussain M. 2001. Retinyl ester secretion by intestinal cells: a specific and regulated process dependent on assembly and secretion of chylomicrons. *J Lipid Res* 42: 272-280.
- Nezzar H, Chiambaretta F, Marceau G, Blanchon L, Faye B, Dechelotte P, Rigal D, Sapin V. 2007. Molecular and metabolic retinoid pathways in the human ocular surface. *Mol Vis* 13: 1641-1650.
- Niederreither K, Subbarayan V, Dollé P, Chambon P. 1999a. Embryonic retinoic acid synthesis is essential for early mouse post-implantation development. *Nat Genet* 21: 444-448.
- Niederreither K, Subbarayan V, Dolle P, Chambon P. 1999b. Embryonic retinoic acid synthesis is essential for early mouse post-implantation development. *Nat Genet* 21: 444-448.

- Niederreither K, Vermot J, Schuhbauer B, Chambon P, Dolle P. 2000. Retinoic acid synthesis and hindbrain patterning in the mouse embryo. *Development* 127: 75-85.
- Niederreither K, Vermot J, Fraulob V, Chambon P, Dolle P. 2002. Retinaldehyde dehydrogenase 2 (RALDH2)- independent patterns of retinoic acid synthesis in the mouse embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 16111-16116.
- Niederreither K, Vermot J, Messaddeq N, Schuhbauer B, Chambon P, Dolle P. 2001. Embryonic retinoic acid synthesis is essential for heart morphogenesis in the mouse. *Development* 128: 1019-1031.
- Niederreither K, Vermot J, Le Roux I, Schuhbauer B, Chambon P, Dollé P. 2003. The regional pattern of retinoic acid synthesis by RALDH2 is essential for the development of posterior pharyngeal arches and the enteric nervous system. *Development* 130: 2525-2534.
- Niles R. 2003. Vitamin A (retinoids) regulation of mouse melanoma growth and differentiation. *J Nutr* 133: 282S-286S.
- . 2004. Signaling pathways in retinoid chemoprevention and treatment of cancer. *Mutat Res* 555: 81-96.
- Noy N. 2000. Retinoid-binding proteins: mediators of retinoid action. *Biochem J* 348 Pt 3: 481-495.
- Nyengaard J, Bendtsen T. 1992. Glomerular number and size in relation to age, kidney weight, and body surface in normal man. *Anat Rec* 232: 194-201.
- O'Byrne S, Wongsiriroj N, Libien J, Vogel S, Goldberg I, Baehr W, Palczewski K, Blaner W. 2005. Retinoid absorption and storage is impaired in mice lacking lecithin:retinol acyltransferase (LRAT). *J Biol Chem* 280: 35647-35657.
- Oakes D. 1982. A concordance test for independence in the presence of censoring. *Biometrics* 38: 451-455.
- Ochoa W, Torrecillas A, Fita I, Verdaguer N, Corbalán-García S, Gomez-Fernandez J. 2003. Retinoic acid binds to the C2-domain of protein kinase C(alpha). *Biochemistry* 42: 8774-8779.
- Ong D. 1994. Cellular transport and metabolism of vitamin A: roles of the cellular retinoid-binding proteins. *Nutr Rev* 52: S24-31.
- Ong D, Newcomer M, Lareyre J, Orgebin-Crist M. 2000. Epididymal retinoic acid-binding protein. *Biochim Biophys Acta* 1482: 209-217.
- Ono Y, Fukuhara N, Yoshie O. 1998. TAL1 and LIM-only proteins synergistically induce retinaldehyde dehydrogenase 2 expression in T-cell acute lymphoblastic leukemia by acting as cofactors for GATA3. *Mol Cell Biol* 18: 6939-6950.

- Orland M, Anwar K, Cromley D, Chu C, Chen L, Billheimer J, Hussain M, Cheng D. 2005. Acyl coenzyme A dependent retinol esterification by acyl coenzyme A: diacylglycerol acyltransferase 1. *Biochim Biophys Acta* 1737: 76-82.
- Paik J, Vogel S, Quadro L, Piantedosi R, Gottesman M, Lai K, Hamberger L, Vieira MM, Blaner W. 2004. Vitamin A: overlapping delivery pathways to tissues from the circulation. *J Nutr* 134: 276S-280S.
- Pal R, Sagar V. 2008. Antecedent risk factors of xerophthalmia among Indian rural preschool children. *Eye Contact Lens* 34: 106-108.
- Palczewski K, Saari J. 1997. Activation and inactivation steps in the visual transduction pathway. *Curr Opin Neurobiol* 7: 500-504.
- Parker R. 1996. Absorption, metabolism, and transport of carotenoids. *FASEB J* 10: 542-551.
- Parés X, Farrés J, Kedishvili N, Duester G. 2008. Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families : Medium-chain and short-chain dehydrogenases/reductases in retinoid metabolism. *Cell Mol Life Sci* 65: 3936-3949.
- Persson B, et al. 2009. The SDR (short-chain dehydrogenase/reductase and related enzymes) nomenclature initiative. *Chem Biol Interact* 178: 94-98.
- Peterson P, Rask L. 1971. Studies on the fluorescence of the human vitamin A-transporting plasma protein complex and its individual components. *J Biol Chem* 246: 7544-7550.
- Petkovich M. 1992. Regulation of gene expression by vitamin A: the role of nuclear retinoic acid receptors. *Annu Rev Nutr* 12: 443-471.
- Petkovich M, Brand N, Krust A, Chambon P. A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. *Nature* 330: 444-450.
- Petkovich P. 2001. Retinoic acid metabolism. *J Am Acad Dermatol* 45: S136-142.
- Piantedosi R, Ghyselinck N, Blaner W, Vogel S. 2005. Cellular retinol-binding protein type III is needed for retinoid incorporation into milk. *J Biol Chem* 280: 24286-24292.
- Quadro L, Hamberger L, Colantuoni V, Gottesman M, Blaner W. 2003. Understanding the physiological role of retinol-binding protein in vitamin A metabolism using transgenic and knockout mouse models. *Mol Aspects Med* 24: 421-430.
- Radomska-Pandya A, Chen G, Czernik P, Little J, Samokyszyn V, Carter C, Nowak G. 2000. Direct interaction of all-trans-retinoic acid with protein kinase C (PKC). Implications for PKC signaling and cancer therapy. *J Biol Chem* 275: 22324-22330.
- Rahmatullah M, Roche T. 1988. Component requirements for NADH inhibition and spermine stimulation of pyruvate dehydrogenaseb phosphatase activity. *J Biol Chem* 263: 8106-8110.

- Rajan N, Kidd G, Talmage D, Blaner W, Suhara A, Goodman D. 1991. Cellular retinoic acid-binding protein messenger RNA: levels in rat tissues and localization in rat testis. *J Lipid Res* 32: 1195-1204.
- Rastinejad F. 2001. Retinoid X receptor and its partners in the nuclear receptor family. *Curr Opin Struct Biol* 11: 33-38.
- Ray W, Bain G, Yao M, Gottlieb D. 1997. CYP26, a novel mammalian cytochrome P450, is induced by retinoic acid and defines a new family. *J Biol Chem* 272: 18702-18708.
- Renaud J, Moras D. 2000. Structural studies on nuclear receptors. *Cell Mol Life Sci* 57: 1748-1769.
- Romand R, Albuissou E, Niederreither K, Fraulob V, Chambon P, Dollé P. 2001. Specific expression of the retinoic acid-synthesizing enzyme RALDH2 during mouse inner ear development. *Mech Dev* 106: 185-189.
- Ross A. 1993. Overview of retinoid metabolism. *J Nutr* 123: 346-350.
- Ross A, Zolfaghari R. 2004. Regulation of hepatic retinol metabolism: perspectives from studies on vitamin A status. *J Nutr* 134: 269S-275S.
- Ross SA, McCaffery PJ, Drager UC, De Luca LM. 2000. Retinoids in embryonal development. *Physiol Rev* 80: 1021-1054.
- Ruff S, Ong D. 2000. Cellular retinoic acid binding protein is associated with mitochondria. *FEBS Lett* 487: 282-286.
- Saari J, Nawrot M, Stenkamp R, Teller D, Garwin G. 2009. Release of 11-cis-retinal from cellular retinaldehyde-binding protein by acidic lipids. *Mol Vis* 15: 844-854.
- Sakai Y, Meno C, Fujii H, Nishino J, Shiratori H, Saijoh Y, Rossant J, Hamada H. 2001. The retinoic acid-inactivating enzyme CYP26 is essential for establishing an uneven distribution of retinoic acid along the antero-posterior axis within the mouse embryo. *Genes Dev* 15: 213-225.
- Sakhi A, Gundersen T, Ulven S, Blomhoff R, Lundanes E. 1998. Quantitative determination of endogenous retinoids in mouse embryos by high-performance liquid chromatography with on-line solid-phase extraction, column switching and electrochemical detection. *J Chromatogr A* 828: 451-460.
- Sanz M. 2006. Treatment of acute promyelocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 147-155.
- Sass J, Tzimas G, Elmazar M, Nau H. 1999. Metabolism of retinaldehyde isomers in pregnant rats: 13-cis- and all-trans-retinaldehyde, but not 9-cis-retinaldehyde, yield very similar patterns of retinoid metabolites. *Drug Metab Dispos* 27: 317-321.
- Schmidt C, Brouwer A, Nau H. 2003. Chromatographic analysis of endogenous retinoids in tissues and serum. *Anal Biochem* 315: 36-48.

- Schweigert F, Bonitz K, Siegling C, Buchholz I. 1999. Distribution of vitamin A, retinol-binding protein, cellular retinoic acid-binding protein I, and retinoid X receptor beta in the porcine uterus during early gestation. *Biol Reprod* 61: 906-911.
- Seeliger M, Biesalski H, Wissinger B, Gollnick H, Gielen S, Frank J, Beck S, Zrenner E. 1999. Phenotype in retinol deficiency due to a hereditary defect in retinol binding protein synthesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40: 3-11.
- Shah R, Rajalakshmi R, Bhatt R, Hazra M, Patel B, Swamy N, Patel T. 1987. Liver stores of vitamin A in human fetuses in relation to gestational age, fetal size and maternal nutritional status. *Br J Nutr* 58: 181-189.
- Shenai J, Chytil F, Stahlman M. 1985. Liver vitamin A reserves of very low birth weight neonates. *Pediatr Res* 19: 892-893.
- Shin E, Seong Y, Kim C, Kim H, Ahn Y, Kim K, Kim S, Hong S, Park J. 2002. Human hepatocellular carcinoma cells resist to TRAIL-induced apoptosis, and the resistance is abolished by cisplatin. *Exp Mol Med* 34: 114-122.
- Shulman A, Mangelsdorf D. 2005. Retinoid x receptor heterodimers in the metabolic syndrome. *N Engl J Med* 353: 604-615.
- Solomin L, Johansson C, Zetterström R, Bissonnette R, Heyman R, Olson L, Lendahl U, Frisé J, Perlmann T. 1998. Retinoid-X receptor signalling in the developing spinal cord. *Nature* 395: 398-402.
- Sommer A, Tarwotjo I, Djunaedi E, West KJ, Loeden A, Tilden R, Mele L. 1986. Impact of vitamin A supplementation on childhood mortality. A randomised controlled community trial. *Lancet* 1: 1169-1173.
- Spinella M, Kerley J, White K, Curtin J. 2003. Retinoid target gene activation during induced tumor cell differentiation: human embryonal carcinoma as a model. *J Nutr* 133: 273S-276S.
- Sporn M, Roberts A. 1984. Role of retinoids in differentiation and carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 73: 1381-1387.
- . 1994. Cervical dysplasia regression induced by all-trans-retinoic acid. *J Natl Cancer Inst* 86: 476-477.
- Sporn M, Suh N. 2000. Chemoprevention of cancer. *Carcinogenesis* 21: 525-530.
- Stephensen C. 2001. Vitamin A, infection, and immune function. *Annu Rev Nutr* 21: 167-192.
- Suruga K, Suzuki R, Goda T, Takase S. 1995. Unsaturated fatty acids regulate gene expression of cellular retinol-binding protein, type II in rat jejunum. *J Nutr* 125: 2039-2044.
- Thaller C, Eichele G. Identification and spatial distribution of retinoids in the developing chick limb bud. *Nature* 327: 625-628.

- Thielitz A, Abdel-Naser M, Fluhr J, Zouboulis C, Gollnick H. 2008. Topical retinoids in acne--an evidence-based overview. *J Dtsch Dermatol Ges* 6: 1023-1031.
- Trumbo P, Yates A, Schlicker S, Poos M. 2001. Dietary reference intakes: vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. *J Am Diet Assoc* 101: 294-301.
- Ulven S, Gundersen T, Sakhi A, Glover J, Blomhoff R. 2001. Quantitative axial profiles of retinoic acid in the embryonic mouse spinal cord: 9-cis retinoic acid only detected after all-trans-retinoic acid levels are super-elevated experimentally. *Dev Dyn* 222: 341-353.
- Urbach J, Rando R. 1994. Thiol dependent isomerization of all-trans-retinoic acid to 9-cis-retinoic acid. *FEBS Lett* 351: 429-432.
- van Bennekum A, Werder M, Thuahnai S, Han C, Duong P, Williams D, Wettstein P, Schulthess G, Phillips M, Hauser H. 2005. Class B scavenger receptor-mediated intestinal absorption of dietary beta-carotene and cholesterol. *Biochemistry* 44: 4517-4525.
- Vasiliou V, Nebert D. 2005. Analysis and update of the human aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene family. *Hum Genomics* 2: 138-143.
- Vieira M, Paik J, Blaner W, Soares A, Mota R, Guerrant R, Lima A. 2008. Carotenoids, retinol, and intestinal barrier function in children from northeastern Brazil. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 47: 652-659.
- Vilar J, Gilbert T, Moreau E, Merlet-Bénichou C. 1996. Metanephros organogenesis is highly stimulated by vitamin A derivatives in organ culture. *Kidney Int* 49: 1478-1487.
- Villamor E, Fawzi W. 2005. Effects of vitamin a supplementation on immune responses and correlation with clinical outcomes. *Clin Microbiol Rev* 18: 446-464.
- Wang X, Krinsky N. 1997. Identification and quantification of retinoic acid and other metabolites from beta-carotene excentric cleavage in human intestine in vitro and ferret intestine in vivo. *Methods Enzymol* 282: 117-130.
- Wang X, Penzes P, Napoli JL. 1996a. Cloning of a cDNA encoding an aldehyde dehydrogenase and its expression in *Escherichia coli*. Recognition of retinal as substrate. *J Biol Chem* 271: 16288-16293.
- Wang X, Russell R, Liu C, Stickel F, Smith D, Krinsky N. 1996b. Beta-oxidation in rabbit liver in vitro and in the perfused ferret liver contributes to retinoic acid biosynthesis from beta-apocarotenoic acids. *J Biol Chem* 271: 26490-26498.
- Warrell RJ. 1996. Pathogenesis and management of acute promyelocytic leukemia. *Annu Rev Med* 47: 555-565.
- Wei S, Episkopou V, Piantedosi R, Maeda S, Shimada K, Gottesman M, Blaner W. 1995. Studies on the metabolism of retinol and retinol-binding protein in transthyretin-deficient mice produced by homologous recombination. *J Biol Chem* 270: 866-870.

- Weng W, Li L, van Bennekum A, Potter S, Harrison E, Blaner W, Breslow J, Fisher E. 1999. Intestinal absorption of dietary cholesteryl ester is decreased but retinyl ester absorption is normal in carboxyl ester lipase knockout mice. *Biochemistry* 38: 4143-4149.
- White J, Beckett B, Scherer S, Herbrick J, Petkovich M. 1998. P450RAI (CYP26A1) maps to human chromosome 10q23-q24 and mouse chromosome 19C2-3. *Genomics* 48: 270-272.
- White J, Beckett-Jones B, Guo Y, Dilworth F, Bonasoro J, Jones G, Petkovich M. 1997. cDNA cloning of human retinoic acid-metabolizing enzyme (hP450RAI) identifies a novel family of cytochromes P450. *J Biol Chem* 272: 18538-18541.
- White J, Guo Y, Baetz K, Beckett-Jones B, Bonasoro J, Hsu K, Dilworth F, Jones G, Petkovich M. 1996. Identification of the retinoic acid-inducible all-trans-retinoic acid 4-hydroxylase. *J Biol Chem* 271: 29922-29927.
- White J, Ramshaw H, Taimi M, Stangle W, Zhang A, Everingham S, Creighton S, Tam S, Jones G, Petkovich M. 2000. Identification of the human cytochrome P450, P450RAI-2, which is predominantly expressed in the adult cerebellum and is responsible for all-trans-retinoic acid metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 6403-6408.
- Willhite C, Wier P, Berry D. 1989. Dose response and structure-activity considerations in retinoid-induced dysmorphogenesis. *Crit Rev Toxicol* 20: 113-135.
- WILSON J, ROTH C, WARKANY J. 1953. An analysis of the syndrome of malformations induced by maternal vitamin A deficiency. Effects of restoration of vitamin A at various times during gestation. *Am J Anat* 92: 189-217.
- Wongsiriroj N, Piantedosi R, Palczewski K, Goldberg I, Johnston T, Li E, Blaner W. 2008. The molecular basis of retinoid absorption: a genetic dissection. *J Biol Chem* 283: 13510-13519.
- Wyss R, Bucheli F. 1997. Determination of endogenous levels of 13-cis-retinoic acid (isotretinoin), all-trans-retinoic acid (tretinoin) and their 4-oxo metabolites in human and animal plasma by high-performance liquid chromatography with automated column switching and ultraviolet detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 700: 31-47.
- Yang Q, Graham T, Mody N, Preitner F, Peroni O, Zabolotny J, Kotani K, Quadro L, Kahn B. 2005. Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature* 436: 356-362.
- Yashiro K, Zhao X, Uehara M, Yamashita K, Nishijima M, Nishino J, Saijoh Y, Sakai Y, Hamada H. 2004. Regulation of retinoic acid distribution is required for proximodistal patterning and outgrowth of the developing mouse limb. *Dev Cell* 6: 411-422.
- Yen C, Monetti M, Burri B, Farese RJ. 2005. The triacylglycerol synthesis enzyme DGAT1 also catalyzes the synthesis of diacylglycerols, waxes, and retinyl esters. *J Lipid Res* 46: 1502-1511.

Zheng W, Ong D. 1998. Spatial and temporal patterns of expression of cellular retinol-binding protein and cellular retinoic acid-binding proteins in rat uterus during early pregnancy. *Biol Reprod* 58: 963-970.

Ziouzenkova O, Plutzky J. 2008. Retinoid metabolism and nuclear receptor responses: New insights into coordinated regulation of the PPAR-RXR complex. *FEBS Lett* 582: 32-38.

Ziouzenkova O, Orasanu G, Sukhova G, Lau E, Berger J, Tang G, Krinsky N, Dolnikowski G, Plutzky J. 2007. Asymmetric cleavage of beta-carotene yields a transcriptional repressor of retinoid X receptor and peroxisome proliferator-activated receptor responses. *Mol Endocrinol* 21: 77-88.

## Bibliographie Complémentaire

**N.B. Suite à une faille informatique majeure dans le Logiciel EndNote pour l'édition des références, au milieu du processus de rédaction, il a fallu introduire à la main cette Bibliografie complementaire. Ainsi le cumul des deux listes couvre parfaitement l'ensemble des références du Mémoire de Maîtrise. Merci de votre compréhension.**

Abu J, Batuwangala M, Herbert K, Symonds P. 2005. Retinoic acid and retinoid receptors: potential chemopreventive and therapeutic role in cervical cancer. *Lancet Oncol. Sep*; 6 (9): 712-20.

Abu-Abed S, Beckett BR, Chiba H, Chithalen JV, Jones G, Metzger D, Chambon P, Petkovich M. 1998. Mouse P450RAI (CYP26) expression and retinoic acid inducible retinoic acid metabolism in F9 cells are regulated by retinoic acid receptor  $\gamma$  and retinoic X receptor  $\alpha$ . *J. Biol. Chem.* 273 (4) 2409-2415.

Abu-Abed S, Dollé P, Metzger D, Beckett B, Chambon P, Petkovich M. 2001. The retinoic acid-metabolizing enzyme, CYP26A1, is essential for normal hindbrain patterning, vertebral identity, and development of posterior structures. *Genes Dev* 15: 226-240.

Aeberli I, Biebinger R, Lehmann R, L'allemand D, Spinass GA, Zimmermann MB. 2007. Serum retinol-binding protein 4 concentration and its ratio to serum retinol are associated with obesity and metabolic syndrome components in children. *J Clin Endocrinol Metab.* Nov; 92 (11): 4359-65. Epub 2007 Aug 28.

Ansstas George, Thakore J. 2008. Vitamin A Deficiency. eMedicine Endocrinology, Department of Internal Medicine, Saint-Louis University, USA.

Baehr W, Wu SM, Bird AC, Palczewski K. 2003. The retinoid cycle and retina disease. *Vision Res* 43: 2957-2958.

Bajogli AA, Gilchrest BA. 2000. Retinoids treatment of photoaged skin, *Molecular and Cell Biology Updates/Vitamin A and Retinoids: An Update of Biological Aspects and Clinical Applications*, Ed.M.A.Livrea, Birkhäuser Verlag Berlin p.261

Balmer J, Blomhoff R. 2005. A robust characterization of retinoic acid response elements based on a comparison of sites in three species. *J Steroid Biochem Mol Biol* 96: 347-354.

Balmer JE, Blomhoff R. 2002. Gene expression regulation by retinoic acid. *J Lipid Res.* Nov; 43 (11): 1773-808.

Banfi P, Lanzi C, Falvella FS, Gariboldi M, Gambetta RA, Dragani TA. 1994. The daunorubicin-binding protein of Mr 54000 is an aldehyde dehydrogenase and is down-regulated in mouse liver tumors and in tumors cell lines. *Mol.Pharmacol.* 46 896-900.

Barua AB. 1997. Retinoyl  $\beta$ -glucuronide: a biological active form of vitamin A. *Nutr Rev.* 55, 259-267.

- Barua AB, Olson JA. 1986. Chemical synthesis of all-trans retinoyl beta-glucuronide. *J Lipid Res.* Oct; 26 (10): 1277-82.
- Barua AB, Sidell N. 2004. Retinoyl beta-glucuronide: a biologically active interesting retinoid. *J Nutr.* Jan; 134 (1): 286S-289S.
- Bassan R, Battista R, Viero P, d'Emilio A, Buelli M, Montaldi A, Rambaldi A, Tremul L, Dini E, Barbui T. 1995. Short-term treatment for adult hypergranular and microgranular acute promyelocytic leukemia. *Leukemia.* Feb; 9 (2): 238-43.
- Barry JB, Giguère V, Epidermal growth factor-induced signaling in breast cancer cells results in selective target gene activation by *orphan nuclear receptor* estrogen-related receptor alpha. *Cancer Res.* 2005 Jul 15;65(14):6120-9.
- Bailey TL, Baker ME, Elkan CP, An artificial intelligence approach to motif discovery in protein sequences: application to steroid dehydrogenases. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1997 May;62(1):29-44.
- Benbrook D, Lenhardt E, Pfahl M. 1988. A new retinoic acid receptor identified from a hepatocellular carcinoma. *Nature* 333 669-672.
- Bender A. David, *Nutritional Biochemistry* II-ed, Cambridge University, 2003
- Bennett JM. 1980. Acute myelogenous leukemia. *Med Pediatr Oncol.* 1979;7(3):299.
- Bennett JM. 1976. Chronic lymphocytic leukemia: therapeutic options. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* Mar-Apr; 1 (5-6): 559-60
- Berggren K, Ezerman EB, McCaffery B, Forehand CJ. 2001. Expression and regulation of the retinoic acid synthetis enzyme RALDH2, in the embryonic chicken wing. *Dev Dyn.* 222:1-16.
- Bernard J, Weil M, Boiron M, Jacquillat C, Flandrin G, Gemon MF. 1973. Acute promyelocytic leukemia: results of treatment by daunorubicin. *Blood.* Apr; 41 (4): 489-96.
- Bertram JS. Proposed role of gap junctional communication in retinoid-induced suppression of proliferation and inhibition of neoplastic transformations, *Molecular and Cell Biology Updates/Vitamin A and Retinoids: An Update of Biological Aspects and Clinical Applications*, Ed.M.A.Livrea, Birkhäuser Verlag Berlin 2000, p.197
- Bhat PV, Marcinkiewicz M, Li Y, Mader S. 1998. Changing patterns of renal retinal dehydrogenase expression parallel nephron development in the rat. *J. Histochem. Cytochem.* **46**, 1025-1032.
- Biesalski H.K. 1989. Comparative assessment of the toxicology of vitamin A and retinoids in man. *Toxicology*, 57, 117-161.
- Bloch CE. 1919. Klinische untersuchungenüber dystrophie und xerophthalmie by ungen kinder. *Kinderheilk.* 89 409-441.
- Boylan JF, Gudas LJ. 1991. Overexpression of the cellular retinoic acid binding protein-I (CRABP-I) results in a reduction in differenciation-specific gene expression in F9 teratocarcinoma cells. *J Cell Biol.* 112 965-979.

- Boylan JF, Gudas LJ. 1992. The level of CRABP-I expression influences the amounts and types of all-trans retinoic acid metabolites in F9 teratocarcinoma stem cells. *J Biol. Chem.* 267 21486-21491.
- Brodeur H, Chagnon S, Parisotto M, Mader S, Bhat P. 2006. Kinetic properties of chimeric class I aldehyde dehydrogenases for retinal isomers. *Biochem Cell Biol* 84: 799-804.
- Butler WB, Fontana JA. 1992. Responses to retinoic acid of tamoxifen-sensitive and resistant sublines of human breast cancer cell line MCF-7. *Cancer Res.* 52 6164-6167.
- Cao X, Liu W, Lin F, Li H, Kolluri SK, Lin B, Han YH, Dawson MI, Zhang XK. Retinoid X receptor regulates Nur77/TR3-dependent apoptosis [corrected] by modulating its nuclear export and mitochondrial targeting. *Mol Cell Biol.* 2004 Nov;24(22):9705-25. Erratum in: *Mol Cell Biol.* 2005 Jan;25(1):524.
- Chambon P. 2004. How I became one of the fathers of a superfamily. *Nat Med* 10: 1027-1031.
- Chambon P. 1996. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J.* 10 940-954.
- Chomienne C, Fenaux P, Degos L. 1996. Retinoid differentiation therapy in promyelocytic leukemia. *FASEB J.* 10 1025-1030.
- Clagett-Dame M and DeLuca HF. 2002. The role of Vitamin A in Mammalian Reproduction and Embryonic Development, *Annual Reviews* 2002.
- Collins, M.D., Mao, G.E. 1999. Teratology of retinoids. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39, 399-430.
- Creech Kraft, 2000, Retinoid metabolism in the embryo, *Molecular and Cell Biology Updates/Vitamin A and Retinoids: An Update of Biological Aspects and Clinical Applications*, Ed.M.A.Livrea, Birkhäuser Verlag Berlin, p.109
- Crouch RK and Ma JX. 2000. The role of vitamin A in visual transduction, *Molecular and Cell Biology Updates/Vitamin A and Retinoids: An Update of Biological Aspects and Clinical Applications*, Ed.M.A.Livrea, Birkhäuser Verlag Berlin, p.59
- Dawson MI, Zhang X, PD Hobbs and L Jong. 2000. Synthetic retinoids and their usefulness in biology and medicine, *Molecular and Cell Biology Updates/Vitamin A and Retinoids: An Update of Biological Aspects and Clinical Applications*, Ed.M.A.Livrea, Birkhäuser Verlag Berlin, p.161
- De Thé H, Tiollais P, Dejean A. 1990. The retinoic acid receptors. *Nouv Rev Fr Hematol* 32: 30-32.
- De Thé H, Vivanco-Ruitz MM, Tiollais P, Stunnenberg H, Dejean A. 1990. Identification of a retinoic acid responsive element in the retinoic acid receptor  $\beta$  gene. *Nature* 343 177-180.

- De Thé H, Marchio A, Thiollais P, Dejean A. 1989. Differential expression and ligand regulation of retinoic receptor  $\alpha$  and  $\beta$  genes. *EMBO J.* 8 429-433.
- De Thé H, Lavau C, Marchio A, Chomienne C, Degos L, Dejean A. 1991. The PML-RAR alpha fusion mRNA generated by the t(15;17) translocation in acute promyelocytic leukemia encodes a functionally altered RAR. *Cell* 66 675-684.
- Deitrich R.A. 1971, Genetic aspects of increase in rat liver aldehyde dehydrogenase induced by Phenobarbital. *Science* 173 (994) 334-336.
- Deltour L., Foglio M.H., Duester G. 1999a, Impaired ROL utilization in ADH4 alcohol dehydrogenase mutant mice. *Dev.Genet.*25(1)1-10
- Deltour, L., Foglio, M.H., Duester, G. (1999) Metabolic deficiencies in alcohol dehydrogenase *Adh1*, *Adh3*, and *Adh4* null mutant mice. *J. Biol. Chem* **274**, 16796-16801.
- Dickman E, Smith SM. 1996. Selective regulation of cardiomyocyte gene expression and cardiac morphogenesis by retinoic acid. *Dev. Dyn.* 206 39-48.
- Dollé P, Fraulob V, Kastner P, Chambon P. 1994. Developmental expression of murine retinoid X receptor (RXR) genes. *Mech Dev* 45: 91-104.
- Dombret H, Sutton L, Duarte M, Daniel MT, Leblond V, Castaigne S, Degos L. 1992. Combined therapy with all-trans-retinoic acid and high-dose chemotherapy in patients with hyperleukocytic acute promyelocytic leukemia and severe visceral hemorrhage. *Leukemia*. Dec; 6 (12): 1237-42.
- DOWLING JE. Chemistry of visual adaptation in the rat. *Nature*. 1960 Oct 8;188:114-8.
- Duester, G. (2000) Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function. *Eur. J. Biochem.* **267**, 4315-4324.
- Duester G. 2001 Genetic dissection of retinoid dehydrogenases. *Chem-Biol Inter.* 130-132 469-480.
- Duester G., Mic F.A., Molotkov A., 2003 Cytosolic retinoid dehydrogenases govern ubiquitous metabolism of retinol to retinaldehyde followed by tissue-specific metabolism to retinoic acid. *Chem-Biol Inter.* 143-144 201-210.
- Dunn T.J., Koleske A.J., Lindhal R., Pitot H.C. 1989 Phenobarbital-inducible aldehyde dehydrogenase in the rat: cDNA sequence and regulation of the mRNA by Phenobarbital in responsive rats. *J.Biol.Chem.*264 (22)13057-13065.
- Dupé V, Matt N, Garnier J, Chambon P, Mark M, Ghyselinck N. 2003. A newborn lethal defect due to inactivation of retinaldehyde dehydrogenase type 3 is prevented by maternal retinoic acid treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 14036-14041.

During, A., Nagao, A., Terao, J. (1998)  $\beta$ -carotene 15, 15'-dioxygenase activity and cellular retinal-binding protein type II level are enhanced by dietary unsaturated triacylglycerols in rat intestines. *J. Nutr.* **128**, 1614-1619.

Evans R. 2004. A transcriptional basis for physiology. *Nat Med* 10: 1022-1026.

Evans 1987 : ERRATA : chercher en co-autorship à **Giguère et al 1987**.

Fan X., Molotkov A., Manabe S.I., Donmoyer C.M., Deltour L., Foglio M.H., Cuenca A.E., Blaner W.S., Lipton S.A., Duester G. 2003, Targeted disruption of ALDH1A1(RALDH1) provides evidence for a complex mechanism of retinoic acid synthesis in the developing retina. *Mol.Cell.Biol.*23(13)4637-4648.

Fenaux P., Degos L., Treatment of acute promyelocytic leukemia with all trans-RA, *Molecular and Cell Biology Updates/Vitamin A and Retinoids: An Update of Biological Aspects and Clinical Applications*, Ed.M.A.Livrea, Birkhäuser Verlag Berlin 2000,p.231

Formelli F, Barua A, Olson J. 1996. Bioactivities of N-(4-hydroxyphenyl) retinamide and retinoyl beta-glucuronide. *FASEB J* 10: 1014-1024.

Frolik C. 1984. Metabolism of retinoids. In: Sporn MB, Roberts AB, Goodman DS, editors. *The Retinoids*. New York: Academic Press, p 177-208.

Fujii H, Sato T, Kaneko S, Gotoh O, Fujii-Kuriyama Y, Osawa K, Kato S, Hamada H. 1997. Metabolic inactivation of retinoic acid by a novel P450 differentially expressed in developing mouse embryos. *EMB J.* 16 (14) 4163-4173.

Gamble M.V. and W.S. Blaner, 2000, Factors affecting blood levels of vitamin A, *Molecular and Cell Biology Updates/Vitamin A and Retinoids: An Update of Biological Aspects and Clinical Applications*, Ed.M.A.Livrea, Birkhäuser Verlag Berlin 2000, p.1

Gardner W, Towner P, 1995, Invertebrate visual pigments. *Photochem Photobiol* 62:1-16

Gavi S, Stuart LM, Kelly P, Melendez MM, Mynarcik DC, Gelato MC, McNurlan MA. 2007. Retinol-binding protein 4 is associated with insulin resistance and body fat distribution in nonobese subjects without type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007 May; 92 (5): 1886-90. Epub Feb 13.

Geilen C.C, Almond-Roestler B. and Orfanos C.E., Therapeutic uses of retinoids in skin diseases, *Molecular and Cell Biology Updates/Vitamin A and Retinoids: An Update of Biological Aspects and Clinical Applications*, Ed.M.A.Livrea, Birkhäuser Verlag Berlin 2000, p.251

Gestl, S.A., Green, M.D., Shearer, D.A., Frauenhoffer, E., Tephly, T.R., Weisz, J. (2002) Expression of UGT2B7, a UDP-glucuronosyltransferase implicated in the metabolism of 4-hydroxyesterone and all-*trans*-retinoic acid, in normal human breast parenchyma and in invasive and *in situ* breast cancer. *Am. J. Pathol.* **160**, 1467-1479.

Ghyselinck NB, Bavik C, Sapin V, Mark M, Bonnier D, Hindelang C, Dierich A, Nilsson CB, Hankansson H, Sauvart P, Azaïs-Braesco V, Frasson M, Picaud S, Chambon P. 1999. Cellular retinol-binding protein I is essential for vitamin A homeostasis. *EMBO J.* **18**, 4903-4914.

**Giguère V**, Ong ES, Segui P, **Evans RM**. 1987. Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. *Nature* 330 615-617.

Giguère V. 1994. Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins: Complex interplay in retinoid signalling. *Endoc. Rev.* 15 (1) 61-79.

Giguère V. 1999. Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocr. Rev.* 20 (5) 689-725.

Giguère V, Barry JB, 2005 ERRATA: Article à Barry JB, Giguère V, 2005

Glass CK, Rosenfeld MG, Rose DW, Kurokawa R, Kamei Y, Xu L, Torchia J, Ogliastro MH, Westin S. 1997. Mechanisms of transcriptional activation by retinoic acid receptors. *Biochem Soc Trans.* May;25(2):602-5.

Goodyer P, Kurpad A, Rekha S, Muthayya S, Dwarkanath P, Iyengar A, Philip B, Mhaskar A, Benjamin A, Maharaj S, Laforte D, Raju C, Phadke K, Received 2005- Accepted 2006, Effects of maternal vitamin A status on kidney development: a pilot study

Gollapalli DR, Rando RR. 2004. The specific binding of retinoic acid to RPE65 and approaches to the treatment of macular degeneration I. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 10030-10035.

Gorry P, Lufkin T, Dierich A, Rochette-Egly C, Décimo D, Dollé P, Mark M, Durand B, Chambon P. 1994. The cellular retinoic acid binding protein I is dispensable. *PNAS* **91**, 9032-9036.

Gottardis MM, Lamph WW, Shalinski DR, Wellstein A, Heyman RA. 1996. The efficacy of 9-cis retinoic acid in experimental models of cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 38(1)85-96.

Gottesman ME, Quadro L, Blaner WS. 2001. Studies of vitamin A metabolism in mouse model systems. *Bioessays* **23**, 409-419.

Graham C, Brocklehurst K, Pickersgill R, Warren M. 2006. Characterization of retinaldehyde dehydrogenase 3. *Biochem J* 394: 67-75.

Green HM and Green-Balmer J. 2005. Contributions of mathematical modeling to understanding whole-body vitamin A metabolism and to the assessment of vitamin A status, *Sight and Life* 2/2005,p.4

Grün F, Hirose Y, Kawauchi S, Ogura T, Umesono K. 2000. Aldehyde dehydrogenase 6, a cytosolic retinaldehyde dehydrogenase prominently expressed in sensory neuroepithelia during development. *J Biol Chem* 275: 41210-41218.

- Gu X, Xu F, Wang X, Gao X, Zhao Q. 2005. Molecular cloning and expression of a novel CYP26 gene (CYP26D1) during zebrafish early development. *Gene Expr. Patterns* 5 (6) 733-739.
- Gudas L. 1994. Retinoids and vertebrate development. *J Biol Chem* 269: 15399-15402.
- Guidez F. and Zelent A. 2000, Retinoic acid receptors in normal and neoplastic haematopoietic cells, *Molecular and Cell Biology Updates/Vitamin A and Retinoids: An Update of Biological Aspects and Clinical Applications*, Ed.M.A.Livrea, Birkhäuser Verlag Berlin 2000, p.129.
- Han M, Groesbeek M, Smith SO, Sakmar TP. Role of the C9 methyl group in rhodopsin activation: characterization of mutant opsins with the artificial chromophore 11-cis-9-demethylretinal. *Biochemistry*. 1998 Jan 13;37(2):538-45.
- Haselbeck RJ, Ines H, Duester G. 1999. Distinct functions for Aldh1 and RALDH2 in the control of ligand productions for embryonic retinoid signalling pathways. *Dev.Genet.* 25 353-364.
- Head DR, Kopecky KJ, Willman C, Appelbaum FR. Treatment outcome with chemotherapy in acute promyelocytic leukemia: the Southwest Oncology Group (SWOG) experience. *Leukemia*. 1994;8 Suppl 2:S38-41.
- Heyman RA, Mangelsdorf DJ, Dyck JA, Stein RB, Eichele G, Evans RM, Thaller C. 1992. 9-cis retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor. *Cell* 68 397-406.
- Hsu L, Chang W, Hiraoka L, Hsieh C. 1994. Molecular cloning, genomic organization, and chromosomal localization of an additional human aldehyde dehydrogenase gene, ALDH6. *Genomics* 24: 333-341.
- Huachen L, Wagner E, McCaffery P, Smith D, Andreadis A, Drager U. 2000. A retinoic acid synthesizing enzyme in ventral retina and telencephalon of the embryonic mouse. *Mech Dev.* 95:283-289.
- Huang ME, Yu-Chen Y, Shu-Rong C, Lu MX, Zhao L, Gu LJ, Wang ZY. 1988. Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood*. 72 567-572.
- Hsu LC, Chang WC, Yoshida A, 2000, Mouse type-2 retinal dehydrogenase RALDH2: genomic organization, tissue-dependent expression, chromosomes assignment and comparison to other types. *Biochem Biophys Acta*.1492:289-293.
- Kakizuka A, Miller WH, Umesono K, Warell R, Frankel S, Dmitrovsky E, Evans R. 1991. Chromosomal translocation t(15;17) in human acute promyelocytic leukemia fuses RAR alpha with a novel putative transcription factor, PML. *Cell* 66 663-674.
- Kang S, Fisher GJ, Voorhees JJ. 2000. Pharmacology and molecular mechanisms of retinoid action in skin, *Molecular and Cell Biology Updates/Vitamin A and Retinoids: An Update of Biological Aspects and Clinical Applications*, Ed.M.A.Livrea, Birkhäuser Verlag Berlin 2000, p.151

- Kastner P, Grondona J, Mark M, Gansmuller A, LeMeur M, Decimo D, Vonesch J, Dollé P, Chambon P. 1994. Genetic analysis of RXR alpha developmental function: convergence of RXR and RAR signaling pathways in heart and eye morphogenesis. *Cell* 78: 987-1003.
- Kastner P, Krust A, Mendelsohn C, Garnier JM, Zelent A, Leroy P, Staub A, Chambon P. 1989-1990. Murine isoforms of retinoic acid receptor  $\gamma$  with specific patterns of expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87 2700-2704.
- Katagiri Y, Takeda K, Yu ZX, Ferrans VJ, Ozato K, Guroff G. 2000. Modulation of retinoid signalling through NGF-induced nuclear export of NGFI-B. *Nat Cell Biol.* Jul; 2 (7): 435-40.
- Kersten S, Dong D, Lee W, Reczek PR, Noy N. 1998. Auto-silencing by the retinoid X receptor. *J. Mol. Biol.* 284 (1) 21-32.
- Kersten S, Gronemeyer H, Noy N. 1997. The DNA binding pattern of the retinoid X receptor is regulated by ligand-dependent modulation of its oligomeric state. *J. Biol. Chem.* 272 (19) 12771-12777.
- Kersten S, Dong D, Lee W, Reczek PR, Noy N. 1998. Auto-silencing by the retinoid X receptor. *J Mol Biol.* Nov 20; 284 (1): 21-32.
- Kim H, Lapointe J, Kaygusuz G, Ong D, Li C, van de Rijn M, Brooks J, Pollack J. 2005. The retinoic acid synthesis gene ALDH1a2 is a candidate tumor suppressor in prostate cancer. *Cancer Res* 65: 8118-8124.
- Klein ES and Chandraratna RAS. 2000. Therapeutic uses of retinoic acid receptor antagonists and inverse agonists, *Molecular and Cell Biology Updates/Vitamin A and Retinoids: An Update of Biological Aspects and Clinical Applications*, Ed.M.A.Livrea, Birkhäuser Verlag Berlin, p.293
- Kopf E, Plassat J, Vivat V, de Thé H, Chambon P, Rochette-Egly C. 2000. Dimerization with retinoid X receptors and phosphorylation modulate the retinoic acid-induced degradation of retinoic acid receptors alpha and gamma through the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem* 275: 33280-33288.
- Krezel W, Dupé V, Mark M, Dierich A, Kastner P, Chambon P. 1996. RXR gamma null mice are apparently normal and compound RXRalpha<sup>+/-</sup>/RXRbeta<sup>-/-</sup>/RXRgamma<sup>-/-</sup> mutant mice are viable. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 9010-9014.
- Krinsky NI and Mayne ST. 2000. Current views on carotenoids: biology, epidemiology and trials, *Molecular and Cell Biology Updates/Vitamin A and Retinoids: An Update of Biological Aspects and Clinical Applications*, Ed.M.A.Livrea, Birkhäuser Verlag Berlin 2000, p.45.
- Kumbalasisri T, Provencio I. 2005. Melanopsin and other novel mammalian opsins. *Exp Eye Res.*

- Labrecque J, Bhat PV, Lacroix A. 1997. Régulation de la synthèse des acides rétinoïques tout-trans et 9-cis : rôle d'une nouvelle rétinal déshydrogénase. *Médecine/Sciences* 13 345-352
- Labrecque J, Bhat PV, Lacroix A. 1995. A novel isoenzyme of aldehyde dehydrogenase specifically involved in the biosynthesis of 9-cis and all-trans retinoic acid. *Biochem. J.* 305 681-684.
- Labrecque J, Bhat PV, Lacroix A. 1993. Purification and partial characterization of a rat kidney aldehyde dehydrogenase that oxidizes retinal to retinoic acid. *Biochem. Cell Biol.* 71 85-89.
- Lamb AL and Newcomer ME, 1999, The structure of retinal dehydrogenase type 2 at 2.7Å resolution: Implication for retinal specificity. *Biochemistry.* 38:6003-6011.
- Lampen A, Meyer S, Nau H. 2001. Effects of receptor-selective retinoids on CYP26 gene expression and metabolism of all-trans-retinoic acid in intestinal cells. *Drug Metab Dispos* 29: 742-747.
- Lampron C, Rochette-Egly C, Gorry P, Dollé P, Mark M, Lufkin T, LeMeur M, Chambon P. 1995. Mice deficient in cellular retinoic acid binding protein II (CRABPII) or in both CRABPI and CRABPII are essentially normal. *Development* 121, 539-548.
- Lane MA, Bailey SJ. 2005. Role of retinoid signalling in the adult brain. *Prog. Neurobiol.* 75 (4) 275-293.
- Larson RA, Kondo K, Vardiman JW, Butler ARE, Golomb HM, Rowley JD. 1984. Evidence for a 15;17 translocation in every patient with acute promyelocytic leukemia. *Am. J. Med.* 76 827-841.
- Lehmann J, Zhang X, Pfahl M. 1992. RAR gamma 2 expression is regulated through a retinoic acid response element embedded in Sp1 sites. *Mol Cell Biol* 12: 2976-2985.
- Lengfelder E, Saussele S, Weisser A, Büchner T, Hehlmann R. 2005. Treatment concepts of acute promyelocytic leukemia. *Clin. Rev. Onco. Hemato.* 56 261-274.
- Leroy P, Nakshatri H, Chambon P. 1991. Mouse retinoic acid receptor alpha 2 isoform is transcribed from a promoter that contains a retinoic acid response element. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 10138-10142.
- Levin AA, Sturzenbecker LJ, Kazmer S, Bosakowski T, Huselton C, Allenby G, Speck J, Kratzeisen C, Rosenberger M, Lovey A, Grippo JF. 1992. 9-cis retinoic acid stereoisomer binds and activates the nuclear receptor RXRa. *Nature* 355 359-361.
- Li H, Wagner E, McCaffery P, Smith D, Andreadis A, Drager UC, 2000, A retinoic acid synthesizing enzyme in ventral retina and telencephalon of the embryonic mouse. *Mech.Dev.* 95 (1-2) 283-289.
- Lin M, Napoli J. 2000. cDNA cloning and expression of a human aldehyde dehydrogenase

(ALDH) active with 9-cis-retinal and identification of a rat ortholog, ALDH12. *J Biol Chem* 275: 40106-40112.

Lin M, Zhang M, Abraham M, Smith SM, Napoli JL. 2003. Mouse retinal dehydrogenase 4 (RALDH4), molecular cloning, cellular expression, and activity in 9-cis-retinoic acid biosynthesis in intact cells. *J Biol Chem* 278: 9856-9861.

Lin XF, Zhao BX, Chen HZ, Ye XF, Yang CY, Zhou HY, Zhang MQ, Lin SC, Wu Q, RXRalpha acts as a carrier for TR3 nuclear export in a 9-cis retinoic acid-dependent manner in gastric cancer cells. *J Cell Sci.* 2004b Nov 1;117(Pt 23):5609-21. Epub 2004 Oct 19

Liu Q, Linney E. 1993-1994. The mouse retinoid-X receptor-gamma gene: genomic organization and evidence for functional isoforms. *Mol. Endocrinol.* 7 651-658.

Lohnes D, Mark M, Mendelsohn C, Dollé P, Dierich A, Gorry P, Gansmuller A, Chambon P. 1994. Function of retinoic acid receptor (RARs) during development (I) Craniofacial and skeletal abnormalities in double mutants. *Development* 120 2723-2748.

Lotan R, Clifford J.L., Lippman S.M., Retinoids and interferons: combination studies in human cancer, *Molecular and Cell Biology Updates/Vitamin A and Retinoids: An Update of Biological Aspects and Clinical Applications*, Ed.M.A.Livrea, Birkhäuser Verlag Berlin 2000, p.221

Lucas PC, O'Brien RM, Mitchell JA, Davis CM, Imai E, Forman BM, Samuels HH, Granner DK. A retinoic acid response element is part of a pleiotropic domain in the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Mar 15; 88 (6): 2184-8.

MacLean G, Abu-Abed S, Dollé P, Tahayato A, Chambon P, Petkovich M. 2001. Cloning of a novel retinoic-acid metabolising cytochrome P450, CYP26B1, and comparative expression analysis with CYP26A1 during early murine development. *Mech. Dev.* 107 (1-2) 195-201.

Magro C, Crowson NA, Mihm Jr, M (1997) Cutaneous manifestations of nutritional deficiency states and gastrointestinal disease. In: D Elder et al (eds): *Lever's Histopathology of the skin*, 8<sup>th</sup> ed. Lippincott-raven, Philadelphia, 353-354.

Makita T, Hernandez-Hoyos G, Chen T, Wu H, Rothenberg E, Sucov H. 2001. A developmental transition in definitive erythropoiesis: erythropoietin expression is sequentially regulated by retinoic acid receptors and HNF4. *Genes Dev* 15: 889-901.

Mangelsdorf D. 1994. Vitamin A receptors. *Nutr Rev* 52: S32-44.

Mangelsdorf D, Umesono JK, Evans RM. 1994. The retinoid receptors. In: *The retinoids: Biology, Chemistry and Medicine*. MB Sporn, AB Roberts and DS Goodman, éditeurs. Raven Press Ltd, New York, 319-349.

- Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM. 1995. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*. 83 835-839.
- Mangelsdorf DJ, Evans RM. 1995. The RXR heterodimers and orphan receptor. *Cell*. 83 841-850.
- Mangelsdorf D, Borgmeyer U, Heyman R, Zhou J, Ong E, Oro A, Kakizuka A, Evans R. 1992. Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis retinoic acid. *Genes Dev* 6: 329-344.
- Mark M, Ghyselinck NB, Wendling O, Dupé V, Mascrez B, Kastner P, Chambon P. 1999. A genetic dissection of the retinoid signaling pathway in the mouse. *Proc. Nutr. Soc.* 58 609-613.
- Mark M, Ghyselinck N, Chambon P. 2006. Function of retinoid nuclear receptors: lessons from genetic and pharmacological dissections of the retinoic acid signaling pathway during mouse embryogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 46: 451-480.
- Matsui S, Seidou M, Uchiyama I, Sekiya N, Hiraki K, Yoshihara K, Kito Y, 4-1988, Hydroxyretinal, a new visual pigment chromophore found in the bioluminescent squid, *Watasenia scintillans*. *Biochim Biophys Acta* 1988 Sep 8;966(3):370-4.
- McCaffery P., Posch K.C., Napoli J.L., Gudas L., Dräger U.C. 1993 Changing patterns of the retinoic acid system in the developing retina. *Dev. Biol.* 158 390-399.
- McCaffery P, May J, Dragger UC. 1996. Light-mediated retinoic acid production. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 12570-12574.
- McCollum EV, Davis M. 1913. The necessity of certain lipids in the diet during growth. *J. Biol. Chem.* 15 167-175.
- McLaren DS, Frigg M. 2002. Manuel sight and life sur les troubles dus à la carence en vitamine A
- McSorley LC, Daly AK. 2000. Identification of human cytochrome P450 isoforms that contribute to all-trans retinoic acid 4-hydroxylation. *Biochem. Pharmacol.* 60 517-526.
- Melnick A, Licht JD. 1999. Deconstructing a disease: RARα, its fusion partners and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 93 (10) 3167-3215.
- Mic F, Molotkov A, Fan X, Cuenca A, Duester G. 2000. RALDH3, a retinaldehyde dehydrogenase that generates retinoic acid, is expressed in the ventral retina, otic vesicle and olfactory pit during mouse development. *Mech Dev* 97: 227-230.
- Mic F, Haselbeck R, Cuenca A, Duester G. 2002. Novel retinoic acid generating activities in the neural tube and heart identified by conditional rescue of Raldh2 null mutant mice. *Development* 129: 2271-2282.

Mic FA, Haselbeck RJ, Cuenca AE, Duester G, 2002, Novel retinoic acid generating activities in the neural tube and heart identified by conditional rescue of RALDH2 null mutant mice. *Development* 129 2271-2282.

Michèle Houde Nadeau, Cours NUT 5050, Département de Nutrition, Faculté de Médecine, Université de Montréal 2005

Million K, Tournier F, Houcine O, Ancian P, Reichert U, Marano F. 2001. Effects of retinoic acid receptor-selective agonists on human nasal epithelial cell differentiation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 25: 744-750.

Mira-y-Lopez R, Zheng WL, Kuppumbatti YS, Rexer B, Jing Y, Ong DE. 2000. Retinol conversion to retinoic acid is impaired in breast cancer cell lines relative to normal cells. *J. Cell Physiol.* 185 302-309.

Moiseyev G, Chen Y, Takahashi Y, Wu BX, Ma JX. 2005. RPE65 is the isomerohydrolase in the retinoid visual cycle. *Proc Natl Acad Sci USA*.

Molotkov A., Deltour L., Foglio M.H., Cuenca A.E., Duester G. 2002a Distinct retinoid metabolic functions for alcohol dehydrogenase genes ADH1 and ADH4 in protection against vitamin A toxicity or deficiency revealed in double null mutant mice. *J.Biol.Chem.*277(16)13804-13811.

Molotkov A., Duester G., 2003 Genetic evidence that retinaldehyde dehydrogenase RALDH1 functions downstream of alcohol dehydrogenase adh1 in metabolism of ROL to RA. *J.Biol.Chem.* 278(38) 36085-36090.

Molotkov A., Fan X., Deltour L., Foglio M.H., Martrsa S., Farrés J., Parés X., Duester G. 2002b Stimulation of retinoic acid production and growth by ubiquitously expressed alcohol dehydrogenase ADH3. *Proc. Natl Acad.Sci. USA* 99(8) 5337-5342.

Morriss-Kay G, Sokolova N. 1996. Embryonic development and pattern formation. *FASEB J* 10: 961-968.

Nagata T, Kanno Y, Ozato K, Taketo M. 1994. The mouse RXR $\beta$  gene encoding RXR $\beta$ : genomic organization and two mRNA isoforms generated by alternative splicing of transcripts initiated from CpG island promoters. *Gene* 142 183-189.

Nagpal S, Chandraratna RA. 2000. Recent developments in receptor-selective retinoids. *Curr Pharm Des.* Jun; 6 (9): 919-31.

Napoli J.L. 2000. Enzymology and biogenesis of retinoic acid, *Biology Updates/Vitamin A and Retinoids: An Update of Biological Aspects and Clinical Applications*, Ed. M.A. Livrea, Birkhäuser Verlag Berlin, p.17

Napoli JL.1996. Biochemical pathways of retinoid transport, metabolism, and signal transduction. *Clin. Immuno. Immunopatho.* **80**, s52-s62.

- Nelson DR. 1999. A second CYP26 P450 in humans and zebrafish: CYP26B1. *Arch. Biochem. Biophys.* 371 (2) 345-347.
- Nezzar H, Chiambaretta F, Marceau G, Blanchon L, Faye B, Dechelotte P, Rigal D, Sapin V. 2007. Molecular and metabolic retinoid pathways in the human ocular surface. *Mol Vis* 13: 1641-1650.
- Niederreither, K., Subbarayan, V., Dollé, P., Chambon, P. (1999) Embryonic retinoic acid synthesis is essential for early mouse post-implantation development. *Nature Genet.* **21**, 444-448.
- Niederreither K, McCaffery P, Drager UC, Chambon P, Dollé P, 1997 Restricted expression and retinoic acid –induced down regulation of the retinaldehyde dehydrogenase type 2 RALDH2 gene during mouse development. *Mech.Dev.* 62:67-68.
- Niederreither K, Abu-Abed S, Schuhbaur B, Petkovich M, Chambon P, dollé P, 2002, Genetic evidence that oxidative derivatives of retinoic acid are not involved in retinoid signalling during mouse development. *Nature genetics* 31 84-88.
- Niederreither K, Fraulob V, Garnier JM, Chambon P, Dollé P, 2002b Differential expression of retinoic acid-synthesizing (RALDH) enzymes during fetal development and differentiation in the mouse. *Mech.Dev.* 110 165-171.
- Niederreither K, Fraulob V, Vermot J, Chambon P, Dollé P, 2002c, Retinaldehyde dehydrogenase 2 RALDH2-independent patterns of retinoic acid synthesis in the mouse embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99(25) 16111-16116.
- Niederreither K, McCaffery P, Drager UC, Chambon P, Dollé P, 1997, Restricted expression and retinoic acid-induced down regulation of the retinaldehyde dehydrogenase type 2 RALDH2 gene during mouse development *Mech.Dev.* 62(1)67-78.
- Niles RM. 2004. Signaling pathways in retinoid chemoprevention and treatment of cancer. *Mutat Res* 555: 81-96.
- Noji S, Yamaai T, Koyama E, Nohno T, Taniguichi S. 1989. Spatial and temporal expression pattern of retinoic acid receptor genes during mouse bone development. *FEBS Lett.* 257 93-96.
- Osmond MK, Butler AJ, Voon FCT, Bellairs R. 1991. The effects of retinoic acid on heart formation in the early chick embryo. *Development* 113 1405-1417.
- Quadro, L., Blaner, W.S., Salchow, D.J., Vogel, S., Piantedosi, R., Gouras, P., Freeman, S., Cosma, M.P., Colantuoni, V. Gottesman, M.E. (1999) Impaired retinal function and vitamin A availability in mice lacking retinol-binding protein. *EMBO J.* **18**, 4633-4644.
- Ochoa WF, Torrecillas A, Fita I, Verdaguer N, Corbalán-García S, Gomez-Fernandez JC. 2003. Retinoic acid binds to the C2-domain of protein kinase C (alpha). *Biochemistry.* Jul 29; 42 (29): 8774-9.

- Olson J.A. 2000, Requirements and safety of Vitamin a in humans, *Molecular and Cell Biology Updates/Vitamin A and Retinoids: An Update of Biological Aspects and Clinical Applications*, Ed.M.A.Livrea, Birkhäuser Verlag Berlin 2000, p.29.
- Ong, D.E., Newcomer, M.E., Chytil, F. (1994) Cellular retinoid-binding proteins. In: *The retinoids, Biology, Chemistry and Medicine*. Sporn, Robert, Goodman eds, 2<sup>nd</sup> edition, NY, Raven Press, pp. 283-312.
- Opperman U.C.T., Filling C., Jörnvall H. 2001, Forms and functions of human SDR enzymes. *Chem-Biol. Inter.* 130-132 699-705.
- Opperman U., Filling C., Hult M., Shafqat N., Wu X., Lindh M., Shafqat J., Nordling E., Kalberg Y., Persson B., Jörnvall H., 2003 Short-chain dehydrogenases-reductases (SDR): the 2002 update. *Chem.-Biol.Inter.* 143-144 247-253.
- Paik J., Vogel S., Piantedosi R., Sykes A., Blaner W.S., Swisshelm K. 2000 9-cis-retinoids: biosynthesis of 9-cis-retinoic acid. *Biochemistry* 39 (27) 8073-8084.
- Palha JA, Goodman AB. 2005. Thyroid hormones and retinoids: A possible link between genes and environment in schizophrenia. *Brain Res. Rev. Epub*.
- Parisotto M, Brodeur H, Bhat P, Mader S. 2008. [Retinoid metabolism and cancer]. *Med Sci (Paris)* 22: 1101-1106. ERRATA: lire **2006** au lieu de 2008
- Perlmann T. 2002. Retinoid metabolism: a balancing act. *Nat. Genet.* 31: 7-9.
- Petkovich M, Brand NJ, Krust A, Chambon P. 1987.A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. *Nature* 330 444-450.
- Prüfer K, Barsony J. Retinoid X receptor dominates the nuclear import and export of the unliganded vitamin D receptor. *Mol Endocrinol.* 2002 Aug;16(8):1738-51.
- Radu RA, Mata NL, Bagla A, Travis GH. 2004. Light exposure stimulates formation of A2E oxiranes in a mouse model of Stagardt' s macular degeneration I. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 5928-5933.
- Rastinejad F, Wagner T, Zhao Q, Khorasanizadeh S. 2000. Structure of the RXR-RAR DNA-binding complex on retinoic acid response element DR1. *EMBO J.* 19 (5) 1045-1054.
- Rastinejad F. Retinoid X receptor and its partners in the nuclear receptor family. *Curr Opin Struct Biol.* 2001 Feb;11(1):33-8
- Ray W, Bain G, Yao M, Gottlieb D. 1997. CYP26, a novel mammalian cytochrome P450, is induced by retinoic acid and defines a new family. *J Biol Chem* 272: 18702-18708.
- Reijntjes S, Gale E, Maden M. 2004. Generating gradients of retinoic acid in the chick embryo: Cyp26C1 expression and a comparative analysis of the Cyp26 enzymes. *Dev Dyn* 230: 509-517.

- Reijntjes S, Blentic A, Gale E, Maden M. 2005. The control of morphogen signalling: regulation of the synthesis and catabolism of retinoic acid in the developing embryo. *Dev Biol* 285: 224-237.
- Rexer B, Zheng W, Ong D. 2001. Retinoic acid biosynthesis by normal human breast epithelium is via aldehyde dehydrogenase 6, absent in MCF-7 cells. *Cancer Res* 61: 7065-7070.
- Romand R, Albuissou E, Niederreither K, Fraulob V, Chambon P, Dollé P. 2001. Specific expression of retinoic acid synthesizing enzyme RALDH2 during mouse inner ear development. *Mech. Devel.* 106 185-189.
- Rongnoparut P., Weaver S. 1991 Isolation and characterization of a cytosolic aldehyde dehydrogenase encoding cDNA from mouse liver. *Gene* 101 (2) 261-265.
- Ross A.C. Vitamin A, retinoids and immune responses, *Molecular and Cell Biology Updates/Vitamin A and Retinoids: An Update of Biological Aspects and Clinical Applications*, Ed.M.A. Livrea, Birkhäuser Verlag Berlin 2000, p.83
- Ross SA, McCaffery PJ, Drager UC, DeLuca LM. 2000. Retinoids in embryonal development. *Physiol. Rev.* **80**, 1021-1054.
- Rowe A. 1997. Retinoid X receptors. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 29 275-278.
- Saari JC, Nawrot M, Kennedy BN, Garwin GG, Hurley JB, Huang J, Possin DE et al. 2001. Visual cycle impairment in cellular retinaldehyde binding protein (CRALBP) knockout mice results in delayed dark adaptation. *Neuron* 29: 739-748.
- Sakai Y, Meno C, Fuji H, Nishino J, Shiratori H, Saijoh Y, Rossant J, Hamada H. 2001. The retinoic acid inactivating enzyme CYP26 is essential for establishing an uneven distribution of retinoic acid along the antero-posterior axis within the mouse embryo. *Genes Dev.* 15 (2) 213-225.
- Scott DK, Mitchell JA, Granner DK. 1996. Identification and characterization of the second retinoic acid response element in the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene promoter. *J Biol Chem.* Mar 15; 271 (11): 6260-4.
- Semba RD. 2000. Vitamin A and infectious diseases, *Molecular and Cell Biology Updates/Vitamin A and Retinoids: An Update of Biological Aspects and Clinical Applications*, Ed.M.A.Livrea, Birkhäuser Verlag Berlin, p.97
- Shaffer PL, Gewirth DT. 2004. Structural analysis of RXR-VDR interactions on DR3 DNA. *J Steroid Biochem Mol Biol.* May; 89-90 (1-5): 215-9.
- Shimazaki Y, Eguchi E, (1995) Light-dependent metabolic pathway of 3-hydroretinoids in the eye of a butterfly *Papilio Xuthus*. *J Comp Physiol* 176:661-671
- Shulman AI, Mangelsdorf DJ. 2005. Retinoid X receptor heterodimers in the metabolic syndrome. *N. Engl. J. Med.* 353 604-615.

- Shulman AI, Larson C, Mangelsdorf DJ, Ranganathan R. 2004. Structural determinants of allosteric ligand activation in RXR heterodimers. *Cell*. Feb 6; 116 (3): 417-29. Comment in: *Cell*. 2004 Feb 6; 116(3): 354-6.
- Silha JV, Nyomba BL, Leslie WD, Murphy LJ, Ethnicity, insulin resistance, and inflammatory adipokines in women at high and low risk for vascular disease. *Diabetes care* 2007 Feb;30(2):286-91.
- Sonoda J, Liming P, Ronald M.E, 2007 Nuclear receptors: Decoding metabolic disease, *FEBS Lett*. 2007, doi:10.1016/j.febslet.2007.00.016
- Sophos MB, Vasiliou V. 2003. Aldehyde dehydrogenase gene superfamily : the 2002 update. *Chemico-Biological Interactions* 143-144 5-22.
- Soprano D, Qin P, Soprano K. 2004. Retinoic acid receptors and cancers. *Annu Rev Nutr* 24: 201-221.
- Spiegelman BM. 1998. PPAR $\gamma$  adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes*. 47 507-514.
- Sporn MB, Roberts AB, Goodman DS. Ed: *The retinoids, Biology, Chemistry and Medicine*. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Raven Press Ltd, 1994.
- Staels B. 2001. Regulation of lipid and lipoprotein metabolism by retinoids. *J. Am. Acad. Dermatol*. 45 S158-S167.
- Steigner HH, Arntsen BM, Spydevold Oystein S, Sorensen HN. 1997-1998. Gene transcription of the retinoid X receptor  $\alpha$  (RXR $\alpha$ ) is regulated by fatty acids and hormones in rat hepatic cell. *J Lipid Res*. 39 744-754.
- Stephenson CB. 2001 Vitamin A, infection and immune function. *Ann. Rev. Nutr*. 21 167-192.
- Suharno D, West C, Muhilal, Karyadi D, Hautvast J. 1993. Supplementation with vitamin A and iron for nutritional anaemia in pregnant women in West Java, Indonesia. *Lancet* 342: 1325-1328.
- Swindell EC, Thaller C, Sockanathan S, Petkovich M, Jessell TM, Eichele G. 1997. Complementary domains of retinoic acid production and degradation in the early chick embryo. *Dev Biol*. 1999 Dec 1;216(1):282-96.
- Szanto A, Narkar V, Shen Q, Uray IP, Davies PJ, Nagy L. 2004. Retinoid X receptors: Exploring their (patho) physiological functions. *Cell Death Differ*. Dec; 11 Suppl 2:S126-43
- Tahayato A, Dollé P, Petkovich M. 2003. CYP26C1 encodes a novel retinoic acid-metabolizing enzyme expressed in the hindbrain, inner ear, first branchial arch and tooth buds during murine development. *Gene Expr. Patterns* 3 (4) 449-454.

- Taimi M, Helvig C, Wisniewski J, Ramshaw H, White J, Amad M, Korczak B, Petkovich M. 2004. A novel human cytochrome P450, CYP26C1, involved in metabolism of 9-cis and all-trans isomers of retinoic acid. *J Biol Chem* 279: 77-85.
- Tallman MS, Wiernik PH. Retinoids in cancer treatment. *J Clin Pharmacol.* 1992 Oct;32(10):868-88.
- Thielitz A, Abdel-Naser M, Fluhr J, Zouboulis C, Gollnick H. 2008. Topical retinoids in acne--an evidence-based overview. *J Dtsch Dermatol Ges* 6: 1023-1031.
- Thomas W, Archimbaud E, Treille-Ritouet D, Fiere D, (1991) Prognostic factors in acute promyelocytic leukemia: a retrospective study of 67 cases. *Leuk Lymphoma* 4:249-256.
- Thompson JN, Howell JM, Pitt GA. 1964. Vitamin A and reproduction in rats *Proc. Royal Soc.* 159 510-535.
- Toma S, Raffo P, Isnardi L. 2000. Effects of all-trans RA and 13 cis-RA on breast cancer cell lines, *Molecular and Cell Biology Updates/Vitamin A and Retinoids: An Update of Biological Aspects and Clinical Applications*, Ed.M.A.Livrea, Birkhäuser Verlag Berlin, p.209
- Tsai SY, Tsai MJ. 1997. Chick ovalbumin upstream promoter-transcription factors (COUP-TFs): Coming of age. *Endocrine reviews.* 18 229-240.
- Umesono K, Murakami KK, Thompson CC, Evans RM. 1991. Direct repeats as selective response elements for thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors. *Cell* 65 1255-1266.
- Vasiliou V, Pappa A, Petersen DR. 2000. Role of aldehyde dehydrogenase in endogenous and xenobiotic metabolism. *Chem. Biol. Interact.* 129 1-19.
- Veech RL, Egglestone LV, Krebs HA. 1969. The redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate in the cytoplasm of rat liver. *Biochem. J.* 115 (4) 609-619.
- Vermot J, Llamas JG, Fraulob V, Nederreither K, Chmabon P, Dollé P. 2005-2006. Retinoic acid controls the bilateral symmetry of somite formation in the mouse embryo. *Science* 308 563-566.
- Vogt K (1983) Is the visual pigment a rhodopsin? *Z Naturforsch Sect C Bioscience* 38:329-333
- Wald G, Steven D. 1939. An Experiment in Human Vitamin A-Deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jul; 25 (7): 344-9
- Wang XD, Krinsky NI, Benotti PN, Russell RM. 1994. Biosynthesis of 9-cis-retinoic acid from 9-cis- $\beta$ -carotene in human intestinal mucosa in vitro. *Arch. Biochem. Biophys.* 313(1) 150-155.

- Wang XS, Penzes P, Napoli JL, 1996, Cloning of cDNA encoding an aldehyde dehydrogenase and its expression in Escherichia coli-recognition of retinal substrate. *J. Biol. Chem.* 271: 16288-16293.
- Wang Y, Zolfaghari R, Ross CA. 2002. Cloning of rat cytochrome P450RAI (CYP26) cDNA and regulation of its gene expression by all-trans-retinoic acid in vivo. *Arch. Biochem. Biophys.* 401 (2) 235-243.
- Wei S, Episkopou V, Piantedosi R, Maeda S, Shimada K, Gottesman ME, Blaner WS. 1995. Studies on the metabolism of retinol and retinol-binding protein in transthyretin-deficient mice produced by homologous recombination. *J. Biol. Chem.* 270, 866-870.
- Weng W, Li L, van Bennekum AM, Potte SH, Harrison EH, Blaner WS, Breslow JL, Fisher EA. 1999. Intestinal absorption of dietary cholesteryl ester is decreased but retinyl ester absorption is normal in carboxyl ester lipase knockout mice. *Biochemistry* 38, 4143-4149.
- White, JA, Beckett-Jones B, Guo YD, Dilworth FJ, Bonasoro J, Jones G, Petkovich M. 1997. cDNA cloning of human retinoic acid-metabolizing enzyme (hP450RAI) identifies a novel family of cytochrome P450 (CYP26). *J. Biol. Chem.* 272 (30) 18538-18541.
- White JA, Beckett B, Scherer SW, Herbick JA, Petkovich M. 1998. P450RAI (CYP26) maps to human chromosome 10q23-q24 and mouse chromosome 19c2-3. *Genomics* 48 (2) 270-272.
- White JA, Guo YD, Baetz K, Beckett-Jones B, Bonasoro J, Hsu KE, Dilworth FJ, Jones G, Petkovich M. 1996. Identification of the retinoic acid-inducible all-*trans*-retinoic acid 4-hydroxylase. *J. Biol. Chem.* 271, 29922-29927.
- White J, Ramshaw H, Taimi M, Stangle W, Zhang A, Everingham S, Creighton S, Tam S, Jones G, Petkovich M. 2000. Identification of the human cytochrome P450, P450RAI-2, which is predominantly expressed in the adult cerebellum and is responsible for all-trans-retinoic acid metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 6403-6408.
- Wolf G. 2001 The discovery of the visual function of vitamin A. *J. Nutr.* 131 1647-1650.
- Wongsiriroj N, Blaner WS. 2007. Recent advances in vitamin A absorption and transport *Sight and Life* 3/2007, p.32
- Wouters W, van Dun J, Dillen A, Coene M, Cools W, De Coster R. 1992. Effects of liarozole, a new antitumoral compound, on retinoic acid-induced inhibition of cell growth and on retinoic acid metabolism in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Res* 52: 2841-2846.
- Yamamoto Y, Zolfaghari R, Ross AC. 2000. Regulation of CYP26 (cytochrome P450RAI) mRNA expression and retinoic acid metabolism by retinoids and dietary vitamin A in liver of mice and rats. *FASEB J.* 14 2119-2127.

- Yamamoto H, Simon A, Eriksson U, Harris E, Berson EL, Dryja TP. 1999. Mutations in the gene encoding 11-cis retinol dehydrogenase cause delayed dark adaptation and fundus albipunctatus. *Nat Genet* 22: 188-191.
- Yoshida A, Rzhetsky A, Hsu LC, Chang C. 1998. Human aldehyde dehydrogenase gene family. *Eur.J. Biochem.* 251 549-557.
- Zelent A, Krust A, Petkovich M, Kastner P, Chambon P. 1989. Cloning of murine  $\alpha$  and  $\beta$  retinoic acid receptors and a novel receptor  $\gamma$  predominantly expressed in skin. *Nature* 339 714-717.
- Zelent A, Mendelsohn C, Kastner P, Garnier JM, Ruffenach F, Leroy P, Chambon P. 1991. Differentially expressed isoforms of the mouse retinoic acid receptor  $\beta$  are generated by usage of two promoters and alternative splicing. *EMBO J.* 10 71-81.
- Zhang Q, Raner G, Ding X, Dunbar D, Coon M, Kaminsky L. 1998. Characterization of the cytochrome P450 CYP2J4: expression in rat small intestine and role in retinoic acid biotransformation from retinal. *Arch Biochem Biophys* 353: 257-264.
- Zhao D, McCaffery P, Ivins KJ, Neve RL, Hogan P, Chin WW, Drager UC. 1996. Molecular identification of a major retinoic acid synthesizing enzyme, a retinaldehyde-specific dehydrogenase. *eur J Biochem.* 240:15-22.
- Zhuang R, Lin M, Napoli JL, cis-Retinol/androgen dehydrogenase, isozyme 3 (CRAD3): a short-chain dehydrogenase active in a reconstituted path of 9-cis-retinoic acid biosynthesis in intact cells. *Biochemistry* 2001-2002 Mar 12;41(10):3477-83
- Zile M.H. 1998. Vitamin A and embryonic development: an overview. *J. Nutr.* 128 455S-458S.
- Ziouzenkova O, Plutzky J. 2007. Retinoid metabolism and nuclear receptor responses: New insights into coordinated regulation of the PPAR-RXR complex. *FEBS Lett.* 2008 Jan 9; 582 (1): 32-8. Epub Dec 7.