HAL
open science

Etude des effets des radionucléides (uranium et césium 137) sur le métabolisme de la vitamine D chez le rat

Emilie Tissandie

To cite this version:

Emilie Tissandie. Etude des effets des radionucléides (uranium et césium 137) sur le métabolisme de la vitamine D chez le rat. Génétique. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II; Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, 2007. Français. NNT : 2007CLF21783 . tel-00718348

HAL Id: tel-00718348

https://theses.hal.science/tel-00718348v1

Submitted on 16 Jul 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Blaise Pascal | Institut de Radioprotection et de Sureté Nucléaire | Université d'Auvergne

N°D.U. | Année 2007

ECOLE DOCTORALE
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE
N°d'ordre

THESE

Pour obtenir le grade de

Docteur d'université

Spécialité Physiologie et Génétique
(Radiotoxicologie)

Présentée par

Emilie TISSANDIE

Soutenue le 8 Novembre 2007

ETUDE DES EFFETS DES RADIONUCLEIDES (URANIUM ET CESIUM 137) SUR LE METABOLISME DE LA VITAMINE D CHEZ LE RAT

Devant le jury composé de :

Pr. Laurent MOREL, Université Clermont-Ferrand II	Président
Dr. Michèle GARABEDIAN, INSERM U561, Paris	Rapporteur
Dr. Patrick MAUREL, INSERM U632, Montpellier	Rapporteur
Pr. Jean-Marc A. LOBACCARO, Université Clermont-Ferrand II	Examinateur
Dr. Maâmar SOUIDI, IRSN, directeur de thèse	Examinateur

L'uranium et le césium 137 (^{137}Cs) sont des radionucléides qui se retrouvent dans l'environnement du fait de leur présence naturelle et/ou accidentelle. Par conséquent, certaines populations humaines peuvent être exposées à ces radioéléments principalement par ingestion chronique. La toxicité chimique et/ou radiologique de l'uranium et du ^{137}Cs a été démontrée au niveau du foie, du rein et du cerveau qui sont les organes clés du métabolisme de la vitamine D. De plus, des modifications de l'homéostasie osseuse et phosphocalcique ont été rapportées suite à une contamination aiguë ou chronique à l'uranium ou au ^{137}Cs. Cependant les effets de ces deux radionucléides sur le métabolisme de la vitamine D, hormone essentielle au maintien minéral de l'organisme, ne sont pas connus. Les objectifs de ce travail étaient d'évaluer *in vivo* les effets de l'uranium appauvri (UA) ou enrichi (UE) et du ^{137}Cs sur le métabolisme de la vitamine D au niveau du foie, du rein et du système nerveux central. Un modèle animal expérimental, a été utilisé pour la première fois pour montrer qu'une exposition chronique à de faibles doses d'UA ou de ^{137}Cs diminue le taux de vitamine D active ($1,25(OH)_2D_3$) et entraine des modifications moléculaires des enzymes de types cytochromes P450 (CYPs) impliqués dans ce métabolisme et des récepteurs nucléaires associés. Nous avons démontré qu'une contamination à l'UA et à l'UE affectent de la même manière l'expression de VDR (*vitamin D receptor*) et de RXRα (*retinoic X receptor alpha*) et par conséquent peuvent moduler l'expression des gènes cibles de la vitamine D impliqués dans le transport du calcium au niveau rénal. Ces résultats suggèrent que ces effets sont dus à la toxicité chimique de l'uranium. A l'inverse, les principales cibles moléculaires du ^{137}Cs sont les CYPs qui sont impliquées dans la biosynthèse de la vitamine D (CYP2R1, CYP27B1) au niveau du foie et du système nerveux central. Chez ce modèle adulte, ces perturbations ne sont pas associées à un dérèglement de l'homéostasie minérale. En revanche l'exposition chronique au ^{137}Cs durant la période de développement post-natal affecte non seulement le métabolisme de la vitamine D mais également l'homéostasie osseuse et phosphocalcique. Ces résultats suggèrent une susceptibilité accrue des enfants face à la contamination au ^{137}Cs, par rapport aux adultes.

Mots clefs : vitamine D, uranium, césium 137, cytochromes P450, VDR, contamination chronique

Uranium and Cesium 137 (^{137}Cs) are both radionuclides found in the environment as a result of their accidental dispersion and/or natural presence. Consequently, some human populations are exposed to these radioelements mainly through chronic ingestion. Chemical and/or radiological toxicity of uranium and ^{137}Cs has been reported in kidney, liver and brain that play key-roles in vitamin D metabolism. Beside, alterations of both bone and phospho-calcium homeostasis have been reported after an acute or chronic contamination with uranium or ^{137}Cs. However, vitamin D, the major regulator of mineral homeostasis has never been studied up to now. The aim of this work was to investigate *in vivo* the effects of depleted (DU) or enriched uranium (EU) and of ^{137}Cs on vitamin D_3 biosynthetic pathway in liver, kidney and brain. An experimental animal model was used for the first time to demonstrate that chronic exposure with environmental doses of ^{137}Cs and uranium could decrease the vitamin D active form level ($1,25(OH)_2D_3$) and lead to molecular modifications of cytochromes P450 (CYPs) enzymes involved in this metabolism and associated nuclear receptors. We demonstrated that both UA and UE contamination affected VDR (vitamin D receptor) and RXRα (retinoid X receptor alpha) expression, and consequently could modulate the expression of vitamin D target genes involved in calcium homeostasis in kidney. These results suggest that these effects could be due to the chemical toxicity of uranium. On the contrary, the main molecular targets of ^{137}Cs are CYPs involved in Vitamin D_3 biosynthesis (CYP2R1, CYP27B1) in liver and brain. In this adult rat model such perturbations were not associated with a dysregulation of mineral homeostasis. Conversely, chronic exposure with ^{137}Cs during postnatal development induce alterations of vitamin D metabolism associated with modifications of bone and phospho-calcium homeostasis, suggesting a greater susceptibility of the growing organism to ^{137}Cs contamination compared to adult.

Key words : vitamin D, uranium, cesium 137, cytochromes P450, VDR, chronic contamination

Remerciements

Je remercie sincèrement chacun des membres du jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse :

- Le Professeur Laurent Morel en tant président du jury,
- Les Docteurs Michèle Garabédian et Patrick Maurel en tant que rapporteurs.

Je tiens à remercier tout particulièrement le Docteur Maâmar Souidi de m'avoir choisie pour réaliser cette thèse et de m'avoir guidée tout au long de ce travail. Je le remercie pour son attention permanente, son optimisme et son enthousiasme contagieux qui m'ont permis de réaliser cette thèse dans les meilleures conditions.

Je souhaiterais exprimer toute ma gratitude au Professeur Jean-Marc Lobaccaro pour son soutien et son aide précieuse.

Je remercie les Docteurs Patrick Gourmelon, Jocelyne Aigueperse et Philippe Voisin de m'avoir accueillie au sein du Service de Radiobiologie, ainsi que le Docteur François Paquet pour son accueil au sein du LRTOX.

Je remercie le Docteur Yann Guéguen pour son soutien constant et ses précieux conseils tout au long de ces trois années de thèse.

J'adresse un grand merci à Line Grandcolas et Hanaâ Berradi pour leur aide technique et scientifique, pour leur bonne humeur quotidienne et pour les très nombreuses pauses café passées en leur compagnie.

Je tiens également à remercier l'ensemble du LRTOX et des laboratoires voisins, en particulier Stéphane Grison, Isabelle Dublineau, Philippe Lestaevel, Jean-Marc Bertho, Christine Linard, Cédric Baudelin, Johanna Stefani et Patrick Laloi, qui m'ont chaleureusement accueillie dans leur laboratoire. Je les remercie pour leur aide et leur gentillesse.

Je remercie Radjini Racine, Hélène Ben Soussan, Caroline Rouas, Naya Sylla, Elyse Grignard, Olivier Grémy, Moubarak Mouiseddine et Frédéric Pouzoulet pour leur aide et leur soutien et pour tous les bons moments passés en leur compagnie ainsi que Nathalie Printemps, Farida Mihoubi et Sonia Louiba avec qui j'ai eu le plaisir de partager le bureau.

Je tiens à remercier Sandrine Quernee et Keltoum Mediana pour leur aide administrative et leur sympathie.

Enfin, je souhaite remercier toute ma famille et mes amis pour leur soutien et leurs encouragements.

Abréviations

^{137}Cs : césium 137
1,24,25(OH)$_3$D$_3$: 1,25-trihydroxyvitamine D$_3$
1,25(OH)$_2$D$_3$: 1,25-dihydroxyvitamine D$_3$
24,25(OH)$_2$D$_3$: 24,25-dihydroxyvitamine D$_3$
25(OH)D$_3$: 25-hydroxyvitamine D$_3$
ALAT : alanine amino transférase
ASAT : aspartate amino transférase
CaBPs : *calbindins*
CK-II : caséine kinase II
CAR : *constitutive androstane receptor*
CTx : télopeptide C-terminal du collagène de type-I
CYPs : cytochromes P450
DBP : *vitamin D binding protein*
DRIP : *vitamin D receptor interacting proteins*
ECaCs : *epithelial ca^{2+} channels*
FGF23 : *fibroblast growth factor 23*
GDNF : *Glial cell line-derived neurotrophic factor*
HNF : *hepatocyte nuclear factor*
HVDRR : *hereditary vitamin D resistant rickets*
IDBP : *intracellular vitamin D binding protein*
IGF-I : *insulin-like growth factor -I*
LXR : *liver X receptor*
MAP Kinases : *Mitogen-Activated Protein Kinases*
NCoA-62 : *Nuclear coactivator-62*
N-CoR : Nuclear receptor co-repressor
NCX1 : *Na^{+}/Ca^{2+} exchanger 1*
NGF : *nerve growth factor*
NT3 : neurotrophine
PDDR : *pseudovitamin D deficieny rickets*
PHEX : *phosphate regulating gene with homologies to endopeptidases on the X chromosome*
PKA/PKC : *protein kinase A/C*
PMCA1b : *Ca^{2+} - ATPase 1b*
PPAR : *peroxisome proliferator activated receptor*
PTH : hormone parathyroïdienne
PXR : *pregnane X receptor*
RAR : *retinoid acid receptor*
RXR : *retinoic X receptor*
SHP : *small heterodimeric partner*
SRC-1 : *steroid receptor co-activator 1*
UA : uranium appauvri
UE : uranium enrichi
UN : uranium naturel
VDR : *vitamin D receptor*
VDRE : *vitamin D response element*

Sommaire

Avant-propos - 5

Introduction - 10

I. Radionucléides - 11

A. Les radionucléides dans l'environnement - 11

B. L'uranium - 13

1) Propriétés et utilisations - 13

2) Sources d'exposition à l'uranium - 14

3) Biocinétique - 15

(a) Absorption - 15

(b) Distribution et rétention - 15

(c) Excrétion et élimination - 16

4) Toxicité de l'uranium - 16

(a) Toxicité après exposition aiguë - 16

(b) Toxicité après exposition chronique - 21

C. Le césium 137 - 23

1) Propriétés et utilisations - 23

2) Sources d'exposition au césium 137 - 24

3) Biocinétique - 25

(a) Absorption - 25

(b) Distribution et rétention - 26

(c) Excrétion et élimination - 26

4) Toxicité du césium 137 - 27

(a) Toxicité après exposition aiguë - 27

(b) Toxicité après exposition chronique - 29

II. Le métabolisme de la vitamine D - 31

A. Métabolisme : sources et cytochromes P450 impliqués - 31

1) Sources - 32

2) La 25-hydroxylation hépatique - 32

3) Formation de vitamine D active rénale et extra-rénale - 33

4) Catabolisme - 33

B. Régulation du niveau de la vitamine D - 34

1) Régulation hormonale et ionique - 34

2) Régulation par les récepteurs nucléaires - 35

3) Régulation par d'autres facteurs - 36

C. Transport de la vitamine D - 37

D. Rôles physiologiques de la vitamine D - 37

1) Mode d'action - 38

(a) Mécanisme d'action génomique - 38

(b) Réponse rapide via un récepteur membranaire - 41

2) Action sur l'homéostasie minérale - 42

3) Autres fonctions - 43

E. Pathologies : les conséquences d'une carence ou d'un excès de vitamine D - 44

1) La carence en vitamine D - 44

2) L'intoxication à la vitamine D - 45

3) Les maladies héréditaires - 46

(a) Rachitisme pseudo-carentiel de type I - 46

(b) Rachitisme pseudo-carentiel de type II - 46

(c) Autre cas de rachitisme héréditaire - 47

III. Conclusions et problématique - 47

Résultats - 49

A. Effets de l'uranium sur le métabolisme de la vitamine D_3 - 50

1) Article 1 – Effets de l'uranium appauvri après une exposition aigue sur le métabolisme de la vitamine D chez le rat. - 50

2) Article 2- Effets in vivo d'une contamination chronique à l'uranium appauvri sur le métabolisme de la vitamine D_3 chez le rat. - 54

3) Article 3 – L'uranium enrichi affecte l'expression de VDR et de RXR au niveau rénal chez le rat. - 58

B. Effets du césium 137 sur le métabolisme de la vitamine D_3 - 61

1) Article 4 – Une contamination chronique au césium 137 affecte le métabolisme de la vitamine D_3 chez le rat. - 61

2) Article 5 – Dysfonctionnement du métabolisme de la vitamine D_3 chez le rat suite à une contamination chronique au césium 137 durant la période de développement post-natal. - 65

Discussion générale et perspectives - 68

I. Discussion générale - 69

A. Caractérisation des effets de l'uranium sur le métabolisme de la vitamine D - 69

B. Caractérisation des effets du césium 137 sur le métabolisme de la vitamine D - 74

II. Persectives - 77

III. Conclusion générale - 80

Annexes - 82

I. Revues générales - 83

II. Articles originaux - 86

Références - 89

Avant-propos

La pollution de l'environnement est devenue aujourd'hui l'une des préoccupations majeures de la population. Tous les milieux, aquatique, atmosphérique et terrestre, sont concernés par la pollution, qu'elle soit d'origine anthropique (émissions des moteurs ou des usines, station d'épuration, etc.) ou naturelle (éruption volcanique, érosion, etc.).

La croissance démographique et industrielle contribue pour une part considérable à la contamination de l'environnement. Parmi les nombreuses causes de pollution, on peut citer par exemple l'utilisation massive d'engrais ou d'insecticides par l'industrie agricole, les rejets d'hydrocarbures (dégazage, marée noire) ou l'émission de métaux lourds (cadmium, mercure, plomb, etc.) autour des sites d'activités liés à la métallurgie. Cette pollution incessante, à laquelle tout le monde est exposé, peut avoir un impact sur la santé humaine. Les études montrent que parmi ces molécules polluantes, certaines sont des perturbateurs endocriniens et peuvent avoir un impact sur l'équilibre hormonal de l'espèce humaine. On peut citer par exemple le DDT (Dichlorodiphényltrichloroéthane) ou le chlordane, des insecticides qui sont des agonistes aux estrogènes et à la progestérone et modifient la fertilité ; les dithiocarbamates, des fongicides qui perturbent la synthèse de neurotransmetteurs comme l'adrénaline ; le cadmium, un métal lourd qui perturbe le métabolisme de la vitamine D ; ou les dioxines qui diminuent le taux d'hormones thyroïdiennes.

Plus récemment, l'accident de Tchernobyl survenu en 1986 qui a contaminé l'environnement sur des milliers de kilomètres carrés, la production de déchets radioactifs et les rejets de l'industrie nucléaire ont suscité un intérêt grandissant pour la pollution radiologique. Les radionucléides peuvent contribuer aux risques chroniques subis par l'Homme et l'environnement. Cependant, les conséquences sanitaires de telles expositions sont encore méconnues. Afin de répondre à ces interrogations, le programme de recherche ENVIRHOM, lancé en 2001 par l'Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire a pour but d'évaluer les effets sur la santé et l'environnement de la contamination chronique à des faibles doses de radionucléides. L'un des objectifs de ce programme est d'identifier, à partir de modèles expérimentaux, les effets biologiques et les dysfonctionnements éventuels induits par les radionucléides sur les grandes fonctions physiologiques (systèmes nerveux central, immunitaire, reproducteur, etc.) de l'Homme. Ainsi, les effets biologiques sur certaines fonctions métaboliques majeures telles que les métabolismes du cholestérol, des médicaments, des hormones stéroïdiennes et de la vitamine D sont étudiés.

Dans ce contexte, l'objet de cette thèse est l'étude des effets d'une contamination chronique par des radionucléides sur le métabolisme de la vitamine D qui joue un rôle

essentiel dans le contrôle de l'homéostasie phosphocalcique et dans la minéralisation osseuse.

Une partie des travaux a été présentée dans les congrès suivants :

❖ **Tissandié E**, Gueguen Y, Lobaccaro JMA, Grison S, Dudoignon N, Baudelin C, Dublineau I, Paquet F, Voisin P, Aigueperse J and Souidi M. Effects of acute administration of depleted uranium on vitamin D cytochromes P450 metabolizing enzymes in rat. 14th International Conference on Cytochromes P450 - Dallas, TX, USA; 2005.

❖ **Tissandié E**, Gueguen Y, Lobaccaro JMA, Grison S, Dudoignon N, Baudelin C, Dublineau I, Paquet F, Voisin P, Aigueperse J, Gourmelon P and Souidi M. *In vivo* effects of depleted uranium on metabolism of vitamin D3. 34th Annual Meeting of the European Society for Radiation Biology- Leicester, UK- 5th to 8th September 2005.

❖ **Tissandié E**, Guéguen Y, Lobaccaro J.M.A., Aigueperse J, Grison S and Souidi M. Vitamin D metabolism impairment in rat offspring following parental exposure to cesium 137. 11th International Congress of Toxicology, Montréal, Canada, le 15-19 Juillet 2007.

❖ **Tissandié E**, Racine R, Grignard E, Guéguen Y, Gourmelon P et Souidi M. Effets *in vivo* d'une contamination chronique au césium 137 sur le métabolisme de la vitamine D3, du cholestérol et de l'oestradiol. 8ème Colloque International de Radiobologie Fondamentale et Appliquée, La Londe Les Maures, France, le 16-21 Septembre 2007.

Et a fait l'objet des publications suivantes :

* articles originaux

❖ **Tissandié E**, Gueguen Y, Lobaccaro JMA, Paquet F, Aigueperse J and Souidi M. Effects of depleted uranium after short-term exposure on vitamin D metabolism in rat. *Archives of Toxicology* (2006) 80(8) : 473-480.

❖ **Tissandié E**, Guéguen Y, Lobaccaro JMA, Aigueperse J, Gourmelon P, Paquet F and Souidi M. Chronic contamination with 137Cesium affects vitamin D3 metabolism in rats. *Toxicology* (2006) 225(1):75-80.

❖ **Tissandié E**, Guéguen Y, Lobaccaro JMA, Grandcolas L, Voisin P, Aigueperse J, Gourmelon P and Souidi M. *In vivo* effects of chronic contamination with depleted uranium on vitamin D3 metabolism in rat. *Biochimica et biophysica acta-general subjects* (2007) 1770(2):266-72.

❖ Souidi M, **Tissandié E**, Grandcolas L, Grison S, Paquet F, Voisin P, Aigueperse J, Gourmelon P and Guéguen Y. Chronic contamination with 137Cesium in rat: effect on liver cholesterol metabolism. *International Journal of Toxicology*. (2006) 25(6):493-7.

❖ Guéguen Y, Grancolas L, Baudelin C, Grison S, **Tissandié E**, Jourdain JR, Paquet F, Voisin P, Aigueperse J, Gourmelon P and Souidi M. Effect of acetaminophen administration on uranium chronically exposed rats. *Toxicology* (2007) 229 (62-72).

❖ **Tissandié E**, Guéguen Y, Lobaccaro JMA, Grandcolas L, Aigueperse J, Gourmelon P and Souidi M. Enriched uranium affects the expression of vitamin D receptor and retinoid X receptor in rat kidney. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. sous presse.

❖ **Tissandie E**, Guéguen Y, Lobaccaro JMA, Grandcolas L, Grison S, Aigueperse J and Souidi M. Vitamin D metabolism impairment in the rat's offspring following maternal exposure to cesium 137. Soumis.

* <u>revues générales</u>

❖ Guéguen Y, Mouzat K, Ferrari L, **Tissandié E**, Lobaccaro JMA, Batt AM, Paquet F, Voisin P, Aigueperse J, Gourmelon P et Souidi M. Les Cytochromes P450 : métabolisme des xénobiotiques, régulation et rôle en clinique. *Annales de Biologie Clinique* (2006) 64(6) 535-48.

❖ **Tissandié E**, Guéguen Y, Lobaccaro JMA, Aigueperse J et Souidi M. Vitamine D : métabolisme, régulation et pathologies associées. *Médecine sciences* (2006) 22(12):1095-1100.

Introduction

I. RADIONUCLEIDES

A. Les radionucléides dans l'environnement

Les radionucléides sont des atomes dont le noyau est instable. Ils vont alors tendre vers la stabilité en se désintégrant et en émettant des rayonnements alpha (α), bêta (ß) et gamma (γ). Les rayonnements γ sont des ondes électromagnétiques tandis que les rayonnements α et ß sont des particules qui sont respectivement un noyau d'hélium et un électron. Le rayonnement α, qui a un très faible pouvoir de pénétration dans l'air, est arrêté par une simple feuille de papier. Le rayonnement ß correspond à la transformation dans le noyau, soit d'un neutron en proton (radioactivité bêta moins), soit d'un proton en neutron (radioactivité bêta plus). Il ne parcourt que quelques mètres dans l'air et est arrêté par une feuille d'aluminium. Le rayonnement γ est le plus pénétrant des trois rayonnements. Il peut parcourir des centaines de mètres dans l'air. Il faut recourir à de fortes épaisseurs de plomb ou de béton pour l'arrêter.

Ces rayonnements sont susceptibles d'entrer en interaction avec la matière qu'ils traversent et de provoquer des changements au niveau de la structure atomique du milieu traversé, essentiellement par le biais de phénomènes d'ionisation (production d'ions par modification du nombre d'électrons d'un atome). De ce fait, ces rayonnements sont qualifiés d'ionisants.

Les radionucléides existent naturellement ou sont produits artificiellement dans les réacteurs nucléaires. Les radionucléides naturels, se divisent en deux catégories : les radionucléides primordiaux, qui étaient présents au moment de la formation de la terre, et les radionucléides cosmogéniques, produits en permanence par le bombardement des gaz de l'atmosphère terrestre par les rayons cosmiques. Le potassium 40, l'uranium 238 et le thorium 232 sont les principaux radionucléides primordiaux. Avec leurs descendants radioactifs, ces éléments sont présents dans les roches, les sols et se retrouvent à l'état de traces dans les eaux de boisson et les végétaux. Les quatre principaux radionucléides cosmogéniques sont le carbone 14, le béryllium 7, le sodium 22 et le tritium. Ils sont déposés sur la terre par l'action du brassage atmosphérique, des précipitations et de la pesanteur. Les radionucléides d'origine artificielle sont utilisés pour les activités médicales (technitium 99m, tallium 201, iode 131, etc.) et dans l'industrie nucléaire civile et militaire (plutonium 239, strontium 90, césium 137, etc.) (MacKenzie 2000).

L'exposition de l'Homme aux radionucléides peut s'effectuer de manière externe lorsque la source de rayonnements n'est pas en contact direct avec la personne ou de manière interne lorsque les radionucléides sont incorporés dans l'organisme par ingestion, inhalation ou blessure cutanée. Dans le cas d'une exposition externe, ce sont principalement les radionucléides émettant des rayonnements de type γ et dans une moindre mesure, ß, qui sont les plus dangereux. En revanche, dans le cas d'une contamination interne, le rayonnement α qui est très ionisant et dont le parcours moyen dans la matière vivante est de 40 µm, est plus nocif que le rayonnement γ qui n'est que partiellement arrêté par les tissus humains. En effet, du fait de leur action plus concentrée, les particules α bombardent sans cesse les cellules et les tissus avoisinants provoquant des dégâts biologiques beaucoup plus importants que les rayonnements γ pour la même quantité d'énergie déposée dans les tissus vivants (CLEFS-CEA. 2003a).

Les radionucléides se trouvent de façon ubiquiste dans tous les compartiments de l'environnement. L'exposition aux radiations naturelles, qui représentent 85,5% de la radioactivité totale (naturelle et artificielle), est la principale cause d'irradiation de l'espèce humaine (CLEFS-CEA. 2003b). Cette exposition naturelle augmente en fonction de l'altitude, et varie en fonction de la nature des roches. A cette irradiation naturelle s'ajoute la composante due aux activités humaines. Plus de 2500 nucléides artificiels ont été produits à ce jour et trouvent des applications dans des domaines aussi divers que l'industrie du nucléaire (combustible), la médecine (imagerie médicale, traitement des cancers par radiothérapie, stérilisation du matériel médico-chirurgical), l'industrie agro-alimentaire (conservation et stérilisation des denrées), le bâtiment (gammagraphie), l'archéologie (datation) et l'art (préservation d'objets d'art) (Chelet 2006). Cette radioactivité artificielle représente environ 14,5% de la radioactivité totale, beaucoup plus dans les pays les plus développés (CLEFS-CEA. 2003b). En France, l'exposition annuelle aux rayonnements ionisants est due principalement aux radiographies médicales qui constituent 41% de la dose totale reçue (IRSN 2007). A cause de son augmentation lors de ces dernières décennies, cette radioactivité ajoutée fait l'objet d'une attention particulière.

Parmi les radionucléides d'origine naturelle ou artificielle, l'uranium et le césium 137 représentent des sources de contaminations importantes pour la population.

B. L'uranium

1) Propriétés et utilisations

Découvert en 1789 par le chimiste allemand M. K. Klaproth, l'uranium est l'élément le plus lourd présent naturellement dans les roches, les sols et l'eau. Sa propriété radioactive a été mise en évidence une centaine d'années plus tard, en 1896 par le physicien français H. Becquerel.

La concentration moyenne de l'uranium dans la croûte terrestre est de 2 mg/kg (ATSDR 1999). Elle varie en fonction de la constitution des roches. On le rencontre sous différentes formes minéralogiques, aussi bien dans les terrains granitiques que sédimentaires. On le trouve par exemple en combinaison avec l'oxygène dans l'uraninite et la pechblende, deux des principaux minerais d'uranium, constitués d'oxyde uraneux (UO_2).

De symbole U, l'uranium est le dernier élément naturel du tableau périodique de Mendeleïev. Il possède le plus grand numéro atomique (Z=92) et fait partie de la famille des actinides. L'atome d'uranium possède 6 électrons périphériques qui sont facilement extractibles. Il peut se présenter aux valences III, IV, V, VI. En solution aqueuse, l'uranium est préférentiellement à la valence VI et forme différents complexes par l'intermédiaire de l'ion uranyle UO_2^{2+}. Dans les fluides biologiques, il est présent uniquement sous forme d'ion uranyle principalement complexé avec les ions carbonate et citrate (Madic and Genet 2001).

L'uranium possède 17 isotopes avec des nombres de masse compris entre 227 et 242. Parmi ces isotopes, trois seulement sont présents à l'état naturel : ^{238}U (99,28%) ; ^{235}U (0,718%) et ^{234}U (0,0054%). Ces isotopes, tous radioactifs, se désintègrent principalement par émission de rayonnements α et possèdent des périodes très longues (figure 1).
L'Uranium 235 est le seul noyau naturel aisément fissible et il présente donc un intérêt énergétique et militaire. Les deux applications principales de la fission sont les réacteurs nucléaires producteurs d'électricité et les armes nucléaires (bombe A). La plupart des réacteurs nucléaires utilisent de l'uranium dit enrichi (UE). L'enrichissement consiste donc à augmenter la teneur en Uranium 235 de l'uranium naturel (0.7% ^{235}U) jusqu'à un niveau compris entre 3 et 5% en vue de l'utiliser comme combustible ou jusqu'à un niveau supérieur à 90% en vue de l'utiliser comme explosif. Le mélange restant après séparation de l'uranium enrichi est appelé uranium appauvri (UA) car il contient très peu d'^{235}U (0,3% en moyenne). Il possède les mêmes propriétés chimiques que l'uranium naturel (UN) mais est 60% moins radioactif (figure 2). C'est à la fois un résidu de l'industrie nucléaire, disponible en très grande quantité et bon marché, et un matériau employé pour des utilisations non

nucléaires. En effet la fabrication d'1 tonne d'UE à 3,5% à partir d'UN entraîne la production de plus de 4 tonnes de déchets d'UA. Sa forte densité (19 g/cm^3), environ 1,7 fois celle du plomb, et son prix bon marché favorise son utilisation par rapport aux autres métaux de densité comparable comme l'iridium, l'osmium ou le tungstène, malgré sa radioactivité. Ces propriétés ont conduit à l'utiliser dans de nombreuses applications civiles et militaires : contrepoids ou lest dans les avions, boucliers de protection contre les rayonnements dans le matériel médical utilisé pour les radiothérapies et dans les conteneurs servant aux transports des matières radioactives, blindage dans les plaques de char d'assaut et composant de projectile d'armes de guerre. Dans cette dernière application, sa nature pyrophorique (capacité de s'enflammer spontanément à l'air à température élevée) permet au projectile enflammé suite à son échauffement dans la traversée du blindage, de provoquer l'incendie à l'intérieur du char et sa destruction (Abu-Qare and Abou-Donia 2002; Bleise *et al.* 2003).

2) Sources d'exposition à l'uranium

L'uranium est un radionucléide d'origine tellurique. Il peut donc être retrouvé aussi bien dans le sol, l'eau, l'air que dans l'ensemble de la chaine alimentaire en raison de ce dépôt naturel mais aussi de son exploitation par l'homme.

L'alimentation et l'eau potable constituent les deux principales sources d'exposition chronique à l'uranium. La quantité de ce radionucléide ingérée quotidiennement a été estimée à 1-2 µg dans l'alimentation et à 1,5 µg dans l'eau de boisson (ATSDR 1999). Certaines régions sont naturellement riches en uranium. Ainsi certaines populations de Finlande sont exposées à un taux d'UN contenu dans leur eau de boisson, 100 à 1000 fois plus élevé que la moyenne (Auvinen *et al.* 2002). Des concentrations d'uranium de 1200 µg.l^{-1} ont été détectées dans les eaux destinées ou non à la consommation humaine au Nouveau Mexique (Hakonson-Hayes *et al.* 2002), de 700 µg.l^{-1} au canada (Moss 1983) et atteignant 20 mg.l^{-1} en Finlande (Juntunen 1991).

A cette exposition naturelle, vient s'ajouter une exposition à l'UN, l'UA et à l'UE du fait de l'activité humaine. Les résidus miniers laissés par le broyage et le traitement du minerai d'uranium ainsi que l'utilisation d'armes à l'UA lors des derniers conflits internationaux (Bosnie, Kosovo, Afghanistan, Irak…) participent à la contamination de l'environnement et augmentent les sources d'exposition des populations locales (ATSDR 1999; Di Lella *et al.* 2005; Shawky 2002). De plus, certains engrais phosphatés employés dans l'agriculture présentent des teneurs élevées en uranium (Cantaluppi and Degetto 2000; Saueia and Mazzilli 2006).

3) Biocinétique

Pour évaluer la toxicité de l'uranium, il est nécessaire de connaître sa biocinétique, qui a pour but de déterminer le devenir biologique d'un élément dans l'organisme.

(a) Absorption

Les différents modes de pénétration de l'uranium dans l'organisme sont l'ingestion, l'inhalation et la blessure cutanée (Craft *et al.* 2004). Ces deux dernières voies concernent un nombre restreint de personnes à leur poste de travail dans l'industrie électronucléaire, en cas d'accident ou des soldats exposés à des projectiles contenant de l'UA. En revanche, l'ingestion est la voie la plus fréquente pour l'exposition du public, elle est due à la consommation d'eau de boisson ou d'aliments contaminés.

Après ingestion, une faible quantité d'uranium est absorbée au niveau du tractus gastro-intestinal. L'intestin grêle est le lieu principal d'absorption et de transfert de l'uranium depuis le bol alimentaire vers le compartiment sanguin (Dublineau *et al.* 2005). Chez l'Homme, le taux d'absorption intestinal est estimé à environ 1-1,5% (Leggett and Harrison 1995). Les études réalisées chez l'animal montrent que ce taux varie en fonction de l'espèce, du régime alimentaire, de la forme physico-chimique du sel d'uranium et de la solubilité du composé (Sullivan *et al.* 1986; Wrenn *et al.* 1985).De plus une absorption accrue d'uranium a été mise en évidence chez le nouveau né par rapport à l'adulte. (Leggett 1994; Sullivan 1980).

(b) Distribution et rétention

Après son passage dans le sang, l'uranium est rapidement distribué aux organes cibles et excrété par les urines. L'uranium plasmatique est sous forme d'ions uranyles associés à des molécules de faible poids moléculaire comme les carbonates et les citrates ou liés à des protéines plasmatiques telles que la transferrine ou l'albumine (Cooper *et al.* 1982; Pellmar *et al.* 1998). Quelques jours après l'absorption d'uranium dans le sang, la plupart de la charge systémique se retrouve principalement dans l'os et au niveau du cortex rénal (environ 90 %) et une partie beaucoup plus faible dans les tissus mous (poumons, rate, foie, etc.) (La Touche *et al.* 1987) (figure 3). L'os représente le site de stockage à long terme de l'uranium qui se trouve essentiellement concentré à proximité des zones vascularisées et de calcification active. Le comportement de l'uranium dans le squelette est comparable à celui des alcalino-terreux (Priest 2001). Sa fixation à la surface de l'os se fait par échange d'ions uranyle UO_2^{2+} avec les ions calcium présents dans les cristaux

d'hydroxyapatite (Leggett 1994; Priest *et al.* 1982). Dans les cellules tubulaires proximales, l'uranium pénètre dans les lysosomes et précipite sous forme de fines aiguilles insolubles de phosphate d'uranyl . Ces mico-précipités insolubles sont alors déversés dans la lumière du néphron et éliminés dans les urines sous forme de grains submicroscopiques (Galle 1998).

(c) Excrétion et élimination

Après ingestion, seule une petite fraction d'uranium traverse la barrière intestinale et passe dans la circulation sanguine. La majeure partie de l'uranium n'est donc pas absorbée et est éliminée *via* les fèces (WHO 2001

).

En revanche, l'excrétion de l'uranium solubilisé qui circule dans le sang est essentiellement urinaire. Ainsi, la mesure de l'uranium urinaire permet de suivre l'élimination de l'uranium ayant traversé la barrière digestive. Environ la moitié de l'uranium absorbé est éliminé dans les urines dès le premier jour, 70% est éliminé dans les 10 jours suivant l'absorption et 85% après 3 mois (Leggett and Pellmar 2003). Avec une demi vie de rétention allant de 300 à 5000 jours, l'élimination de l'uranium stocké dans les os est beaucoup plus lente (WHO 2001

). Ainsi une fraction de l'uranium reste piégée dans l'os pendant plusieurs dizaines d'années.

4) Toxicité de l'uranium

L'uranium possède une double toxicité : une toxicité chimique due à sa nature de métal lourd et une toxicité radiologique due à sa nature de radioélément. La toxicité radiologique varie en fonction de son isotopie et de son degré d'enrichissement en ^{235}U. A l'inverse, quel que soit l'isotope considéré, le risque chimique reste identique. Lors d'une contamination par de l'uranium naturel ou appauvri, la toxicité chimique est prépondérante. En revanche plus l'activité spécifique du composé uranifère est importante, comme c'est le cas pour l'uranium enrichi, plus le risque radiotoxique est à prendre en considération. Pour les risques chimiques et radiologiques, deux types d'effets sont distingués : les effets de toxicité aiguë qui correspondent à une exposition à une forte dose pendant un temps court et les effets de toxicité chronique qui correspondent à une exposition à long terme mais à de faibles doses.

(a) Toxicité après exposition aiguë

❖ Effets sur le rein

L'effet néphrotoxique de l'uranium est dû essentiellement à ses propriétés chimiotoxiques. La dose létale 50 (LD50) par voie orale est de 204 mg/ kg chez le rat et de 242 mg/ kg chez la souris. C'est la toxicité rénale (néphrite tubulaire aiguë) qui entraîne la mort de l'animal (Domingo *et al.* 1987).

Les reins constituent l'organe principal d'excrétion de l'uranium. Le néphron est l'unité structurelle et fonctionnelle de base du rein. Chaque néphron est composé d'un glomérule, entouré d'un bulbe creux, la capsule de Bowman, au niveau duquel est formé le filtrat glomérulaire, ou urine primitive, et d'un tubule rénal, composé d'un tubule contourné proximal, d'une anse de Henlé, et d'un tubule contourné distal. Sous forme de complexes avec les carbonates ou les citrates, l'uranium est filtré au niveau du glomérule rénal et partiellement éliminé dans les urines. La partie de l'uranium qui n'est pas excrétée, est réabsorbée et s'accumule dans le rein en se fixant sur les cellules tubulaires proximales (Leggett 1989). L'acidité accrue du tubule proximal entraîne la dissociation du complexe d'uranium et les ions uranyles peuvent alors se combiner avec des composants de la membrane luminale. Dans la cellule, les ions uranyles s'accumulent principalement dans les lysosomes pour former des aiguilles de phosphate d'uranyle mais également dans les mitochondries (Galle 1998; Leggett 1989). Une étude réalisée *in vitro* montre qu'à forte concentration, l'uranium peut déclencher l'apoptose par activation des caspases 3 et 9 (protéases à cystéine) activées par des signaux intrinsèques *via* la mitochondrie (Thiebault *et al.* 2007).

A forte dose, l'uranium est capable d'induire des néphropathies sévères affectant surtout les tubules proximaux mais également les structures glomérulaires. (Diamond *et al.* 1989; Kobayashi *et al.* 1984; Priest 2001). Des études histologiques et morphologiques révèlent une altération de l'architecture de l'épithélium glomérulaire (Kobayashi *et al.* 1984) et une nécrose cellulaire au niveau de l'épithélium tubulaire proximale (Diamond *et al.* 1989). Malgré cette nécrose rénale, l'épithélium tubulaire est capable de se régénérer. Après injections répétées de fluorure d'uranyle UO2F2 (à une dose de 0,66 ou 1,32 mg U/kg de poids corporel), une étude histologique chez le rat révèle une nécrose massive des tubules proximaux (au niveau des segments terminaux) suivie d'une régénération de l'épithélium après l'arrêt du traitement (Diamond *et al.* 1989). Cependant, les cellules lésées sont apparemment remplacées par des nouvelles cellules structurellement différentes et dépourvues de certaines capacités fonctionnelles (Wrenn *et al.* 1985).

Une exposition aiguë à l'uranium se caractérise également par des anomalies fonctionnelles telles que la polyurie, l'enzymurie, la protéinurie et l'élévation sanguine de la créatinine et de l'urée (Blantz 1975; Diamond *et al.* 1989; Domingo *et al.* 1987; Haley *et al.* 1982). La sévérité et la réversibilité des lésions dépendent de la concentration d'uranium dans les reins et du temps d'exposition. En 1959, la Commission Internationale de Protection Radiologique recommande une concentration maximale admissible en uranium dans les reins de 3 µg.g-1. Cependant cette valeur seuil est aujourd'hui très discutée. En effet des nécroses cellulaires des tubules proximaux accompagnées d'une protéinurie et d'une enzymurie sont observées chez des animaux contenant des concentrations d'uranium dans les reins bien inférieures à la dose recommandée (0,7 à 1,4 µg U.g-1 de poids de rein) (Diamond *et al.* 1989).

❖ Effets sur l'os

L'os étant le site de stockage à long terme de l'uranium, il est la cible potentielle de la radiotoxicité. Des cancers osseux (ostéosarcomes) ont été observés chez les animaux exposés à des composés d'uranium présentant des activités spécifiques élevées (^{232}U ou ^{233}U). En revanche, aucun cancer n'a été décrit chez l'animal après incorporation d'UN (Wrenn *et al.* 1985).

Des études réalisées *in vitro* ont montré que l'UA sous forme soluble transforme des cellules ostéoblastiques humaines (cellules cubiques situées à la surface externe et interne du tissu osseux en croissance et impliquées dans la formation osseuse) en cellules cancéreuses (Miller *et al.* 1998).

In vivo, l'uranium est capable d'inhiber la formation osseuse et d'augmenter la résorption osseuse. Ces effets sont attribués aux propriétés chimiotoxiques de l'uranium. (Fukuda *et al.* 2006; Guglielmotti *et al.* 1985; Ubios *et al.* 1991). Macroscopiquement, le tissu osseux est formé de deux parties : une partie périphérique (os compact) de densité élevée et de grande résistance mécanique et une partie centrale (os trabéculaire) de moindre résistance. Ubios et al observent chez le rat la diminution de la formation de l'os cortical couplée à une augmentation de la résorption osseuse, 14 jours après injection intrapéritonéale de nitrate d'uranyl (UNO_3) (2mg.kg^{-1} de poids corporel) (Ubios *et al.* 1991). Les auteurs suggèrent que l'uranium pourrait contribuer à l'ostéoporose ou à d'autres pathologies osseuses chez les individus exposés.

❖ Effets sur le système nerveux central

Chez l'animal, l'administration orale d'acétate d'uranium (11-717 mg U/kg) conduit à l'apparition de signes cliniques de neurotoxicité tels que des tremblements, hypothermie, rougeurs et diminution de la taille des pupilles (Domingo *et al.* 1987). De plus, un abaissement de la quantité de sommeil paradoxal est observé chez le rat après injection intra-péritonéale d'UA (144 $\mu g.kg^{-1}$) (Lestaevel *et al.* 2005b).

L'accumulation de l'uranium dans le cerveau est mis en évidence chez des rats implantés avec des fragments d'UA simulant des blessures d'éclat d'obus (Pellmar *et al.* 1999a). L'uranium est capable de traverser la barrière hémato-encéphalique et se distribue de façon hétérogène dans les structures cérébrales (Barber *et al.* 2005; Lemercier *et al.* 2003; Pellmar *et al.* 1999a). Sa distribution est dépendante de la dose (Pellmar *et al.* 1999a). Ainsi l'uranium se concentre préférentiellement dans certaines structures notamment au niveau du cervelet, du mésencéphale, de l'hippocampe et du cortex frontal où il pourrait induire un effet toxique. Chez les rats portant des implants sous-cutanés d'UA, Pellmar et al constatent des modifications de l'électrophysiologie de l'hippocampe et suggèrent que ces effets pourraient être une conséquence directe de l'accumulation d'uranium dans cette structure (Pellmar *et al.* 1999b).

Chez l'Homme, la neurotoxicité de l'uranium n'a pas été clairement démontrée. Cependant, une étude révèle des troubles du comportement tels que des états de dépression ou d'agitation chez des travailleurs exposés à de fortes doses d'uranium (Howland 1949).

❖ <u>Effets sur la reproduction</u>

La toxicité de l'uranium sur le développement et la reproduction a été observée principalement chez la souris lorsque l'uranium est administré par voie orale ou par injection (Domingo 2001). L'ingestion d'uranium pendant l'organogénèse induit une toxicité maternelle et fœtale. En effet Domingo et al (Domingo *et al.* 1989) rapportent une réduction de la prise de poids, une diminution de la prise alimentaire et une augmentation du poids du foie chez les souris femelles après gavage pendant la période de gestation (quantités d'uranium comprises entre 5 et 50 mg d'acétate d'uranyl. kg^{-1} poids. $jour^{-1}$). Chez le fœtus, ils constatent également l'apparition de malformations (palatoschisis ou fissures congénitales du palais et malformations du sternum). Les auteurs décrivent des troubles de l'ossification voire même une absence d'ossification du squelette.

Aucun effet sur la fertilité n'est mis en évidence après administration d'uranium à des doses comprises entre 5 et 25 $mg.kg^{-1}$ poids. $jour^{-1}$ (Paternain *et al.* 1989). En revanche

une diminution du nombre de nouveau-nés due à une augmentation de la mortalité in utéro, une augmentation de la létalité des embryons ainsi qu'une perturbation de la croissance et du développement des souriceaux ont été notées pour les doses d'uranium les plus élevées. Malgré l'absence d'effet constaté sur la spermatogenèse, Llobet et al (Llobet *et al.* 1991) rapportent des altérations du tissu interstitiel dans les testicules et une vacuolisation des cellules de Leydig chez les souris mâles exposées à l'uranium *via* l'eau de boisson pendant 64 jours avant l'accouplement (quantités d'acétate d'uranyl comprises entre 10 et 80 mg d'uranium. kg^{-1} poids. $jour^{-1}$).

❖ Effet sur le foie

Bien que l'hépato-toxicité ne fasse pas partie des principales manifestations toxiques de l'uranium, certaines études décrivent des modifications histologiques et l'apparition de lésions après exposition à de fortes doses d'uranium (Domingo *et al.* 1987). Des nécroses focales sont observées au niveau du foie chez le hamster après une exposition aiguë à l'uranium (Cross *et al.* 1981). Une élévation des taux plasmatiques des transaminases ALAT (alanine amino transférase) et ASAT (aspartate amino transférase) traduisant un dysfonctionnement hépatique est observée après injection sous-cutanée d'uranium chez le rat (Domingo *et al.* 1987; Gueguen *et al.* 2006b). Des anomalies fonctionnelles telles que la diminution des triglycérides sont également décrites (Gueguen *et al.* 2006b). Au niveau moléculaire, l'inhalation de dioxyde d'uranium induit une modification de l'activité d'enzymes de type cytochromes P450 (CYPs) hépatiques impliquées dans le catabolisme de la testostérone (Pasanen *et al.* 1995). D'autre part, dans le foie, l'activité de la CYP27A1 qui assure le catabolisme du cholestérol ainsi que l'activité et l'expression des CYP3A impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques sont aussi perturbées chez le rat quelques jours après l'administration d'UA (Gueguen *et al.* 2006b).

❖ Autres effets toxiques

Dans le cas d'une inhalation de particules d'uranium, le poumon est la première cible du composé inhalé. Sur les modèles animaux, des expositions aiguës à de fortes doses d'uranium induisent une inflammation de l'épithélium alvéolaire pouvant conduire à une fibrose pulmonaire (ATSDR 1999; Cooper *et al.* 1982). Dans le cas d'une ingestion d'uranium, le tractus digestif constitue la voie d'entrée du radionucléide. Peu d'effets de l'uranium sur le système gastro-intestinal ont été rapportés. Néanmoins une étude révèle des perturbations du système immunitaire intestinal, illustrées par des modifications de l'expression et/ou de la production de cytokines et de chémokines, après ingestion d'une grande quantité d'uranium chez le rat (Dublineau *et al.* 2006). Cependant cette étude ne

montre pas de différence de localisation ou de densité des macrophages résidents et des lymphocytes T impliqués dans la production de ces molécules.

(b) Toxicité après exposition chronique (figure 4)

Comparées aux connaissances acquises après expositions aiguës, peu de données sont disponibles sur les effets biologiques d'une contamination chronique à l'uranium. Pourtant ces expositions par ingestion chronique de faibles quantités *via* l'alimentation et l'eau de boisson constituent le principal mode d'exposition de la population générale.

❖ Effets sur les deux principaux organes fixateurs d'uranium : l'os et le rein

Chez l'animal, l'ingestion d'uranium pendant 91 jours à une concentration de 0,96 mg de nitrate d'uranyl (UNO_3)/l d'eau de boisson induit des lésions au niveau du rein, caractéristiques de la toxicité de l'uranium (Gilman *et al.* 1998a). Ces lésions concernent les tubules (vacuolisation cytoplasmique, vésicule nucléaire, dilatation tubulaire) mais aussi les glomérules. Cette étude impliquant des animaux exposés à des concentrations allant de 0,96 à 600 mg/l d'uranium indique que les modifications histopathologiques observées au niveau du rein sont dépendantes de la dose ingérée. Chez le rat, l'analyse microscopique des tubules proximaux révèle une augmentation du nombre de vésicules contenant des granules d'oxyde de fer après ingestion chronique d'UA. Le nombre de ces vésicules augmente avec la durée d'exposition à l'uranium. Dans cette étude, les auteurs suggèrent que l'uranium rentre en compétition avec le fer entraînant une excrétion préférentielle de l'uranium et une surcharge en fer dans la cellule tubulaire (Donnadieu-Claraz *et al.* 2007).

Lors d'une exposition chronique le tissu osseux peut contenir 66 à 75% de la charge corporelle en uranium (Leggett 1994; Wrenn *et al.* 1985). Chez le rat, la contamination chronique par implantation sous-cutanée de poudre de dioxyde d'uranium UO_2 révèle une inhibition de la formation osseuse comme il a été décrit après intoxication aiguë à l'uranium (Diaz Sylvester *et al.* 2002). Dans une étude récente, Miller et al suggèrent qu'une exposition à long terme à l'UA pourrait provoquer des cancers osseux chez l'Homme (Miller *et al.* 2002).

Les données humaines démontrent que même pour des apports quotidiens faibles, l'ingestion d'uranium peut interférer avec la fonction rénale. Ainsi, dans une étude canadienne (concentrations moyennes d'uranium dans l'eau de 0,71 µg/l, 16,6 µg/l et 14,7 µg/l), une association statistiquement significative a été observée entre l'exposition à l'uranium (concentrations dans l'eau, années d'exposition) et l'albumine urinaire,

indicateur d'un dysfonctionnement rénal (Mao *et al.* 1995). De plus, Zamora et al (Zamora *et al.* 1998) montrent chez une population de la Nouvelle Ecosse (concentrations moyenne d'uranium dans l'eau de 2 à 781 µg/l), une corrélation positive de l'alcaline phosphatase et de la béta-2-microglobuline avec l'augmentation d'incorporation d'uranium évoquant une atteinte des tubules proximaux. Enfin, une autre étude a permis d'observer des effets tubulaires (calciurie, phosphaturie, and polyurie) associés à la présence d'uranium dans l'eau potable (Kurttio *et al.* 2002). Cependant aucun signe d'atteinte glomérulaire n'a été mis en évidence lors de ces études. Chez l'Homme, des effets toxiques sur l'os ont été également mis en évidence. Une étude épidémiologique réalisée en Finlande révèle une association entre le taux d'uranium dans l'eau potable et l'augmentation des phases de résorption/synthèse de l'os. En effet les auteurs observent l'augmentation d'un marqueur de la résorption osseuse (Télopeptide C-terminal du Collagène de Type-I, CTx) et d'un marqueur de la formation osseuse (ostéocalcine) (Kurttio *et al.* 2005).

❖ Autres effets toxiques

Le foie et le système nerveux central sont également des cibles de l'uranium après une exposition chronique. Une augmentation du taux des transaminases ALAT et ASAT, (Ortega *et al.* 1989) ainsi que des lésions histologiques au niveau du foie (Gilman *et al.* 1998b) sont observées chez le rat lors de contaminations chroniques par ingestion d'uranium contenu dans l'eau de boisson. Les études de biocinétique réalisées chez le rat après ingestion de 40 $mg.l^{-1}$ d'UA indiquent que l'uranium s'accumule de manière hétérogène dans les différentes structures du cerveau (Paquet *et al.* 2006), comme il a été décrit après intoxication aiguë à l'uranium. Dans ces conditions expérimentales (40 $mg.l^{-1}$ soit 1 $mg.jour^{-1}.rat^{-1}$), l'uranium appauvri induit des perturbations des systèmes de neurotransmission dopaminergique et sérotoninergique (Bussy *et al.* 2006) et l'uranium enrichi à 4,26% en ^{235}U provoque une augmentation de la quantité de sommeil paradoxal, une baisse de la mémoire à court terme et une hausse de l'anxiété sans modification du comportement général des animaux. En revanche dans les mêmes conditions, l'uranium appauvri n'induit pas d'effet sur le comportement ou le sommeil chez le rat (Houpert *et al.* 2005; Lestaevel *et al.* 2005a). Au niveau moléculaire, l'expression d'enzymes de type cytochromes P450 (CYPs) impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques est perturbée au niveau du foie et du cerveau chez le rat après 9 mois de contamination chronique à l'UA (Souidi *et al.* 2005). De plus, une stimulation de l'expression des CYPs impliquées dans le métabolisme des hormones stéroïdiennes, accompagnée d'une augmentation du taux de la testostérone plasmatique est observée chez le rat contaminé avec de faible dose d'UE (Grignard *et al.* 2007).

Chez l'Homme, une étude rapporte que 29 vétérans de la guerre du Golf, exposés à l'UA à partir de fragments d'obus présentent, 7 ans après leurs blessures, une baisse des performances à des tests neurocognifs automatisés par rapport à une population témoin de 38 vétérans non exposés (McDiarmid *et al.* 2000). Les auteurs établissent une corrélation entre la diminution des performances et l'uranium excrété dans les urines.

C. Le césium 137

1) Propriétés et utilisations

Le césium a été découvert en 1860 dans l'eau minérale de Durkheim en Allemagne, par Robert Wilhelm Bunsen et Gustave Robert Kirchhoff, par spectroscopie d'émission de sa raie bleue à laquelle il doit son nom tiré du latin *caesium*, bleu du ciel.

De symbole Cs, le césium est un élément naturel, de numéro atomique 55. C'est le 45ème élément le plus abondant de la croûte terrestre, en moyenne 2,6 g par tonne métrique. (Métivier and Lorthioir 2000). Il appartient, comme le lithium, le sodium, le potassium et le rubidium, au groupe des métaux alcalins. Le césium possède le point de fusion (28°C) le plus bas de la famille des alcalins. Avec le gallium et le mercure, il est l'un des rares métaux liquides à température proche de l'ambiante. Chimiquement, il présente un seul degré d'oxydation correspondant à l'espèce ionique Cs(+I). C'est l'élément le plus électropositif du tableau périodique des éléments. Le césium ne peut pas exister à l'état élémentaire dans l'environnement. Dans l'atmosphère, il est sous forme d'aérosols, mais surtout d'oxyde Cs_2O ou d'hydroxyde de césium CsOH en présence d'eau. Il est très soluble dans l'eau, et présente une grande affinité pour les minéraux et particulièrement les argiles.

Le césium possède 31 isotopes dont la masse varie de 114 à 145. Parmi eux, seul l'isotope 133 est stable et présent à l'état naturel dans deux minerais : la pollucite ou la rhodizite. Tous les autres isotopes sont radioactifs et produits à des fins industrielles. Dans un réacteur nucléaire, les isotopes radioactifs du césium sont produits par la fission des noyaux d'uranium 235 et de plutonium 239. La période de décroissance radioactive est supérieure à l'année uniquement pour les isotopes 134 (2,2 ans), 135 ($2,9.10^6$ ans) et 137 (30,2 ans).

Le césium 137 (^{137}Cs) est un émetteur β^- qui se désintègre en baryum 137 par émission de rayonnement γ. Il est produit dans les réacteurs nucléaires et dans les

accélérateurs pour la production de sources destinées aux applications industrielles et médicales. En médecine, cet isotope est utilisé comme source en radiothérapie et en brachythérapie (forme de radiothérapie permettant d'introduire la source autour ou directement dans la tumeur à l'aide d'un cathéter). On l'utilise également pour l'irradiation des produits sanguins pour inhiber la division lymphocytaire afin d'éviter les risques de maladie post-transfusionnelle chez les patients immunodéprimés. Dans l'industrie, il est utilisé essentiellement dans les appareils de gammagraphie pour le contrôle de pièces, de soudures ou d'ouvrages d'art et dans les irradiateurs pour la stérilisation des aliments(Agalesdes *et al.* 2000).

2) Sources d'exposition au césium 137

Le développement des activités industrielles et militaires, utilisant des matières radioactives a conduit à la libération volontaire et accidentelle, dans l'environnement de nombreux radionucléides. Parmi eux, le ^{137}Cs doit être considéré avec beaucoup d'attention en raison de sa période radioactive longue (30,2 ans), de ses caractéristiques nucléaires et de son transfert jusqu'à l'Homme dans l'environnement.

Plusieurs centaines d'essais nucléaires atmosphériques ont été effectués par différentes nations entre 1945 (premier essai américain) et 1980 (dernier essai chinois). Ils ont libéré dans l'environnement une quantité de ^{137}Cs estimée à $9{,}6.10^{17}$ Bq (ATSDR 2004). Suite à l'explosion d'un réacteur à la centrale de Tchernobyl (Ukraine), survenue le 26 Avril 1986, l'activité du ^{137}Cs émis dans l'environnement est estimée à 4.10^{16} Bq (ATSDR 2004). En 1957, l'explosion d'un container dans un complexe de production de plutonium à Kysthym (Russie) et la rupture d'un réservoir dans un réacteur à la centrale de Windscale (Royaume-Uni) ont entraîné des rejets en ^{137}Cs respectivement de 2.10^{14} Bq et de $2{,}2.10^{13}$ Bq (Colle and Roussel-Debet 2000). Les rejets de routine issus des différentes étapes de retraitement du combustible participent également à la contamination de l'environnement dans une moindre mesure. A titre d'exemple, en 1999, les rejets de ^{137}Cs de l'usine de retraitement de la Hague s'élevaient à $1{,}3.10^{12}$ Bq et ceux de Sellafield à $7{,}9.10^{12}$ Bq (Colle *et al.* 2005).

L'accident de Tchernobyl, qui s'accompagne d'un rejet de césium intense mais bref dans l'atmosphère doit être considéré comme la cause principale de la dispersion de ce radionucléide dans l'environnement. Les rejets ont entraîné une contamination prédominant au nord-ouest de l'Ukraine, au sud du Bélarus et dans les régions frontalières de la Russie. Le césium se dépose alors sur le sol et migre peu, particulièrement en présence d'argile (Colle and Roussel-Debet 2000). Ainsi, il se concentre principalement dans la couche superficielle du sol. On le retrouve dans la litière des forêts et dans les milieux aquatiques. Le césium

entre dans la chaîne alimentaire animale et humaine par la consommation d'eau, de végétaux, de champignons, de viandes, de poissons et de lait contaminés (figure 5). Différentes études établissent une corrélation entre le niveau de ^{137}Cs contenu dans la ration alimentaire, l'ingestion quotidienne de ^{137}Cs et la charge corporelle en ^{137}Cs (Handl *et al.* 2003; Takatsuji *et al.* 2000). Une étude réalisée sur les habitants de Christinovska en Ukraine indique que la consommation de champignons et de baies sauvages représente 95% du ^{137}Cs total ingéré. Les consommations de lait et des autres produits agricoles représentent respectivement 3% et 2% de la dose ingérée (Handl *et al.* 2003). Dans cette étude, les auteurs estiment à 100 Bq la quantité de ^{137}Cs ingérée quotidiennement en 1998 par la population avec des variations allant jusqu'à 2000 Bq par jour pour les personnes consommant d'avantage de champignons (figure 6).

Après l'accident de Tchernobyl, l'exposition des populations au ^{137}Cs avait une origine externe à l'organisme liée au dépôt sur le sol et une origine interne à l'organisme liée à l'inhalation d'air contaminé mais surtout à l'incorporation d'aliments et d'eau contaminés (Colle and Roussel-Debet 2000).

3) Biocinétique

Le césium, qu'il soit radioactif ou stable, agit chimiquement de la même façon dans l'organisme. Il se comporte comme son analogue chimique, le potassium, malgré certaines différences quantitatives

(a) Absorption

Après ingestion ou inhalation, l'absorption au niveau gastro-intestinal ou pulmonaire du césium est très grande. Chez l'animal 98% du césium ingéré est absorbé au niveau intestinal en 1 heure. La CIPR estime à 100% le taux d'absorption du césium (Després and Métivier 2000). Cependant ce taux d'absorption peut être moindre lorsque le césium est incorporé dans l'alimentation. En effet, dans la ration alimentaire une fraction du césium se complexe à des ligands organiques comme par exemple la pectine, qui est un polymère d'acide galacturonique présent dans les parois cellulaires végétales, empêchant ainsi son absorption (Nesterenko *et al.* 2004). Les études montrent que l'absorption gastro-intestinale varie non seulement en fonction de la nature de l'aliment mais également en fonction de la manière dont il est préparé (Raaf *et al.* 2004). Un taux d'absorption moyen de 78% est observé chez des volontaires ayant consommé du gibier contaminé par du ^{137}Cs et du ^{134}Cs suite à l'accident de Tchernobyl (Henrichs *et al.* 1989). La forme physico-chimique du

césium et la composition de la ration alimentaire sont des facteurs importants pouvant faire varier le taux d'absorption.

(b) Distribution et rétention

Une fois qu'il quitte le sang vers les organes, le césium se distribue de façon relativement homogène dans l'organisme (figure 7). Comme son homologue structural, le potassium, il est incorporé dans le secteur intra cellulaire par transport actif. Les canaux potassium et les pompes sodium/potassium (ou Na^+/K^+-ATP-ase) permettent son transport à travers la membrane cytoplasmique (Leggett *et al.* 2003). En raison de son métabolisme proche de celui du potassium, le césium est présent en grande quantité dans le muscle. En effet, les études réalisées chez l'animal exposé au ^{137}Cs par inhalation ou ingestion indiquent des concentrations élevées en césium au niveau du muscle squelettique (ATSDR 2004). Cependant, contrairement au potassium, certains tissus et organes tels que l'aorte, les surrénales, le foie et la rate présentent pour le césium une affinité supérieure à celle du muscle (Paulin and Siles 1998). Chez le renne contaminé par ingestion de ^{134}Cs, Skuterud et al (Skuterud *et al.* 2004) observent la présence de césium dans de nombreux tissus avec des concentrations plus élevées non seulement au niveau des muscles mais également dans le rein, le pancréas et les parathyroïdes. Une étude réalisée sur la population de Gomel (Biélorussie), région fortement touchée par les retombées de Tchernobyl, rapporte des concentrations en césium 137 plus importantes chez l'enfant par rapport à l'adulte. Chez l'enfant, les charges les plus élevées sont mesurées dans la glande thyroïde, les surrénales, le pancréas, les reins et le thymus, puis dans les muscles squelettiques et cardiaque, la paroi intestinale et la rate (Bandazhevsky 2003).

(c) Excrétion et élimination

L'excrétion du césium est principalement urinaire. D'après le modèle biocinétique développé par Leggett et al en 2003, après ingestion, le césium systémique est retrouvé pour 86% dans les urines et pour 14% dans les fèces (Leggett *et al.* 2003). Une petite partie du césium absorbé est éliminée dès les premiers jours. En effet chez l'Homme, suite à l'ingestion d'aliments contaminés par du ^{134}Cs et par du ^{137}Cs, environ 6% de la charge corporelle initiale est éliminée dès le premier jour et 94% est éliminée plus lentement (Henrichs *et al.* 1989).

Chez l'Homme, la période biologique du césium (période au bout de laquelle la moitié du césium absorbé est éliminé de l'organisme) varie de 50 à 150 jours. Différents facteurs tels que le sexe, la masse corporelle et l'âge influencent la rétention du césium.

Leggett et al (Leggett *et al.* 2003) estiment à 97 jours la période biologique du césium chez l'homme adulte contre 70 jours chez la femme adulte. De plus, la période augmente avec l'âge (34 jours pour un enfant de cinq ans contre 97 jours pour l'adulte) du fait de l'augmentation du poids corporel.

4) Toxicité du césium 137

Le césium 137 est chimiquement peu toxique. Sa nature d'émetteur β et γ et sa période biologique longue en font un élément essentiellement radiotoxique. Contrairement à l'uranium qui s'accumule préférentiellement au niveau de l'os et du rein, le césium se distribue de façon plus homogène dans l'organisme sans fixation préférentielle dans un organe particulier. De par sa distribution relativement homogène, on considère que les effets d'une contamination par le césium sont analogues à ceux d'une irradiation globale.

Quelques études expérimentales mettent en évidence les effets du césium 137 après une exposition à de fortes doses. En revanche, il existe très peu de données sur les effets de toxicité chronique correspondant à une exposition à long terme et à de faibles doses. Les rares données épidémiologiques suite à l'accident de Tchernobyl permettent d'aborder les effets toxiques du césium chez l'Homme.

(a) Toxicité après exposition aiguë

❖ Effets sur le système immunitaire

Une exposition aiguë au césium 137 entraîne dans la grande majorité des cas une insuffisance médullaire conduisant à la mort de l'individu. La DL 50/30 (dose létale 50%/30 jours) après injection intrapéritonéale est de 1 GBq de ^{137}Cs Kg^{-1} chez le rat (Thomas and Thomas 1970). Le temps nécessaire pour atteindre la dose létale varie en fonction de la dose et du sexe. Il augmente lorsque la dose diminue et il est plus long chez la femelle que chez le mâle. Nikula et al (Nikula *et al.* 1995) observent, chez le chien *Beagle*, une altération sévère des cellules hématopoïétiques entraînant la mort des animaux dans les 81 jours suite à l'injection intraveineuse de $^{137}CsCl$ (allant de 72 à 140 MBq de Cs /kg de poids corporel). Chez l'Homme, une insuffisance médullaire caractérisée par une baisse des globules blancs et une immunodéficience est rapportée chez 14 patients contaminés suite à une exposition externe et interne au $^{137}CsCl$ lors d'un accident à Goiânia au Brésil avec une source provenant d'un appareil de radiothérapie contenant 50,9 TBq de $^{137}CsCl$ (Brandao-Mello *et al.* 1991). L'exposition à des doses élevées de ^{137}Cs se caractérise donc par les effets classiques de la radiotoxicité aiguë avec le syndrome d'aplasie médullaire.

❖ Effets sur la reproduction

L'administration d'une dose élevée de césium présente une forte toxicité pour la reproduction. Chez la souris, la contamination par administration de ^{137}CsCl dans l'eau de boisson à la concentration de 14,8 KBq/ml pendant plusieurs générations entraîne un arrêt des fonctions de reproduction dès la deuxième génération qui s'accompagne d'une forte atrophie des testicules chez les souris mâles. Pour des doses dix fois plus faibles (1,48 KBq de^{137}CsCl /ml), les souris présentent encore des troubles importants de la fonction de reproduction, mis en évidence par une réduction du nombre de petits par portée, et une baisse significative de la croissance corporelle par rapport aux souris témoins. En revanche, pour des doses 100 fois plus faibles (0,148 KBq de^{137}CsCl /ml), les animaux ne montrent aucune lésion avec, au contraire, une augmentation des fonctions de reproduction (Nishio *et al.* 1968). Le chien *Beagle* soumis à l'injection intraveineuse de ^{137}CsCl (36 à 140 MBq de Cs /kg de poids corporel) présente une altération de l'épithélium germinal et une azoospermie (absence totale de spermatozoïdes dans le sperme) (Nikula *et al.* 1995). Chez l'Homme, une diminution de la fertilité qui se traduit par une réduction importante du nombre de spermatozoïdes et de leur mobilité est observée sur 9 patients, 1 mois après l'accident de contamination au césium 137 à Goiânia (Brandao-Mello *et al.* 1991).

❖ Effets cancérigènes

Des tumeurs bénignes et malignes sont observées dans plusieurs tissus et organes notamment au niveau du foie et de la cavité nasale suite à l'injection intraveineuse de ^{137}CsCl (allant de 36 à 140 MBq de Cs /kg de poids corporel) chez le chien (Nikula *et al.* 1995). Dans cette étude, on note une augmentation de la fréquence des cancers avec l'âge des animaux. De plus, la non spécificité des cancers observés est probablement due à la répartition plus ou moins uniforme du césium dans l'organisme (Daburon *et al.* 2000).

❖ Autres effets toxiques

Des effets hépatotoxiques du césium ont été rapportés chez l'Homme et l'animal. Une augmentation de l'activité ALAT sérique, signe d'une atteinte hépatique, et des dégénérescences au niveau du foie sont observées respectivement chez le rat et le chien après une exposition à de fortes doses de ^{137}Cs (Nikula *et al.* 1995; Stojadinovic and Jovanovic 1966). Dans ces conditions expérimentales, des affections rénales sont également mises en évidence. Chez l'Homme, une élévation des taux plasmatiques des transaminases ALAT et ASAT est observée chez certains patients après une exposition aiguë au césium 137 (Brandao-Mello *et al.* 1991).

Certaines études provenant pour la plupart des pays de l'Est décrivent l'augmentation des pathologies affectant divers organes dans la population des liquidateurs de Tchernobyl qui sont intervenus pour nettoyer les zones les plus fortement contaminées dans un rayon de 30 km du réacteur endommagé. En effet, des troubles de la minéralisation osseuse pouvant entraîner une ostéoporose, des atteintes du système digestif et du système hépatobiliaire ainsi que des lésions au niveau de la région subcorticale du cerveau ont été rapportés (Kharchenko *et al.* 2001; Rozhinskaia *et al.* 1994; Shkala 1998; Zhavoronkova *et al.* 1996). Cependant, le suivi à long terme de cette population qui a été exposée à de fortes doses de ^{137}Cs ne permet pas de faire un lien direct entre la quantité de ^{137}Cs ingérée et les pathologies observées.

(b) Toxicité après exposition chronique (figure 8)

A cause de la persistance du césium 137 dans l'environnement, les risques d'une contamination chronique sont importants. Les études épidémiologiques sur les populations d'Ukraine, de Biélorussie et de Russie vivant dans les territoires contaminés par le ^{137}Cs suite à l'accident de Tchernobyl, permettent d'aborder les effets d'une exposition chronique à de faibles doses de ^{137}Cs. Lors d'une contamination interne la composante ß du ^{137}Cs participe, pour majorité, à la radiotoxicité. La composante γ croît en fonction de la masse corporelle donc de l'âge.

Les données humaines démontrent qu'une exposition à de faibles quantités de ^{137}Cs conduit à un déficit immunitaire notamment chez l'enfant. Les auteurs établissent une corrélation entre la quantité de ^{137}Cs mesurée chez les enfants vivant dans les territoires contaminés après l'accident de Tchernobyl et un dérèglement du système immunitaire humoral et cellulaire (DeVita *et al.* 2000; Mel'nichenko *et al.* 1999; Titov *et al.* 1995).

Des troubles de la reproduction qui se traduisent par des malformations congénitales et fœtales (duplication des reins et des uretères, polydactylie, défauts du tube neural) sont décrits sur la population de Biélorussie (Lazjuk *et al.* 1997) Une augmentation du cancer du rein, qui constitue l'organe principal d'excrétion du césium, est observée sur la population ukrainienne. Romanenko et al (Romanenko *et al.* 2000a) confirment le lien entre l'exposition à de faibles doses de radiations ionisantes due au ^{137}Cs et le développement de la carcinogenèse rénale. Le ^{137}Cs, à faibles doses, induit également des lésions au niveau de la vessie et provoque des cystites chroniques proliératives (Romanenko *et al.* 2003).

De nombreux autres organes sont les cibles du césium. Certains signes de neurotoxicité ont été mis en évidence dans la population habitant la zone des 150 Km

autour de la centrale de Tchernobyl. Gamache et al établissent un lien entre l'exposition chronique au ^{137}Cs et des modifications au niveau du système nerveux central qui se traduisent par des désordres neurologiques (Gamache *et al.* 2005). Des atteintes cardiaques sont observées chez les enfants. En effet, une étude épidémiologique réalisée sur des enfants de Gomel en Biélorussie (charge en ^{137}Cs allant de 0 à 122 Bq/Kg de poids corporel) indique une augmentation de la fréquence des troubles électrocardiographiques et de l'hypertension artérielle proportionnelle à la charge de ^{137}Cs dans l'organisme (Bandazhevskaya *et al.* 2004).

L'ensemble de ces études, qui rapportent de nombreux effets toxiques du césium en particulier chez les enfants, met en évidence une susceptibilité accrue de cette catégorie de la population face à la contamination au ^{137}Cs. De plus, la fréquence des cancers de la thyroïde, due en partie à l'exposition à l'iode 131, et des troubles de la vision est plus élevée chez l'enfant par rapport à l'adulte (Day *et al.* 1995; Likhtarov *et al.* 2005; Sumner 2007). Cependant l'effet direct du ^{137}Cs sur ces atteintes thyroïdiennes et oculaires n'a pas été clairement démontré.

Jusqu'à présent, très peu d'études expérimentales se sont intéressées aux effets biologiques des faibles doses de ^{137}Cs. Une étude réalisée chez le rat après ingestion chronique de ^{137}Cs contenu dans l'eau de boisson (6500 $Bq.l^{-1}$ soit 150 $Bq.jour^{-1}.rat^{-1}$) indique que le césium est capable de traverser la barrière hémato-encéphalique et se distribue de façon hétérogène dans les structures cérébrales (Lestaevel *et al.* 2006). Dans cette étude, les auteurs mettent en évidence l'effet neurotoxique du césium qui se traduit par des perturbations passagères du cycle veille sommeil et de l'activité électroencéphalographique. En revanche dans ces conditions expérimentales, le césium n'induit pas d'effet sur le comportement (Houpert *et al.* 2007) De plus, chez le rat, l'ingestion chronique de ^{137}Cs n'entraîne pas de modification morphologique ou fonctionnelle de l'épithélium intestinal. (Dublineau *et al.* 2007). Enfin différentes études ont mis en évidence des effets toxiques du césium sur les métabolismes du cholestérol et des hormones stéroïdiennes (Grignard *et al.* 2007; Racine *et al.* 2007; Souidi *et al.* 2006).

Conclusions :

L'exposition à l'uranium ou au césium 137 affecte de nombreuses fonctions physiologiques chez les mammifères. Ils entraînent notamment des modifications de la physiologie du métabolisme osseux. En effet les données animales et humaines démontrent

que l'uranium agit sur la formation et la résorption osseuses après contamination aiguë (Fukuda *et al.* 2006; Guglielmotti *et al.* 1985; Ubios *et al.* 1991) ou chronique (Diaz Sylvester *et al.* 2002; Kurttio *et al.* 2005). Des modifications de l'homéostasie phosphocalcique sont décrites chez l'animal après intoxication aiguë à l'uranium (Carafoli *et al.* 1971; Stefanovic *et al.* 1987). De plus, des troubles de la minéralisation osseuse (Kharchenko *et al.* 2001; Rozhinskaia *et al.* 1994) et de l'homéostasie calcique (Shevchenko *et al.* 1993) sont décrits suite à l'accident de Tchernobyl après une exposition aiguë au ^{137}Cs. Certains métaux lourds, autres que l'uranium, comme le cadmium, le strontium ou le plomb sont capables de modifier le métabolisme de la vitamine D conduisant à une réduction de la minéralisation osseuse (Brzoska and Moniuszko-Jakoniuk 2005a, b; Omdahl and DeLuca 1972; Rosen *et al.* 1980). Malgré ces études, les effets d'une contamination aiguë ou chronique à l'uranium et au césium 137 sur le métabolisme de la vitamine D, hormone essentielle au maintien de l'homéostasie osseuse et minérale de l'organisme, ne sont pas connus.

II. LE METABOLISME DE LA VITAMINE D

Découverte en 1922 par E. McCollum, la vitamine D ou calciférol, est essentielle au contrôle de l'homéostasie des minéraux et du développement osseux. Le terme « vitamine » est en réalité inapproprié. En effet, la synthèse de sa forme active, la 1,25-dihydroxyvitamine D (ou $1,25(OH)_2D$) révèle que ce métabolite est une hormone qui appartient à la grande famille des stéroïdes. La $1,25(OH)_2D$ se lie à son récepteur (VDR, vitamin D recepteur), un facteur de transcription de la famille des récepteurs nucléaires qui contrôle l'expression des gènes cibles de la vitamine D. La synthèse et la dégradation de cette forme active sont étroitement régulées par des hormones et des récepteurs nucléaires activés par des molécules d'origine lipidique.

A. Métabolisme : sources et cytochromes P450 impliqués

La vitamine D subit deux hydroxylations successives dans les cellules hépatiques et rénales conduisant à la synthèse de sa forme hormonale active, la $1,25(OH)_2D$. Sa biosynthèse et sa dégradation sont assurées par des enzymes de type cytochromes P450

(CYPs) (figure 9). Les CYPs sont des hémoprotéines microsomales ou mitochondriales dont l'activité nécessite une source d'électron apportée par la NADP cytochrome P450 réductase si le cytochrome P450 est situé dans le réticulum endoplasmique ou par la ferrédoxine si le cytochrome P450 est situé dans les mitochondries (Gueguen *et al.* 2006a).

1) Sources

La vitamine D possède une double origine : soit exogène par l'alimentation, soit endogène par synthèse cutanée. Dans les aliments d'origine végétale (céréales, levures, champignons), la vitamine D se trouve sous la forme de vitamine D_2 (ou ergocalciférol), alors que dans les aliments d'origine animale (huiles de poisson, poissons gras, jaune d'œuf, aliments lactés enrichis), elle apparaît sous la forme de vitamine D_3 (ou cholécalciférol). 90% de l'apport en vitamine D est assuré par la synthèse cutanée qui produit du cholécalciférol (Holick 2004). En effet, dans la peau, les rayons ultraviolets B (longueurs d'onde entre 290 et 315 nm) réagissent avec un dérivé du cholestérol, le 7-déhydrocholestérol pour produire la pré-vitamine D_3, une molécule instable qui est rapidement isomérisée en vitamine D_3 (Holick 2002). Ainsi les principaux dérivés seront issus de la vitamine D_3 d'origine endogène.

2) La 25-hydroxylation hépatique

La première étape d'activation de la vitamine D_3 se déroule dans le foie. Il s'agit d'une hydroxylation en position 25 qui conduit à la formation de la 25-hydroxyvitamine D_3 ($25(OH)D_3$) et dont la demi vie plasmatique est de 2 à 3 semaines. Cette dernière est appelée « forme de réserve» et reflète le stock en vitamine D. Cette étape est la moins régulée des deux étapes d'activation, c'est-à-dire que plus la quantité de vitamine D_3 synthétisée est importante, plus la quantité de $25(OH)D_3$ produite est grande. Ainsi, l'évaluation du statut vitaminique D est réalisée par le dosage de la 25(OH)D sérique (Souberbielle *et al.* 2006). Plusieurs cytochromes P450 peuvent catalyser cette hydroxylation hépatique. La CYP27A1 mitochondriale qui intervient également dans la synthèse des acides biliaires (Souidi *et al.* 2003) est la première enzyme identifiée pouvant réaliser cette première étape (Dahlback and Wikvall 1988). La CYP2J3 (Yamasaki *et al.* 2004), la CYP3A4 (Gupta *et al.* 2004) et la CYP2R1 (Cheng *et al.* 2003) sont des enzymes situées dans le réticulum endoplasmiques capables d'effectuer également cette hydroxylation. Cependant, Aiba et al (Aiba *et al.* 2006) ont démontré récemment que la CYP2J2 humaine possède une activité plus faible que la CYP2J3, son orthologue chez le rat, et suggèrent que chez l'Homme cette enzyme n'est pas un acteur important du

métabolisme de la vitamine D. De plus, la CYP3A4, qui intervient également dans la détoxification des xénobiotiques, utilise comme seul substrat la vitamine D_2 (Gupta *et al.* 2004). En conséquence, la CYP27A1 et la CYP2R1 apparaissent comme les candidats majeurs à la synthèse de $25(OH)D_3$. Cependant les souris déficientes en CYP27A1 (*cyp27a1*-/-) ont des concentrations de $25(OH)D_3$ sériques normales (Rosen *et al.* 1998). A l'inverse, Cheng et al (Cheng *et al.* 2004) constatent un taux circulant de $25(OH)D_3$ anormalement bas chez les individus porteurs d'une mutation du gène de la CYP2R1 et mettent en évidence le rôle déterminant de cette enzyme. Cependant, en raison de son identification très récente, peu de données sont disponibles sur la CYP2R1.

3) Formation de vitamine D active rénale et extra-rénale

La seconde étape d'activation a lieu essentiellement dans le rein. La $25(OH)D_3$ subit une hydroxylation en position 1 par la CYP27B1 mitochondriale. Cette conversion aboutit à la formation de la 1,25-dihydroxyvitamine D_3 ($1,25(OH)_2D_3$ ou calcitriol) correspondant à la forme biologiquement active de la vitamine D. Sa demi-vie plasmatique est d'environ 4 heures. Cette seconde étape est étroitement régulée dans le rein. Les souris *cyp27b1* -/- développent un rachitisme pseudo-carentiel de type I qui se caractérise par un taux de $1,25(OH)_2D_3$ anormalement bas (Dardenne *et al.* 2001). Dans le néphron, la CYP27B1 est localisée dans les tubules proximaux et distaux, dans la partie corticale et médullaire du tube collecteur et dans l'épithélium papillaire (Zehnder *et al.* 1999). D'autres tissus tels que le placenta, le colon, le cerveau, la prostate, les kératinocytes, les ostéoblastes et les macrophages expriment la CYP27B1 et constituent des sites mineurs de production de $1,25(OH)_2D_3$ (Hewison *et al.* 2000). Dans ces tissus, le cacitriol agit localement selon un mode autocrine ou paracrine. Cette production extra-rénale de $1,25(OH)_2D_3$ contribue significativement au taux circulant en $1,25(OH)_2D_3$ durant la période de gestation ou dans certaines circonstances pathologiques telles que les granulomatoses ou l'insuffisance rénale chronique (Barbour *et al.* 1981; Dusso *et al.* 1990; Gray *et al.* 1979). Les kératinocytes et les cellules du système nerveux central expriment également la 25-hydroxylase et possèdent ainsi l'équipement enzymatique nécessaire à la synthèse de $1,25(OH)_2D_3$ *in situ* à partir de son précurseur (Garcion *et al.* 2002; Lehmann *et al.* 1999).

4) Catabolisme

L'enzyme responsable de l'inactivation de la $1,25(OH)_2D_3$ est la CYP24A1 mitochondriale. Cette enzyme catalyse la conversion de $1,25(OH)_2D_3$ en 1,24,25-trihydroxyvitamine D_3 ($1,24,25(OH)_3D_3$) correspondant à la première étape dans la voie de

dégradation de la vitamine D. Cette voie comprend une série de réactions d'oxydations sur les carbones 23 et 24 et conduit au clivage de la chaîne latérale et à la formation d'un composé inactif, l'acide calcitroïque qui est excrété dans la bile. Chaque étape d'oxydation conduit à une perte progressive de l'activité biologique. Contrairement aux CYP27A1, CYP2R1 et CYP27B1, localisées principalement dans le foie et le rein respectivement, CYP24A1 est exprimée dans tous les organes cibles de la vitamine D (intestin, rein, peau, os, cerveau, macrophage, fibroblaste…) contrôlant ainsi le taux de vitamine D_3 active à l'échelle de l'organisme (Dusso *et al.* 2005). Au sein des cellules cibles, la $1,25(OH)_2D_3$ exerce un rétrocontrôle en stimulant la première étape de sa dégradation. L'étude du phénotype des souris *cyp24a1-/-* indique que ces animaux sont incapables d'inactiver le métabolite actif et meurent prématurément suite à une hypercalcémie secondaire (St-Arnaud 1999). Une autre enzyme la CYP3A4, impliquée dans le métabolisme des xénobiotiques, est également capable de catalyser la 23- et la 24-hydroxylation de la $1,25(OH)_2D_3$ au niveau hépatique et intestinale (Xu et al. 2006).

La CYP24A1 catalyse également la conversion de $25(OH)_2D_3$ en 24,25-dihydroxyvitamine D_3 ($24,25(OH)_2D_3$), un métabolite circulant abondant de la vitamine D qui aurait un rôle dans la croissance, le développement et la réparation des os (St-Arnaud and Glorieux 1998).

B. Régulation du niveau de la vitamine D

Le taux de $1,25(OH)_2D_3$ circulant dépend non seulement de sa synthèse mais également de sa dégradation. Ainsi la régulation du métabolisme de la vitamine D dépend essentiellement des enzymes impliquées dans son métabolisme (CYP27A1, CYP27B1 et CYP24A1).

1) Régulation hormonale et ionique (figure 10)

La parathormone ou hormone parathyroïdienne (PTH), sécrétée par les glandes parathyroïdes, joue un rôle clé dans la régulation du métabolisme de la vitamine D. En effet lors d'une hypocalcémie, la PTH stimule la production de vitamine D active ($1,25(OH)_2D_3$) en exerçant un contrôle positif sur l'enzyme responsable de sa synthèse, la CYP27B1, et un contrôle négatif sur l'enzyme responsable de son inactivation, la CYP24A1, dans le rein. En effet, cette hormone augmente l'activité du promoteur de la CYP27B1 *via* la phosphorylation du facteur de transcription CREB (*cAMP-dependant response element*

binding protein) (Armbrecht *et al.* 2003) et diminue la stabilité des ARNm codant pour la CYP24A1 (Zierold *et al.* 2003). Le retour à une calcémie normale ramène la sécrétion de PTH à son niveau basal. Le contrôle de la CYP27B1 ne passe pas exclusivement par la PTH, mais aussi par une action locale des ions calcium et phosphates (Bland *et al.* 1999; Hughes *et al.* 1975). Les apports en phosphates modulent également l'activité et l'expression de la CYP24A1 de manière opposée à leur effet sur la CYP27B1 (Wu *et al.* 1996). Cependant les mécanismes d'action moléculaires précis ne sont pas connus à ce jour. La $1,25(OH)_2D_3$ exerce un contrôle sur sa propre synthèse en inhibant la transcription de la CYP27B1 rénale (Murayama *et al.* 2004) et de la CYP27A1 hépatique (Theodoropoulos *et al.* 2003) ainsi que sur son propre catabolisme en stimulant la transcription de la CYP24A1 (Chen and DeLuca 1995). L'action de l'hormone sur la CYP27B1 et sur la CYP24A1 s'effectue par l'intermédiaire du récepteur de la vitamine D, VDR (Vitamin D Receptor) et sera développé ci-dessous. Récemment, Tsujikawa et al suggèrent que l'effet inhibiteur de la $1,25(OH)_2D_3$ sur la CYP27B1 rénale pourrait également s'effectuer par un autre mécanisme impliquant une ß-glycosidase, la protéine KLOTHO (Tsujikawa *et al.* 2003).

Lors d'une hypercalcémie, la calcitonine, hormone hypocalcémiante sécrétée par les cellules parafolliculaires C de la glande thyroïde, diminue les concentrations circulantes en $1,25(OH)_2D_3$ en stimulant l'expression du gène codant la CYP24A1 rénale *via* la voie de signalisation Ras-PKC zêta (protéine kinase C d'isoforme zêta) (Gao *et al.* 2004). Dans des conditions de calcémie normale, Shinki et al (Shinki *et al.* 1999) rapportent que la calcitonine pourrait jouer un rôle dans le maintien d'une concentration normale en $1,25(OH)_2D_3$ en stimulant la transcription de la CYP27B1 rénale.

2) Régulation par les récepteurs nucléaires (figure 10)

Les enzymes impliquées dans le métabolisme de la vitamine D sont régulées à l'étape transcriptionnelle par des récepteurs nucléaires. Ces derniers sont des facteurs de transcription activés par des molécules lipophiles telles les stéroïdes, les acides gras, les acides biliaires et les oxystérols. Les récepteurs nucléaires ainsi activés se lient à l'ADN dans les séquences régulatrices des gènes codant les CYPs et modulent leur expression. Dans le foie, la CYP27A1, impliquée dans la formation de la $25(OH)D_3$, est régulée par PPAR α et γ (*peroxisome proliferator activated receptor*), dont les ligands sont des acides gras poly-insaturés (Post *et al.* 2001; Quinn *et al.* 2005), HNF4α (*hepatocyte nuclear factor*) activé par des phosphorylations (Chen and Chiang 2003), LXR (liver X receptor) dont les ligands sont des oxystérols (Crestani *et al.* 2004) et SHP (*small heterodimeric partner*) qui a une activité de répression transcriptionnelle (Eloranta and Kullak-Ublick 2005). De plus HNF1α, un

facteur de transcription hépatique n'appartenant pas à la famille des récepteurs nucléaires, agit positivement sur la transcription de la CYP27A1 (Rao *et al.* 1999).

Le régulateur principal de la CYP24A1, responsable de l'inactivation de la vitamine D, est le récepteur « classique » de la vitamine D, VDR (*vitamin D receptor*) qui appartient à la superfamille des récepteurs nucléaires. La $1,25(OH)_2D_3$ stimule la transcription de CYP24A1 *via* sa fixation sur l'hétérodimère formé par VDR et RXR (*retinoic X receptor*), le récepteur de l'acide rétinoïque 9-cis, qui reconnaît des séquences spécifiques (séquences VDRE, vitamin D response element) dans le promoteur du gène (Chen and DeLuca 1995). A l'inverse, Murayama et al (Murayama *et al.* 2004) rapportent récemment que VDR aurait un rôle inhibiteur sur l'expression rénale de la CYP27B1 responsable de la production de vitamine D active. Cette répression résulterait de la liaison de l'hétérodimère VDR/RXR à un facteur de transcription de type bHLH (protéine « basique hélice boucle hélice ») capable d'interagir avec un motif consensus appelé « boîte E » présent dans le promoteur de la CYP27B1. A travers l'action de VDR, la $1,25(OH)_2D_3$ peut ainsi exercer un contrôle sur sa propre synthèse et son propre catabolisme.

Enfin, deux autres récepteurs nucléaires, PXR (*pregnane X receptor*) et CAR (*constitutive androstane receptor*), impliqués dans la régulation des enzymes du métabolisme des xénobiotiques et des médicaments, peuvent stimuler la transcription de la CYP24A1 grâce à leur interaction avec les séquences VDRE (Moreau *et al.* 2007; Pascussi *et al.* 2005). Ainsi la prise prolongée de médicaments anti-épileptiques ou anti-convulsifs (phenobarbital, carbamazepine, etc.) qui sont des activateurs de PXR ou CAR peuvent conduire à une augmentation de la CYP24A1 et provoquer une dégradation incontrôlée de la $1,25(OH)_2D_3$.

3) Régulation par d'autres facteurs (figure 10)

D'autres facteurs interviennent dans la régulation du métabolisme de la vitamine D. L'IGF-I (*insulin-like growth factor -I*) qui est un facteur de croissance sécrété majoritairement par le foie, augmente la production de calcitriol en stimulant l'activité de la CYP27B1 rénale (Nesbitt and Drezner 1993). A l'inverse, le facteur phosphaturiant FGF23 (*fibroblast growth factor 23*) réduit le taux de calcitriol circulant en inhibant et en stimulant l'expression de la CYP27B1 et de la CYP24A1 rénale, respectivement (Shimada *et al.* 2004). Enfin, l'insuline (Wongsurawat and Armbrecht 1985) et les œstrogènes (Pike *et al.* 1978) sont également capables d'agir de façon indirecte sur la production de $1,25(OH)_2D_3$.

C. Transport de la vitamine D.

Comme toutes les hormones stéroïdes, les métabolites de la vitamine D_3 sont des composés lipophiles qui circulent liés à une protéine plasmatique. La DBP (*vitamin D binding protein*), sécrétée majoritairement par le foie, est la principale protéine chargée du transport de ces métabolites. Cette protéine est secrétée en très large excès par rapport aux métabolites circulants de la vitamine D permettant à la grande majorité des composés de former un complexe avec la DBP (White and Cooke 2000). Ainsi, la $25(OH)D_3$ produite dans le foie est prise en charge par la DBP afin d'être véhiculée jusqu'au rein. L'ensemble $25(OH)D_3$-DBP est reconnu par un récepteur appelé mégaline situé sur la bordure en brosse des cellules tubulaires proximales qui permet l'internalisation du complexe par endocytose. La cubiline, une autre glycoprotéine présente à la surface des cellules, agit comme un capteur des complexes $25(OH)D_3$-DBP et facilite l'internalisation du complexe par la mégaline (figure 11). Les souris dont le gène de la mégaline a été invalidé et les chiens ou les humains porteurs de mutations du gène de la cubiline, souffrent d'une déficience en vitamine D due à une excrétion urinaire anormale de $25(OH)D_3$ et de DBP (Nykjaer *et al.* 1999; Nykjaer *et al.* 2001), suggérant que cette voie d'endocytose joue un rôle majeur dans le transport de la $25(OH)D_3$. Cependant les animaux ayant un défaut du gène codant la mégaline maintiennent spontanément un niveau de $1,25(OH)_2D_3$ suffisant pour ne pas développer de rachitisme ou d'hyperparathyroïdie secondaire en cas d'apport normal de vitamine D, suggérant une entrée normale de $25(OH)D_3$ (Leheste *et al.* 2003). Ces résultats révèlent l'existence d'autres voies d'entrée de la $25(OH)D_3$ dans la cellule rénale.

Une fois internalisée, la protéine de transport est dégradée dans les lysosomes et la $25(OH)D_3$ est libérée dans le cytosol. La $25(OH)D_3$ s'associe alors à une IDBP (*intracellular vitamin D binding protein*), molécule appartenant à la famille des Heat Shock Proteins, qui facilite son acheminement vers la mitochondrie et y subit une hydroxylation en position 1 par la CYP27B1 (Adams *et al.* 2003). La $1,25(OH)_2D_3$ produite est libérée dans liquide interstitiel pour se complexer à son tour avec une DBP.

D. Rôles physiologiques de la vitamine D

La fonction principale de la vitamine D est le maintien de l'homéostasie phosphocalcique. Les données récentes mettent en évidence également un rôle dans l'immunité, la différenciation cellulaire, la prolifération et la neuroprotection.

1) Mode d'action (figure 12)

(a) Mécanisme d'action génomique

La vitamine D agit par le biais d'un récepteur intracellulaire apparenté aux autres récepteurs de stéroïdes, VDR (*vitamin D receptor*) (Haussler *et al.* 1998). Ce dernier est présent dans les tissus impliqués dans le maintien de l'homéostasie minérale tels que l'intestin, l'os, le rein et les glandes parathyroïdes mais également dans de nombreux autres tissus tels que le cerveau, le cœur, la peau, le pancréas, les lymphocytes T et B etc. VDR est un facteur de transcription activé par la fixation de la $1,25(OH)_2D_3$ qui contrôle l'expression de gènes en s'hérérodimérisant avec RXR (*retinoic X receptor)* et en s'associant spécifiquement à des séquences d'ADN présentes dans le promoteur de ces gènes.

❖ Structure du récepteur nucléaire de la vitamine D (figure 13)

Le gène codant pour le VDR humain est constitué de 9 exons et est situé sur le chromosome 12q14. La structure de VDR est comparable à celle de tous les récepteurs nucléaires et comprend deux domaines indépendants : un domaine de liaison à l'ADN et un domaine de liaison au ligand. Le domaine de liaison à l'ADN qui est situé du côté N-terminal de la protéine est une région très conservée entre toutes les protéines appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires. Il contient deux motifs en doigts de Zinc responsables de l'interaction avec les séquences spécifiques présentes dans les promoteurs des gènes cibles de la vitamine D appelées VDRE (*vitamin D response element)*. Ce domaine contient également une séquence de 5 acides aminés basiques, située entre les deux motifs en doigts de Zinc et impliquée dans la localisation nucléaire de VDR (Hsieh *et al.* 1998). Le domaine de liaison au ligand est situé du côté C-terminal de la protéine. Sa structure tridimensionnelle indique qu'il contient 12 hélices alpha et plusieurs brins beta formant une poche hydrophobe de fixation de l'hormone (Rochel *et al.* 2000). Ce domaine est non seulement responsable de la fixation de la $1,25(OH)_2D_3$ sur le récepteur mais permet également l'hétérodimérisation avec RXR et la transactivation dépendante du ligand. Cette dernière fonction est assurée par le domaine AF-2 d'activation de la transcription porté par l'hélice H 12 localisée à l'extrémité de la protéine (Rochel *et al.* 2000).

❖ Liaison du ligand

La liaison de la $1,25(OH)_2D_3$ à son récepteur cytosolique induit la translocation de VDR au noyau mais cette migration peut se faire indépendamment du ligand. Bien que VDR lié ou non à son ligand soit une protéine principalement nucléaire (Berger *et al.* 1988;

Walters *et al.* 1980), les études montrent que la translocation nucléaire de VDR qui est dépendante du ligand est impliquée dans le processus d'activation du récepteur (Racz and Barsony 1999). De plus Racz et al (Racz and Barsony 1999) démontrent par l'utilisation d'une protéine de fusion GFP-VDR et d'un mutant de délétion dépourvu de la région AF-2 que cette région est impliquée dans la transclocation nucléaire dépendante du ligand.

❖ Hétérodimérisation avec RXR

Le couple récepteur-ligand pénètre dans le noyau où il forme un héterodimère avec RXR ; dont le ligand est l'acide rétinoïque 9-cis. En absence de ligand, RXR est capable de s'homodimériser et de former des tétramères. Ces derniers ne sont pas actifs mais peuvent rapidement se dissocier après liaison du ligand (Kersten *et al.* 1998). L'utilisation de multiples mutants de délétion de VDR indique que les régions impliquées dans la dimérisation avec RXR sont localisées dans le premier motif en doigt de zinc, dans l'extrémité C-terminale du deuxième motif et dans le domaine de liaison au ligand (Nishikawa *et al.* 1995).

❖ Transactivation ou transrepression des gènes cibles

L'héterodimère VDR-RXR se fixe sur des séquences d'ADN particulières appelées « Vitamin D responsive element » (VDRE) localisées dans le promoteur des gènes cibles de la vitamine D tels que ceux codant l'ostéocalcine ou la CYP24A1, comme décrit ci-dessus (voir liste des gènes figure 14). Les VDREs correspondent à des DR3, c'est-à-dire deux séquences hexanucléotidiques identiques, de séquence consensus AGGTCA, séparées par un segment de 3 nucléotides non conservés. Sur ces éléments de réponse, VDR occupe le demi-site 3' et le partenaire RXR occupe le demi-site 5' (Haussler *et al.* 1998). D'autre part, l'interaction de VDR avec des molécules co-activatrives est une étape critique dans l'induction de la transcription des gènes cibles de la vitamine D. En effet, la liaison de la $1,25(OH)_2D_3$ à son récepteur conduit à un repositionnement de l'hélice H12 qui contient le domaine AF-2 et va créer une interface pour la liaison de protéines co-activatrices (Masuyama *et al.* 1997). Ainsi, ces co-activateurs, parmi lesquels on peut citer les protéines DRIP (*vitamin D receptor interacting proteins*), CBP/P300 (*CREB binding protein*), SRC-1 (*steroid receptor co-activator 1*) et NCoA-62 (*Nuclear coactivator-62*) (MacDonald *et al.* 2001), sont capables de remodeler la chromatine par leur activité histone acétyltransférase et ainsi permettre la liaison et l'assemblage de la machinerie transcriptionnelle générale.

De manière intéressante, une étude réalisée *in vitro* montre que l'interaction de VDR avec ses co-activateurs entraîne la formation d'homodimères stables de VDR fixés non

seulement sur des séquences d'ADN de type DR3 mais également sur des séquences d'ADN de type DR4 et DR5 et en augmente l'activité transactivatrice (Takeshita *et al.* 2000). Cependant l'importance du rôle des homodimères de VDR dans la transactivation des gènes cibles de la vitamine D reste à élucider.

A l'inverse, VDR peut réprimer la transcription de certains gènes tels que ceux codant la PTH ou l'ostéocalcine murine. Les mécanismes gouvernant cette répression transcriptionnelle sont moins bien connus mais semblent impliquer des co-répresseurs, tels que N-CoR (Nuclear receptor co-repressor) et Alien, dont le rôle est de rendre les sites de fixation inaccessibles pour le complexe de transcription en recrutant des histones désacétylases (HDAC) (Herdick and Carlberg 2000; Polly *et al.* 2000). Les séquences VDRE de la PTH et de l'ostéocalcine de souris sont similaires aux séquences de type DR3 localisées dans les promoteurs des gènes dont la transcription est contrôlée positivement par VDR. Seules deux bases dans l'un ou l'autre des demi-sites de la séquence VDRE diffèrent de la séquence consensus VDRE positive. D'après Haussler et al (Haussler *et al.* 1998), la polarité de fixation de l'hétérdimère VDR-RXR serait inversée et VDR occuperait le demi-site 5' quand le gène est contrôlé négativement. Un tel mécanisme a déjà été décrit pour le récepteur de l'acide rétinoïque RAR (*retinoid acid receptor*) qui forme également un héterodimère avec RXR. Une autre possibilité est que la substitution des 2 bases modifie la structure tertiaire de VDR empêchant le recrutement de co-activateur et favorisant la liaison aux co-répresseurs.

Le taux intracellulaire de VDR est un paramètre important dans la réponse biologique de la vitamine D. Dans le rein, l'expression de VDR est stimulée par la $1,25(OH)_2D_3$ et inhibée par la PTH (Costa and Feldman 1986; Healy *et al.* 2005). Dans l'intestin, une étude montre que les estrogènes régulent positivement l'expression du récepteur (Liel *et al.* 1999). De plus, la capacité transcriptionnelle de VDR est modulée par l'état de phosphorylation du récepteur. Par exemple la phosphorylation de VDR sur la sérine 182 par la protéine kinase A (PKA) diminue son activité transcriptionnelle en empêchant l'héterodimérisation avec RXR (Hsieh *et al.* 2004). De la même manière, sa phosphorylation sur la sérine en position 51 par la protéine kinase C - beta (PKC-β) inhibe son activité en bloquant sa translocation nucléaire (Hsieh *et al.* 1993). A l'inverse, la caséine kinase II (CK-II) stimule l'activité du récepteur en phosphorylant la serine 208 qui favorise le recrutement de molécules co-activatrices (Jurutka *et al.* 1996). Enfin, la réponse biologique de la vitamine D est influencée également par la disponibilité et l'état d'activation des co-facteurs nucléaires (Dusso *et al.* 2005).

(b) Réponse rapide via un récepteur membranaire

La 1,25$(OH)_2D_3$ peut induire des réponses rapides comme la stimulation rapide de l'absorption intestinale du calcium, la sécrétion d'insuline par les cellules béta du pancréas, l'ouverture des canaux chlore et calcium voltage-dépendants dans les ostéoblastes, l'activation des protéines MAP Kinases (*Mitogen-Activated Protein Kinases*), la modification de la distribution intracellulaire de calcium et de phosphates, la production des prostaglandines, l'activation de la protéine kinase C et la modification du métabolisme des phospho-inositides (Norman *et al.* 2002). Ces actions se réalisent en quelques secondes ou quelques minutes et ne sont pas inhibées par les inhibiteurs de transcription ou de traduction, contrairement aux mécanismes génomiques décrits précédemment qui peuvent prendre plusieurs heures, voire plusieurs jours.

Comme pour d'autres hormones stéroïdes, l'existence d'un récepteur membranaire responsable d'effets rapides non génomiques est suspectée. Cependant le rôle de cette réponse rapide et la nature exacte de ce récepteur sont encore mal connus.

Au cours de ces dernières années, plusieurs candidats tels que l'annexine II (Baran *et al.* 2000), la protéine kinase C (Slater *et al.* 1995) et la protéine 1,25$(OH)_2D_3$ –MARRS (*membrane-associated rapid response steroid*) (Farach-Carson and Nemere 2003), capables de lier 1,25$(OH)_2D_3$, ont été proposés pour jouer le rôle de récepteur membranaire. Cependant, plusieurs études montrent que l'action rapide de la 1,25$(OH)_2D_3$ nécessite la présence d'un VDR fonctionnel. En effet, l'altération de cette réponse chez les souris VDR-/- suggère que VDR lui-même est capable de générer la voie rapide (Erben *et al.* 2002). De la même manière, une étude réalisée sur des fibroblastes en culture issus de patients atteints de rachitisme vitamino-dépendant du à des mutations du gène codant VDR indique que ces effets rapides requièrent la présence de VDR (Nguyen *et al.* 2004). De plus, dans cette étude, les auteurs démontrent que le résidu lysine, en position 45 présent dans le motif KGFFRR du domaine de liaison à l'ADN, joue un rôle majeur dans l'induction de la réponse rapide. Ainsi, Norman A.W. et al (Norman 2006) ont proposé l'existence d'un VDR classique associé aux cavéoles de la membrane plasmique (micro-domaines invaginés de la membrane plasmique enrichis en cholestérol et en sphingolipides).

La voie cellulaire directe de la 1,25$(OH)_2D_3$ joue un rôle dans la régulation de son propre catabolisme en stimulant la transcription de CYP24A1 et de la ferrédoxine associée via la modification de la distribution intracellulaire de calcium ou via la voie de signalisation MEK 1/2 (*mitogen extracellular signal kinase 1/2*) et intervient dans les processus de

différenciation et de prolifération cellulaire via l'activation des MAP kinases (Nguyen *et al.* 2004; Norman *et al.* 2002).

2) Action sur l'homéostasie minérale (figure 14)

Le rôle le plus important et le mieux connu de la $1,25(OH)_2D_3$ est le maintien de l'homéostasie phosphocalcique par l'augmentation de l'absorption intestinale et rénale du calcium et du phosphate et la promotion de la minéralisation osseuse.

La $1,25(OH)_2D_3$ facilite l'absorption intestinale active du calcium alimentaire en particulier au niveau du duodénum. En effet, elle favorise l'entrée du calcium à travers la bordure en brosse de l'entérocyte en augmentant la synthèse des transporteurs de calcium ECaCs, (Epithelial ca2+ channels), en particulier celle de ECaC2 qui est exprimée majoritairement au niveau intestinale et dans une moindre mesure celle de ECaC1 (den Dekker *et al.* 2003). De la même manière, elle stimule la synthèse de la calbindine D9K (CaBP-D9K), une protéine de liaison du calcium qui permet son passage à travers le cytosol du pôle apical au pôle basal (Darwish and DeLuca 1992). La $1,25(OH)_2D_3$ *via* son VDR régule directement la transcription de *ECaC2* et de *CaBP-D9K* grâce à la présence de séquences VDRE situées dans la région promotrice des gènes. Enfin, des études indiquent que le calcitriol facilite la sortie du calcium au niveau de la membrane basolatérale entérocytaire contre un gradient électrochimique en augmentant la synthèse de la pompe à calcium – ATPase (PMCA1b) (Armbrecht *et al.* 1999; Zelinski *et al.* 1991). En revanche les auteurs n'ont pas identifié de VDRE classique dans les séquences régulatrices du gène *pmca1b*. L'augmentation de l'absorption intestinale des phosphates alimentaires par la $1,25(OH)_2D_3$ s'effectue principalement au niveau du jéjunum et de l'iléon et se traduit par une stimulation de la synthèse des co-transporteurs sodium phosphate (Xu *et al.* 2002; Yagci *et al.* 1992). Cependant les mécanismes précis ne sont pas connus.

Dans le rein, le calcitriol accélère la réabsorption tubulaire du calcium par un mécanisme dépendant de la PTH (Friedman and Gesek 1993). Elle peut agir de façon directe en augmentant la synthèse des transporteurs de calcium rénaux notamment celle de ECaC1 (Hoenderop *et al.* 2001), de CaBP-D28K (Gill and Christakos 1993), de PMCA1b (Glendenning *et al.* 2000) et de l'échangeur Na^+/Ca^{2+} (NCX1) (Hoenderop *et al.* 2002). Son effet stimulateur sur la réabsorption tubulaire des phosphates est secondaire et est due à son action inhibitrice sur la sécrétion de la PTH (Kim *et al.* 2007) qui, elle, inhibe la réabsorption de phosphate.

Le calcitriol régule la formation, la croissance et la minéralisation de l'os. Il stimule l'expression de gènes ostéoblastiques codant pour des protéines matricielles tels que l'ostéopontine et l'ostéocalcine (Lian *et al.* 2001; Noda *et al.* 1990) qui contiennent des séquences VDRE dans leur promoteur. A l'inverse, en réponse à une hypocalcémie, le calcitriol active de façon directe la résorption osseuse en favorisant la différenciation et l'activation des cellules souches mésenchymateuses de l'os en ostéoclastes. En effet, la $1,25(OH)_2D_3$ stimule l'expression de RANKL (Receptor Activator of Nuclear factor-KB Ligand) par les ostéoblastes, ce qui induit une augmentation de la différenciation et de la maturation des ostéoclastes (Kitazawa *et al.* 2003).

3) Autres fonctions (figure 14)

A côté de son rôle bien établi dans la régulation de l'homéostasie phosphocalcique, la vitamine D possède d'autres fonctions physiologiques. La $1,25(OH)_2D_3$ inhibe la prolifération et favorise la différenciation de divers cellules normales (cellules de l'épiderme, entérocytes, monocytes/macrophages etc.) ou tumorales (cellules tumorales de colon, de prostate, de peau etc.) exprimant le récepteur de la vitamine D. Elle agit par exemple en stimulant la synthèse des protéines p21 et p27 (inhibiteurs de kinases dépendantes des cyclines) qui bloquent la progression du cycle cellulaire en phase G1 (Hager *et al.* 2004; Li *et al.* 2004), ou en modulant la production de protéines pro (Bax) et anti-apoptotiques (Bcl2) (Wagner *et al.* 2003). De plus, elle module la réponse immunitaire et joue un rôle immunosuppresseur en agissant notamment sur les cellules présentatrices d'antigènes et les lymphocytes T activés qui expriment VDR. D'une part, la $1,25(OH)_2D_3$ inhibe la différenciation et la maturation des cellules dendritiques. D'autre part, elle inhibe la capacité de ces cellules à activer les lymphocytes T en diminuant l'expression des molécules HLA de classe II, de l'interleukine 12, cytokine impliquée dans la différenciation des lymphocytes CD4+ de type Th1 et des molécule costimulatrices qui délivrent des signaux essentiels à l'activation des lymphocytes T naïfs (van Etten and Mathieu 2005). Plus récemment, certaines données expérimentales mettent en évidence un rôle neuroprotecteur du calcitriol. Cette action résulte de sa capacité à moduler l'expression de facteurs neurotrophiques (NGF, *nerve growth factor*, NT-3, *neurotrophine 3*, NT-4 *neurotrophine 4*, GDNF, *Glial cell line-derived neurotrophic factor*) (Garcion *et al.* 2002; Neveu *et al.* 1994). Elle agit également sur l'homéostasie calcique intra-neuronale en inhibant la synthèse de canaux calciques voltage dépendants de type L (L-VSCC) et induisant celle de la parvalbumine, protéine cytoplasmique liant le calcium (Brewer *et al.* 2001; de Viragh *et al.* 1989).

La découverte de ces nouvelles fonctions a initié de nombreuses études concernant l'utilisation du $1,25(OH)_2D_3$ ou de ces analogues moins hypercalcémiants comme agent prévenant ou retardant la survenue de certaines maladies auto-immunes (diabètes de types 1), proliférative (cancers solides, leucémie, psoriasis) ou neurodégénératives (maladie de Parkinson) (Adorini 2002; Holick 1995; Sanchez *et al.* 2002).

E. Pathologies : les conséquences d'une carence ou d'un excès de vitamine D.

Une perturbation du système endocrinien de la vitamine D peut provoquer des pathologies osseuses caractérisées par des anomalies de minéralisation, le rachitisme chez l'enfant ou l'ostéomalacie chez l'adulte (Garabedian *et al.* 2005; Kraenzlin 2003).

1) La carence en vitamine D

Le rachitisme et l'ostéomalacie sont souvent le résultat d'une carence en vitamine D due à une malnutrition ou à une exposition solaire insuffisante. Un déficit en vitamine D entraîne une diminution de l'absorption intestinale du calcium et une tendance hypocalcémique, elle-même compensée par une élévation de PTH, appelée hyperparathyroïdie secondaire. Cette hyperparathyroïdie va stimuler le remodelage osseux et stimuler la CYP27B1 rénale permettant de maintenir la concentration de $1,25(OH)_2D_3$ à un niveau stable. Par conséquent, l'insuffisance en vitamine D se caractérise par des concentrations sériques de $25(OH)D_3$ généralement basses, des concentrations de $1,25(OH)_2D_3$ hautes, normales ou basses et peut entraîner une hypersécrétion de PTH. Dans ce cas, la mesure de la $1,25(OH)_2D_3$ n'est donc pas appropriée. L'évaluation d'une insuffisance en vitamine D s'effectue par le dosage de la $25(OH)D_3$ qui reflète le stock de vitamine D de l'organisme. Les études montrent que la concentration de $25(OH)D_3$ au dessous de laquelle la PTH commence à s'élever se situe entre 50 et 100 nmol/l (20 et 40 ng/ml). Ainsi la valeur seuil de $25(OH)D_3$ définissant l'insuffisance en vitamine D (c'est-à-dire la concentration minimale qu'il faut avoir) a été fixée à 75 nmol/l (30 ng/ml) (Cormier 2006). En France, une étude épidémiologique réalisée sur 1569 adultes en bonne santé révèle que 14 % des sujets présentent une insuffisance en vitamine D ($25(OH)D \leq 12$ ng/ml) (Chapuy *et al.* 1997). L'élévation de PTH a pour but de mobiliser le calcium osseux en augmentant l'activité de résorption des ostéoclastes et a pour conséquence l'augmentation de l'excrétion urinaire des phosphates (en diminuant la réabsorption proximale). A terme, des quantités trop faibles de calcium et/ou de phosphates dans la matrice osseuse

conduisent à un défaut de minéralisation et peuvent aboutir à l'apparition du rachitisme chez l'enfant et l'ostéomalacie chez l'adulte.

Le rachitisme est souvent associé à des déformations des membres inférieurs alors que l'ostéomalacie peut se traduire par une myasthénie, une tétanie, des douleurs osseuses diffuses et des fractures. Chez la personne âgée, une exposition solaire insuffisante, une diminution de la capacité de la peau à produire de la vitamine D et des fonctions rénales diminuées peuvent être à l'origine d'une carence en vitamine D qui constitue un terrain favorable à l'ostéoporose (Kraenzlin 2003). Cette dernière se caractérise par une masse minérale basse et des altérations de la microarchitecture osseuse, qui a pour conséquence une augmentation du risque de fracture (Breuil and Euller-Ziegler 2004). Cette pathologie touche 200 millions de femmes dans le monde (1/3 des femmes de 60 à 70 ans et 2/3 des femmes de plus de 80 ans) (Reginster 2005).

L'ostéomalacie peut avoir des origines diverses. La carence en vitamine D (solaire et/ou alimentaire) en est la cause la plus fréquente. Cependant une malabsorption digestive (maladie cœliaque, maladie de Crohn, insuffisance pancréatique…), un défaut hépatique (cirrhose avancée) ou encore un défaut rénal (insuffisance rénale chronique) peuvent conduire à l'apparition de la pathologie (Maugars *et al.* 2000). Les hépatopathies peuvent entraîner une ostéomalacie par déficit de la 25-hydroxylation hépatique et s'accompagnent donc d'un taux de $25(OH)D_3$ fortement diminué. Les patients atteints d'insuffisance rénale chronique présentent une baisse de la production rénale de $1,25(OH)_2D_3$ en raison de la réduction de la masse rénale fonctionnelle. De plus, l'activité de la CYP27B1 rénale est inhibée par l'urémie et l'hyperphosphatémie associée (Nenciu and Delorme 2005). Ainsi, chez les patients atteints d'insuffisance rénale chronique, où les concentrations sériques de $1,25(OH)D_3$ sont basses, le dosage de la forme active de la vitamine D se justifie.

2) L'intoxication à la vitamine D

A l'inverse, un apport excessif (intoxication) de vitamine D peut entraîner une hypervitaminose et provoquer une hypercalcémie par augmentation de l'absorption intestinale et de la résorption osseuse. Cette hypercalcémie peut conduire à des atteintes rénales (lithiases et néphrocalcinoses) (Souberbielle *et al.* 2006). Les cas d'hypervitaminose sont très rares en dehors de pathologies caractérisées par une production non contrôlée de $1,25(OH)_2D_3$ comme les granulomatoses. Dans ce cas, une production excessive de calcitriol est réalisée par les macrophages en réponse à l'interféron gamma (Vidal *et al.* 2002).

3) Les maladies héréditaires

Il existe également des maladies héréditaires du métabolisme de la vitamine D à transmission autosomique récessive.

(a) Rachitisme pseudo-carentiel de type I

Le rachitisme pseudo-carentiel de type I (ou PDDR, *pseudovitamin D deficieny rickets*) résulte d'une anomalie de l'expression du gène codant CYP27B1 (Kato *et al.* 2002). De nombreux types de mutations présentes dans chacun des 9 exons du gène de la CYP27B1 ont été identifiés chez les patients porteurs de la maladie. Des délétions, des duplications, modifiant le cadre de lecture, et des mutations ponctuelles, affectant la séquence la protéine, l'épissage ou conduisant à l'arrêt prématuré de la traduction ont été mises en évidence (St-Arnaud *et al.* 2001). Les patients porteurs de cette maladie présentent les symptômes classiques d'individus atteints de rachitisme dû à une carence en vitamine D, à savoir une croissance ralentie, une fatigabilité musculaire pseudomyopathique, une hypoplasie de l'émail dentaire et des signes radiologiques intenses (Dumas 1999). En revanche, ils présentent un taux normal de $25(OH)D_3$, contrairement aux individus carencés en vitamine D. Le diagnostic du rachitisme pseudo-carentiel de type I repose sur un taux effondré de $1,25(OH)_2D_3$. Le traitement de cette maladie consiste en l'administration de $1,25(OH)_2D_3$ pendant toute la vie de l'individu, accompagnée d'un apport en calcium suffisant au début du traitement afin de permettre une bonne guérison des lésions osseuses.

(b) Rachitisme pseudo-carentiel de type II

Le rachitisme pseudo-carentiel de type II (ou HVDRR, *hereditary vitamin D resistant rickets*) résulte d'une anomalie de l'expression du gène codant VDR (Kato *et al.* 2002). Il se caractérise donc par une résistance des organes cibles à l'action de $1,25(OH)_2D_3$ dont le taux est normal ou élevé. De nombreuses mutations du gène codant VDR ont été rapportées. La majorité d'entre elles porte sur le domaine de liaison à l'ADN du récepteur, entraînant des mutations ponctuelles dans les structures en doigts de zinc. Dans ce cas, VDR ne peut plus fixer les séquences VDRE présentes dans le promoteur des gènes cibles. Les mutations peuvent porter sur le domaine de liaison au ligand et aboutissent à des récepteurs incapables de fixer la $1,25(OH)_2D_3$. Une mutation ponctuelle empêchant l'hétérodimérisation de VDR avec RXR a été également mise en évidence dans la partie C-terminale du récepteur (Kato *et al.* 2002). Ce rachitisme pseudo-carentiel de type II se manifeste par un tableau de rachitisme sévère et précoce, associé à une alopécie dans 80 %

des cas (Dumas 1999). Le traitement consiste en l'administration de doses massives de tous les dérivés de la vitamine D et de calcium.

(c) Autre cas de rachitisme héréditaire

Le rachitisme hypophosphatémique de transmission dominante liée à l'X est la cause la plus fréquente des rachitismes héréditaires et concerne un enfant sur 20 000. Cependant cette maladie n'implique pas directement une anomalie du métabolisme de la la vitamine D mais résulte d'une altération du gène *PHEX* (*phosphate regulating gene with homologies to endopeptidases on the X chromosome*). Cette maladie se caractérise par une hypophosphatémie sévère due à une anomalie de la réabsorption tubulaire proximale des phosphates. Le traitement associe du phosphate avec des dérivés de la vitamine D (Dumas 1999).

III. CONCLUSIONS ET PROBLEMATIQUE

Certaines données récentes suggèrent qu'une contamination à l'uranium pourrait perturber le métabolisme de la vitamine D. En effet des modifications des taux plasmatiques de l'hormone parathyroïdienne (PTH), régulateur important du métabolisme de la vitamine D, et de l'ostéocalcine, protéine non collagénique de l'os dont la synthèse est stimulée par la vitamine D, sont rapportées *in vivo* après contamination aiguë ou chronique (Fukuda *et al.* 2006; Kurttio *et al.* 2005; Stefanovic *et al.* 1987). De plus, la toxicité chimique et radiologique de l'uranium a été démontrée au niveau du foie, du rein et du cerveau qui sont les organes clés du métabolisme de la vitamine D. Au niveau moléculaire, l'uranium a pour cible les cytochromes P450 (CYPs) qui constituent une superfamille d'enzymes impliquées dans le métabolisme des substances exogènes et endogènes dont celui de la vitamine D. En effet, l'uranium module l'activité ainsi que l'expression génique et protéique des CYPs hépatiques impliquées dans les métabolismes de la testostérone, des xénobiotiques et du cholestérol (Gueguen *et al.* 2006b; Moon *et al.* 2003; Pasanen *et al.* 1995). De plus, il a été mis en évidence très récemment dans le laboratoire une augmentation de l'expression des principaux CYPs impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques dans le foie, le rein, le cerveau et les poumons chez le rat après 9 mois de contamination chronique à l'UA. Cette stimulation serait due à une

surexpression des récepteurs nucléaires responsables de leur régulation (Souidi *et al.* 2005). Les CYPs sont également des cibles du césium 137 qui a une toxicité essentiellement radiologique. Une contamination chronique au ^{137}Cs stimule l'activité de la CYP27A1 (Souidi *et al.* 2006) impliquée non seulement dans le métabolisme du cholestérol mais également dans celui de la vitamine D. Comme pour l'uranium, les effets du ^{137}Cs sur le métabolisme de la vitamine D ne sont pas connus. Cependant, la toxicité radiologique du ^{137}Cs a été démontrée au niveau des organes clés impliqués dans ce métabolisme (le foie, le rein et le cerveau).

Sur la base de ces observations, les objectifs de ce travail de thèse ont été d'étudier les effets de la contamination par des radionucléides sur le métabolisme de la vitamine D, en particulier sur les cytochromes P450 et les récepteurs nucléaires impliqués dans ce métabolisme (figure 15). De par l'importance de ces radionucléides dans l'environnement nous avons focalisé notre étude sur l'uranium et le césium 137.

Dans un premier temps, nous avons choisi de réaliser une étude chez le rat après contamination aiguë à l'uranium afin d'identifier les cibles de ce radionucléide sur le métabolisme de la vitamine D.

Dans un deuxième temps, un modèle animal, mimant la contamination chronique des populations exposées à l'uranium ou au césium, a été utilisé afin de déterminer si l'ingestion chronique d'une faible dose de ces radionucléides peut affecter ce métabolisme.

Enfin, dans un troisième temps, nous avons réalisé une étude sur des animaux en croissance afin d'évaluer l'impact de telles expositions sur une population plus sensible et plus fragile.

Résultats

A. Effets de l'uranium sur le métabolisme de la vitamine D_3

1) Article 1 – Effets de l'uranium appauvri après une exposition aigue sur le métabolisme de la vitamine D chez le rat.

(**Tissandié E**, Gueguen Y, Lobaccaro JMA, Paquet F, Aigueperse J and Souidi M. Article publié dans "*Archives of Toxicology*", 2006)

Présentation du contexte scientifique

Une contamination aiguë ou chronique à l'uranium modifie l'homéostasie osseuse et phosphocalcique. Le maintien de l'homéostasie minérale fait intervenir notamment la vitamine D dont la biosynthèse et la dégradation sont assurées par des enzymes de type P450 (CYPs). Les études montrent que l'uranium modifie l'expression et/ou l'activité des CYPs impliquées dans les métabolismes de la testostérone, des xénobiotiques et du cholestérol au niveau hépatique et au niveau rénal, principal siège de ses effets délétères. Notre objectif a donc été de déterminer si une contamination à l'uranium pouvait conduire à des perturbations du métabolisme hépatique et rénal de la vitamine D, et plus particulièrement une modification de l'activité globale des CYPs impliquées dans ce métabolisme, comme c'est le cas pour d'autres métaux lourds tels que le cadmium, le strontium ou le plomb.

En raison de l'absence totale de donnée sur l'effet de l'uranium sur le métabolisme de la vitamine D, nous avons proposé dans un premier temps de réaliser une étude après une contamination aiguë à fortes doses d'uranium et à court terme, dans le but d'identifier les principales cibles moléculaires de ce radionucléide. Afin de réaliser ce travail, une dose unique d'uranium appauvri (à 0.26 % d'^{235}U, activité spécifique = 14.7 $KBq.g^{-1}$) sous forme de nitrate d'uranyle dissout dans l'eau (204 mg/kg dans 1,5 ml, pH = 3) a été administrée à des rats mâles adultes, *Sprague-Dawley*, par gavage. Cette dose correspond à la DL50 à 14 jours pour l'acétate d'uranium chez le rat. Nous avons choisi d'étudier les effets de l'uranium à 1 et 3 jours après exposition, 50% de l'uranium étant éliminé dans les premières 24 heures.

Nous avons analysé l'expression de *cyp27a1, cyp2r1, cyp27b1* et *cyp24a1* ainsi que l'expression des récepteurs nucléaires (*vdr, pparα et γ, hnf-4a* et *rxra*) et du facteur de

transcription *hnf-1a* impliqués dans la régulation de ces enzymes. De plus, l'activité spécifique de la CYP27A1 a été mesurée au niveau du foie. Nous avons également déterminé le niveau plasmatique de vitamine D_3 active ($1,25(OH)_2D_3$) et de l'hormone parathyroïdienne (PTH), le principal régulateur de la *cyp27b1*. En parallèle, le niveau d'expression de deux gènes cibles de la vitamine D impliqués dans le transport du calcium au niveau rénal (*ecac1, Epithelials Ca2+ channel 1 et cabp-d9k, Calbindin-D9K*) a été mesuré afin d'estimer l'impact physiologique de l'UA sur ce métabolisme.

Article 1 - Effects of depleted uranium after short-term exposure on vitamin D metabolism in rat.

Article publié dans « *Archives of Toxicology* »

Tissandié E, Gueguen Y, Lobaccaro JMA, Paquet F, Aigueperse J and Souidi M.

Arch Toxicol (2006) 80: 473–480
DOI 10.1007/s00204-006-0068-2

INORGANIC COMPOUNDS

E. Tissandie · Y. Guéguen · J. M. A. Lobaccaro
F. Paquet · J. Aigueperse · M. Souidi

Effects of depleted uranium after short-term exposure on vitamin D metabolism in rat

Received: 8 November 2005 / Accepted: 23 January 2006 / Published online: 25 February 2006
© Springer-Verlag 2006

Abstract Uranium is a natural radioactive heavy metal. Its toxicity has been demonstrated for different organs, including bone, kidney, liver and brain. Effects of an acute contamination by depleted uranium (DU) were investigated in vivo on vitamin D_3 biosynthetic pathway. Rats received an intragastric administration of DU (204 mg/kg) and various parameters were studied either on day 1 or day 3 after contamination. Cytochrome P450 (CYP27A1, CYP2R1, CYP27B1, CYP24A1) enzymes involved in vitamin D metabolism and two vitamin D_3-target genes (ECaC1, CaBP-D9K) were assessed by real time RT-PCR in liver and kidneys. CYP27A1 activity was measured in liver and vitamin D and parathyroid hormone (PTH) level were measured in plasma. In acute treated-rats, vitamin D level was increased by 62% and decreased by 68% in plasma, respectively at day 1 and at day 3, which paralleled with a concomitant decrease of PTH level (90%) at day 3. In liver, *cyp2r1* mRNA level was increased at day 3. Cyp27a1 activity decreased at day 1 and increased markedly at day 3. In kidney, *cyp27b1* mRNA was increased at days 1 and 3 (11- and 4-fold respectively). Moreover, *ecac1* and *cabp-d9k* mRNA levels were increased at day 1 and decreased at day 3. This work shows for the first time that DU acute contamination modulates both activity and expression of CYP enzymes involved in vitamin D metabolism in liver and kidney, and consequently affects vitamin D target genes levels.

Keywords Depleted uranium · Cytochrome P450 · Vitamin D_3

Abbreviations $1,25(OH)_2D_3$: 1α,25-dihydroxyvitamin D_3 · $25(OH)D_3$: 25-hydroxyvitamin D_3 · CaBP-D9k: Calbindin-D9k · CAR: Constitutive androstane receptor · CYP: Cytochrome P450 · DU: Depleted uranium · ECaC1: Epithelial Ca^{2+} channel 1 · HNF: Hepatocyte nuclear factor · PPAR: Peroxisome proliferator activated receptor · PTH: Parathyroid hormone · PXR: Pregnane X receptor · RXR: Retinoid X receptor · VDR: Vitamin D receptor

E. Tissandie · Y. Guéguen · F. Paquet · J. Aigueperse
M. Souidi (✉)
Radiological Protection and Human health Division,
Radiobiology and Epidemiology Department,
Laboratory of Experimental Toxicology,
Institute for Radiological protection and Nuclear Safety,
BP n 17, 92262 Fontenay-aux-Roses Cedex,
France
E-mail: maamar.souidi@irsn.fr
Tel.: +33-1-58359194
Fax: +33-1-58358467

J. M. A. Lobaccaro
Compared Physiology and Molecular Endocrinology,
UMR Université Blaise Pascal-CNRS,
24 avenue des Landais, 6547, 63177 Aubière Cedex,
France

Introduction

Uranium is a natural radioactive heavy metal. The extensive use of depleted uranium, a waste product of uranium enrichment, in both civilian and military applications results in the increase of the number of human population exposed to this radionuclide: armor-penetrating munitions, military vehicle armor, and aircraft, ship and missile counterweighting/ballasting, as well as in a number of other military and commercial applications (Bleise et al. 2003; Bem and Bou-Rabee 2004). It might thus be the source of a public health problem in the nearest future. Accumulation of this radionuclide was reported after an acute or a chronic contamination in various organs such as bone, kidney, liver and brain, and was associated to chemical and/or radiological toxicities (La Touche et al. 1987; McClain et al. 2001; Lestaevel et al. 2005). However, few studies (Pasanen et al. 1995; Chung et al. 2003; Souidi et al. 2005; Gueguen et al. 2005) have reported the cellular and molecular effects of uranium contamination on important metabolic functions in these organs. Among the

various metabolic targets, DU could affect cytochromes P450 (CYPs) involved in testosterone metabolism (Pasanen et al. 1995), cholesterol metabolism (Gueguen et al. 2005) or xenobiotic detoxification (Chung et al. 2003; Souidi et al. 2005). These enzymes constitute a superfamily of hemoproteins that play key-roles in the biotransformation of various compounds such as prostacylins, bile acids and several hormones (Nebert and Russell 2002). Among them, vitamin D is a hormone that has a crucial role in the regulation of calcium and phosphate homeostasis. Conversion of vitamin D_3 to its biologically active form, 1α,25-dihydroxyvitamin D_3 ($1,25(OH)_2D_3$), requires two sequential hydroxylation steps catalyzed by hepatic and renal CYPs. The first step occurs in liver and involves the mitochondrial CYP27A1 or the microsomal CYP2R1, which synthesizes the major circulating and inactive form of vitamin D_3, 25-hydroxyvitamin D_3 or $25(OH)D_3$. In kidney, the active form $1,25(OH)_2D_3$ is synthesized by the mitochondrial CYP27B1, whereas hormone inactivation is induced by CYP24A1 (Brown et al. 1999; Prosser and Jones 2004). In target cells, $1,25(OH)_2D_3$ signaling occurs through its cognate nuclear receptor (VDR) that acts as a ligand-activated transcription factor of genes encoding proteins involved in calcium transport as well as CYPs responsible for vitamin D metabolism through a feed-back loop of regulation (Chen and DeLuca 1995). Other nuclear receptors could regulate vitamin D metabolism such as the peroxisome proliferated activated receptor (PPAR) α, an inhibitor of *cyp27a1* transcription (Post et al. 2001). Conversely PPARγ and hepatocyte nuclear factor (HNF) 4α have been shown to increase *cyp27a1* transcription (Quinn et al. 2005; Chen and Chiang 2003). These nuclear receptors require a heterodimerization with the retinoid X receptor (RXR) to transactivate their target genes. Results from our laboratory showed that acute and chronic uranium contamination up-regulates the mRNA levels of the main xenobiotic-metabolizing CYPs in the liver and the kidney by increasing the expression of the nuclear receptors pregnane X receptor (PXR) and constitutive androstane receptor (CAR) (Souidi et al. 2005). Besides, HNF1α, a non-nuclear receptor transcription factor, acts positively on *cyp27a1* transcription (Rao et al. 1999). So far, no data has been reported on the cellular and molecular effects of DU contamination on vitamin D cytochrome P450-metabolizing enzymes, whose deregulations could be associated to pathologies such as osteoporosis, osteomalacia or cancer (Rodriguez-Martinez and Garcia-Cohen 2002; Mehta and Mehta 2002). The objectives of this present work were to evaluate the effects of uranium on CYPs involved in the metabolism of vitamin D_3 in rats exposed to an acute DU contamination. mRNA level were determined by quantitative PCR. The studied genes were *cyp27a1, cyp2r1, cyp27b1* and *cyp24a1* involved in the vitamin D metabolism, *vdr*, *ppar*α and γ, *hnf-4*α, *hnf-1*α and *rxr*α, which regulate the CYP transcription. Hormonal analysis were performed on blood by measuring the levels of $1,25(OH)_2D_3$ and those of the parathyroid hormone (PTH), the main activator of *cyp27b1* (Brenza and DeLuca 2000). In the liver, CYP27A1 activity was determined as well. To measure the physiological effects of the various levels of vitamin D in kidney, mRNA level of the target genes *ecac1* and *cabp-d9k*, encoding the epithelial Ca^{2+} channels 1 and calbindin-D9k respectively, were also studied. Vitamin D_3 metabolism is presented in Fig. 1 and parameters italicized were investigated in the present study.

Materials and methods

Chemicals and materials

Depleted uranyl nitrate hexahydrate (DU) was obtained from V.W.R (Fontenay-sous-Bois, France). Hydroxypropyl-β-cyclodextrin (HPβCD) was a gift from Dr Michel Riottot (Université Paris-Sud, Orsay, France). [4-^{14}C] cholesterol was obtained from NEN Products (Les Ulis, France). Cholesterol and 27-hydroxycholesterol were obtained from Sigma Diagnostics (Isle d'Abeau Chesnes, France).

Animals

Experiments were performed on 10-week-old male Sprague–Dawley rats, weighing about 300 g and obtained from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France). They were kept under constant temperature (21 ± 1°C) with a 12 h:12 h (light:dark) cycle and had free access to normal rat chow (105, SAFE, Le Genest Saint Isle, France) and mineral water throughout the experimental period. The experiments were conducted in compliance with the French regulations for animal experimentation and the agreement of the local animal welfare committee of IRSN (Ministry of Agriculture Act n°87-848, October 19, 1987, modified May 29, 2001).

Contamination procedures

Eight animals received a unique administration per gavage of depleted uranium as uranyl nitrate dissolved in water (204 mg/kg body weight dissolved in 1.5 ml, pH = 3). This dose was determined as the LD50 at 14 days for uranium acetate in rats (Domingo et al. 1987). Eight control animals were gavaged with 1.5 ml water. A daily follow-up of animals (food and water intake, body weight) was carried out during the experiment. At day 1 or day 3 after uranium administration, animals were anaesthetized by inhalation (Technique et Equipement Medical (T.E.M.) anaesthesia, France) of 95% air/5% isoflurane (Forène, Abbott France, Rungis) and euthanized by intracardiac puncture with a 2-ml insulin syringe to collect blood. Organs were rapidly removed, chilled in ice-cold buffer for enzymatic analyses

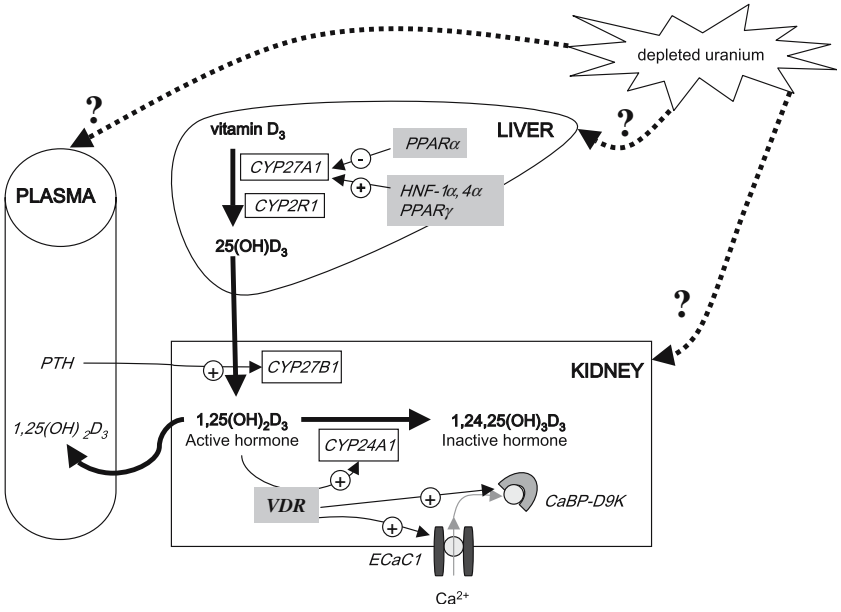


Fig. 1 Metabolism of vitamin D in liver and kidney. Italicized parameters were investigated in the present study after acute contamination with DU. *PPARα and γ* peroxisome proliferator activated receptor, *HNF-1α and 4α* hepatocyte nuclear factors, *VDR* vitamin D receptor, *CYP* cytochrome P450, *1,25(OH)$_2$D$_3$* 1α,25-dihydroxyvitamin D$_3$, *ECaC1* epithelial Ca^{2+} channel 1, *CaBP-D9K* calbindin-D9K

or put in liquid nitrogen for RNA extraction and stored at −80°C.

Plasma analyses

Plasma calcium and inorganic phosphate (biological chemistry reagents, Thermo Electron Corporation, France) were measured on an automated Konelab 20 (Thermo Electron Corporation, France) system. Plasma 1,25(OH)$_2$D$_3$ (vitamin D) was assayed with a ^{125}I radioimmunoassay kit (Nichols Institute Diagnostics, Paris, France). PTH was determined using the rat PTH IRMA Kit (DSL, Cergy Pontoise, France).

Preparation of liver mitochondria

About 1 g of liver was sliced in ice-cold buffer (KH_2PO_4 50 mM, sucrose 300 mM, dithiothreitol 0.5 mM, EDTA 10 mM, NaCl 50 mM, pH 7.4), homogenized as previously described (Souidi et al. 1998) and centrifuged for 20 min at 20,000*g*. The pellet was gently resuspended in 4 ml of buffer and homogenized by 10 strokes of a Teflon pestle (motor-driven homogenizer) and centrifuged at 2,000*g* for 10 min. The supernatant was then centrifuged at 9,000*g* for 10 min and the mitochondrial pellet finally resuspended in 1.2 ml of buffer, fractionated into 200 μl samples and stored at −80°C.

Determination of CYP27A1 activity in the liver

Sterol 27-hydroxylase (CYP27A1) in the mitochondrial fractions was assayed with a radioisotopic method that used [4-^{14}C]Cholesterol, solubilized in hydroxypropyl-β-cyclodextrin, as previously described (Souidi et al. 1999).

Real-time PCR

Total RNA from the kidney and the liver was isolated using RNeasy total RNA isolation Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) and reverse transcribed with random hexamers using Superscript II First Strand Synthesis System (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Real-time PCR was performed on an Abi Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) using 10 ng of template DNA for each reaction. Samples were normalized to hypoxanthine–guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) and fold-inductions calculated relative to the control at day 1. Sequences for the forward and reverse primers are listed in Table 1.

Statistical analysis

Results are reported as mean ± SE. For comparisons between two groups, the unpaired Student's *t* test was performed. The prior level of significance was set at $P < 0.05$.

Results

Plasma analyses of the DU-treated rats

Vitamin D and PTH plasma levels were altered in DU-exposed rats. At day 1, 1,25(OH)$_2$D$_3$ level increased by 62% ($P < 0.01$) after DU administration when compared with controls (277 pmol/l) (Fig. 2a). Conversely, a markedly decreased level of 1,25(OH)$_2$D$_3$ was observed at day 3 in these animals (68% compared to the non-exposed rats, $P < 0.001$). While the plasma PTH level did not change at day 1, plasma PTH level also showed a falling-down (reduced by 90%, $P < 0.001$), 3 days after

Table 1 Primer sequences used for the qPCR analysis

Gene (accession no)	Primers	5′–3′sequence	Amplicon size (bp)	Ref.
cyp27a1 (NM178847)	fw	GGAAGGTGCCCCAGAACAA	71	This study
	rev	GCGCAGGGTCTCCTTAATCA		
cyp2r1 (XM341909)	fw	CCGATCTTCCCCACGTCTAC	98	This study
	rev	GCCATTGAGAACCACAGTTGATAT		
cyp27b1 (NM053763)	fw	GAGATCACAGGCGCTGTGAAC	107	Anderson et al. (2003)
	rev	TCCAACATCAACACTTCTTTGATCA		
cyp24a1 (NM201635)	fw	TGGATGAGCTGTGCGATGA	75	Anderson et al. (2003)
	rev	TGCTTTCAAAGGACCACTTGTTC		
rxrα (NM012805)	fw	CGCAAAGACCTGACCTACACC	133	Souidi et al. (2005)
	rev	TCCTCCTGCACAGCTTCCC		
pparα (NM013196)	fw	CCTCTTCCCAAAGCTCCTTCA	70	This study
	rev	GTACGAGCTGCGCATGCTC		
pparγ (NM013124)	fw	TCATGACCAGGGAGTTCCTCA	102	This study
	rev	TCATCTAATTCCAGTGCATTGAACTT		
hnf-1α (NM012669)	fw	ACACCTGGTACGTCCGCAAG	51	Su and Waxman (2004)
	rev	CGTGGGTGAATTGCTGAGC		
hnf-4α (NM022180)	fw	TGGCAAACACTACGGAGCCT	51	Su and Waxman (2004)
	rev	CTGAAGAATCCCTTGCAGCC		
vdr (NM017058)	fw	TGACCCCACCTACGCTGACT	79	Anderson et al. (2003)
	rev	CCTTGGAGAATAGCTCCCTGTACT		
ecac1 (NM053787)	fw	CCTTTGAGCTCTTCCTTACCATCA	88	This study
	rev	AAAGCAAAATAGGTTAGGTGGTACATG		
cabp-d9k (NM012521)	fw	GAAGCTGCTGATTCAGTCAGAGTTC	91	This study
	rev	ATCACCGTTCTTATCCAGCTCTTTAA		
hprt (NM012583)	fw	GCTCGAGATGTCATGAAGGAGA	108	Ropenga et al. (2004)
	rev	TCAGCGCTTTAATGTAATCCAGC		

fw Forward sequence; *rev* reverse sequence

acute-administration of DU compared with control (82 pg/ml) (Fig. 2b).

Variations of vitamin D levels were not linked to any significant modification of the calcium concentration through out the experiment (Table 2). As observed in Table 2, phosphate concentration showed a significant decrease starting at day 1 in the DU-gavaged rats (1.87 mM vs. 2.21 for the untreated rats, $P<0.05$). This difference was accentuated at day 3 (1.60 mM vs. 2.21 for the untreated rats, $P<0.001$). Calcium, phosphate and hormones values in controls rats were consistent with the literature data (Anderson et al. 2005; Lewin et al. 2002).

Gene expression and activity of the various vitamin D metabolizing enzymes

To determine the cause of $1,25(OH)_2D_3$ variations, we measured the mRNA levels of the genes involved in the vitamin D synthesis: *cyp27a1* and *cyp2r1* in the liver, and *cyp27b1* in the kidney. *Cyp24a1* gene expression, whose product is involved in vitamin D catabolism, was analyzed in the kidney.

In the liver, no gross modifications in the expression of *cyp27a1* and *cyp2r1* was observed in the treated rats compared to the untreated animals (Fig. 3a) even though a slight but significant variation (1.2 fold, $P<0.05$) was present for *cyp2r1* in the DU-gavaged rats at day 3. In parallel, enzymatic activity of CYP27A1 in liver mitochondria was evaluated in the control and contaminated rats (Fig. 3b). This enzymatic activity was decreased by 35% at one day ($P<0.05$) compared to controls (63 pmol/min/mg prot); however a threefold increase was observed at day 3 ($P<0.05$). In kidney, mRNA expression of *cyp27b1* was significantly increased by 11-fold ($P<0.001$) at day 1 and by fourfold ($P<0.001$) at day 3 when compared with untreated rats, while *cyp24a1* expressions were unaffected (Fig. 4).

Analysis of vitamin D_3 target genes mRNA levels

To analyze whether blood increase of vitamin D had a physiological effect, we evaluated the mRNA levels of *ecac1* and *cabp-d9k*, two vitamin D target genes in kidney. As shown in Fig. 5, *ecac1* mRNA analysis showed a fivefold increase at day 1 ($P<0.001$) and twofold increase at day 3 ($P<0.05$) compared to untreated rats. A non-significant increase in *cabp-d9k* mRNA level was observed at day 1 while a slight decrease yet significant of 30% ($P<0.01$) was observed at day 3.

Analysis of transcription factor mRNA levels

The mRNA expression of *pparα*, *pparγ, hnf-1α*, *hnf-4α*, *rxr*, and *vdr* involved in the transcriptional regulation of vitamin D cytochrome P450-metabolizing enzymes were evaluated by qPCR in liver or kidney from DU-gavaged

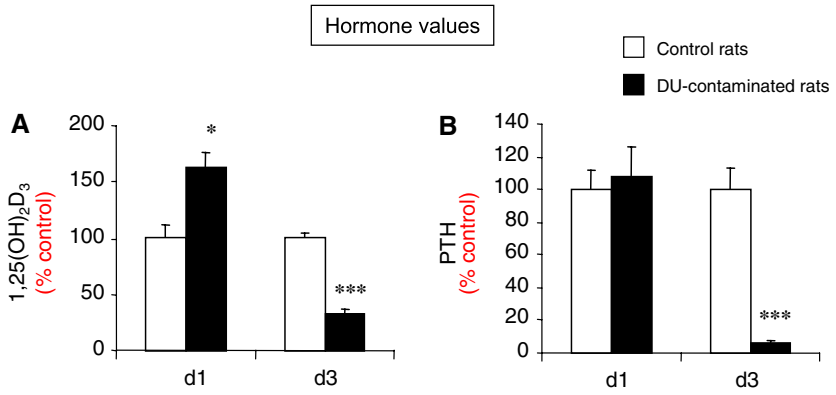


Fig. 2 Plasma $1,25(OH)_2D_3$ and PTH levels on control and DU-exposed rats. $1,25(OH)_2D_3$ (**a**) and PTH (**b**) levels were measured by ^{125}I radioimmunoassay in plasma of control or DU-exposed rats at 1 or 3 days after gavage. Hormones values are normalized to control (units of hormone values are described in the results). Data are expressed as mean ± SEM ($n=6$); $*P<0.05$ and $***P<0.001$ significantly different from non-exposed values

or control rats. Among the various transcripts analyzed, in the liver, the only significant variations, even slight, were observed for *pparα* (20% decrease compared to the control animals, $P<0.05$), and *hnf-1α* (20% increase, $P<0.05$) at day 3 (Fig. 6a). *pparγ, hnf-4α* and *rxr* mRNAs levels did not differ from controls at either day 1 or day 3. In kidney, *hnf-1α* mRNA accumulation was decreased by 60% at day 1 ($P<0.001$) and by 80% at day 3 ($P<0.001$) compared to untreated rats whereas no significant changes were observed for mRNA expression of *vdr* and *rxr* (Fig. 6b).

Discussion

Few studies have investigated DU-biological effects. The spare studies pointed out various effects in reproduction and development (Domingo 2001) or in neurophysiology (Lestaevel et al. 2005). Moreover, few molecular targets of DU have been described. Among these, we and others showed that CYP transcription or activity could be affected by an acute exposure to DU, mainly in the metabolism of testosterone (Pasanen et al. 1995), or in the detoxification of xenobiotics (Gueguen et al. 2005). Among the target organs, short-term intragastric administration of a high dose of DU, was known to be highly toxic for kidneys (Haley 1982; Domingo et al. 1987; Leggett 1989), as pointed out by the abnormal urea and creatinine levels in plasma (Dublineau et al. 2005). Beside, alterations of both calcium and phosphate metabolism have been reported in vivo after an acute exposure with uranium (Carafoli et al. 1971; Stefanovic et al. 1987). Paradoxically, vitamin D, the major regulator of calcium and phosphate homeostasis (Brown et al. 1999), has never been studied up to now. Moreover, vitamin D metabolism perturbations have already been reported with other heavy metals such as cadmium and lead (Brzoska and Moniuszko-Jakoniuk 2005; Berglund et al. 2000). The aim of our work was to study the deleterious effects of DU in rat by gavage. Vitamin D metabolism was investigated from an endocrine, biochemical and molecular point of view.

Table 2 Calcium and phosphate levels in plasma

	Day 1		Day 3	
	Control	DU	Control	DU
Calcium (mM)	2.83 ± 0.06	2.72 ± 0.19	2.68 ± 0.06	2.80 ± 0.05
Phosphate (mM)	2.21 ± 0.06	1.87 ± 0.10*	2.21 ± 0.10	1.60 ± 0.06**

Data are the mean ± SEM ($n=7$–8); Student t tests
$*P<0.05$, $**P<0.001$ significantly different from control value

A decrease in plasma phosphate level was seen in the DU-gavaged rats. Interestingly, Stefanovic et al. (1987) reported an increase in serum phosphate level in dogs following uranyl nitrate treatment. These contradictory results could be probably explained by the concentration of administrated DU as well as to the animal species used for each experiment. Knowing that kidney is the major site of regulation of phosphate homeostasis, these data confirm the uranium-induced renal dysfunction. This well known nephrotoxicity of DU could have an impact on vitamin D_3 metabolism which occurs mainly in the kidney. In the first part of this work, our results shows that acute contamination with DU affects plasma $1,25(OH)_2D_3$ level. We also studied the response to DU contamination of PTH, an important regulator of vitamin D_3 metabolism (Brown et al. 1999; Armbrecht et al. 2003). Especially, a previous study, performed in dogs, has shown that uranium affects serum PTH level (Stefanovic et al. 1987). We showed a falling-down of plasma PTH level, 3 days after DU contamination. This decrease in PTH level correlates with the decreased plasma $1,25(OH)_2D_3$ level observed at day 3 and agrees with the stimulating role of PTH on $1,25(OH)_2D_3$ production. These observations realized in plasma suggest a disruption of hepatic and/or renal vitamin D_3 metabolism. In our study, we observed that uranium affected

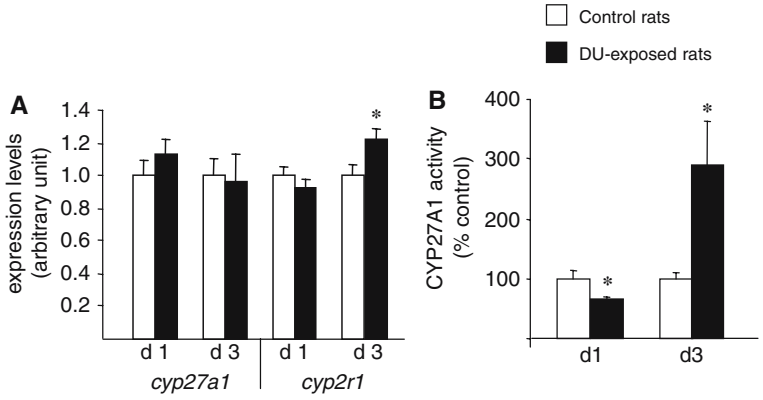


Fig. 3 Liver *cyp27a1* and *cyp2r1* mRNA levels and CYP27A1 activity on control and DU-exposed rats. **a** Relative mRNA expression levels of *cyp27a1*, *cyp2r1* measured in liver by real-time PCR of control or DU-exposed rats at 1 and 3 days after intragastric administration. The results are expressed as a ratio to *hprt* mRNA level. **b** Enzymatic activity of CYP27A1 measured in liver mitochondria of control or DU-exposed rats at 1 and 3 days after intragastric administration. Data are the mean ± SEM ($n=6$); $*P<0.05$ significantly different from control value

the hepatic and renal CYPs involved in vitamin D_3 metabolism. In liver, we studied the response to DU acute contamination of CYP27A1 and CYP2R1, involved in the first step of activation. A significant increase in *cyp2r1* expression level was observed 3 days after DU administration. Despite *cyp27a1* mRNA levels were unchanged, the activity of this enzyme decreased at day 1 and increased markedly at day 3. This finding suggests that DU affects the two main hepatic pathways implicated in biosynthesis of vitamin D_3. In kidney, expression of *cyp27b1* was considerably increased at day 1 and day 3, while *cyp24a1* expressions were unaffected. According to previous studies the renal mRNA levels of *cyp27b1* and *cyp24a1* are both significant determinants of plasma $1,25(OH)_2D_3$ which correlated positively with kidney *cyp27b1* mRNA levels and negatively with kidney *cyp24a1* mRNA levels (Anderson et al. 2003, 2004). Indeed we observed an over-expression of renal *cyp27b1* which correlates with the increasing of serum $1,25(OH)_2D_3$ level observed at day 1. Finally we showed an increase in expression of hepatic and renal vitamin D_3 cytochrome P450-metabolizing enzymes that is in accordance with a previous study demonstrating that DU induces expression of CYPs involved in xenobiotic detoxification (Souidi et al. 2005; Gueguen et al. 2005).

In the second part of this work, to study the consequences of uranium-induced alterations of vitamin D_3 metabolism, two target genes were investigated at the molecular level by the measurement of their mRNA. *Ecac1*, a known vitamin D target gene, encodes the epithelial Ca^{2+} channel 1 responsible for the Ca^{2+} transport through the tubular epithelia (den Dekker et al. 2003; Li et al. 1998). Increased level of *ecac1* mRNA may cause an extensive Ca^{2+} influx in kidney, as previously described accumulation in kidney mitochondria of rats after an acute intoxication with uranium (Carafoli et al. 1971). The second target gene encodes CaBP-D9K, a calbindin involved in the intracellular transport of ion calcium. The reason why *cabp-9dk* did not show any increase at day 1 is puzzling. Conversely, a

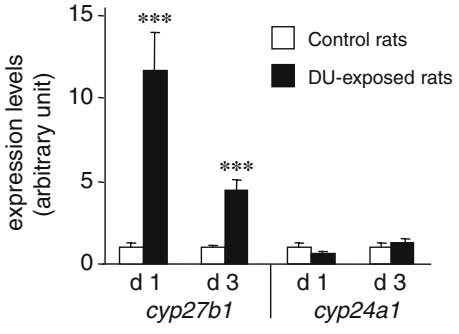


Fig. 4 Renal *cyp27b1* and *cyp24a1* mRNA levels on control and depleted uranium (*DU*)-treated rats. Relative mRNA expression levels of *cyp27b1*, *cyp24a1* measured in kidney by real-time PCR of control or DU-exposed rats at one and three days after intragastric administration. The results are expressed as a ratio to *hprt* mRNA level. Data are the mean ± SEM ($n=6$); $***P<0.001$ significantly different from control value

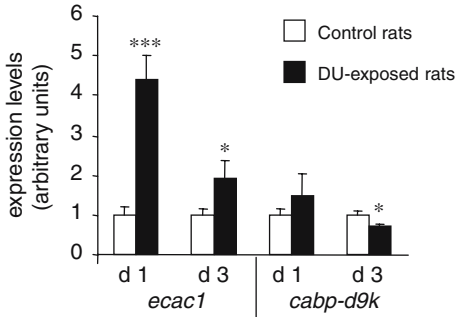


Fig. 5 Renal mRNA level of vitamin D target genes on control and depleted uranium (*DU*)-treated rats. Relative mRNA expression levels of *ECaC1* and *CaBP-D9K* measured in kidneys by real-time PCR of control or DU-exposed rats at 1 and 3 days after intragastric administration. The results were expressed as a ratio to *hprt* mRNA level. Data are the mean ± SEM ($n=6$); $*P<0.05$ and $***P<0.001$ significantly different from control value

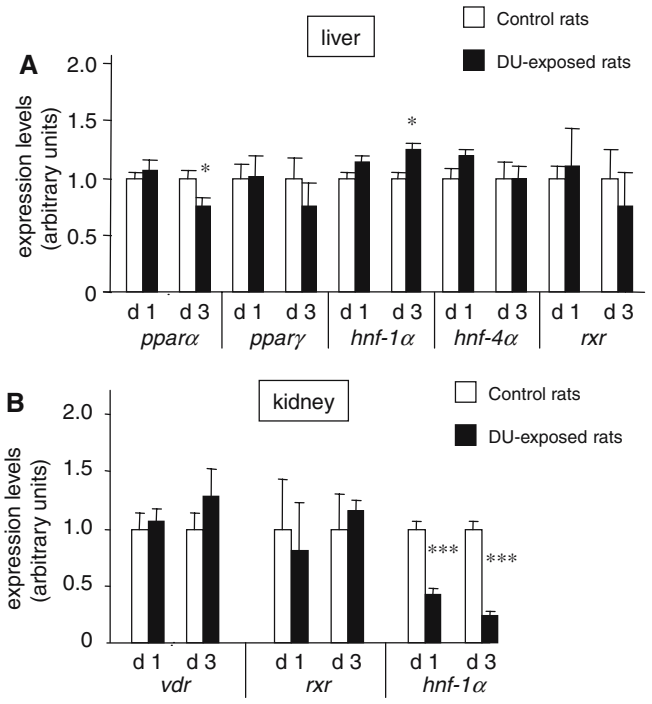


Fig. 6 mRNA level of nuclear receptors associated to vitamin D metabolism on control and depleted uranium (*DU*)-treated rats. Relative mRNA expression levels of *ppara, pparγ, hnf-1α*, *hnf-4α*, *rxr* and *vdr* measured in liver (**a**) and in kidney (**b**) by real-time PCR of control or DU-exposed rats at 1 and 3 days after intragastric administration. The results are expressed as a ratio to *hprt* mRNA level. Data are the mean ± SEM ($n=6$); $*P<0.05$ and $***p<0.001$ significantly different from control value

slight decrease in *cabp-d9k* accumulation is observed at day 3 in the acute-treated-rats. A recent report demonstrated that PTH synergistically enhances the $1,25(OH)_2D_3$-induced up-regulation of *cabp-d9k* expression in the kidney (Cao et al. 2002). The important decrease in plasma PTH level observed at day 3 could thus explain this decrease. Moreover, HNF-1α has been shown to importantly regulate *cabp-d9k* (Wang et al. 2004). The decrease in *hnf-1α* expression by 60 and 80% observed in kidney at day 1 and 3, respectively, could explain the pattern of expression for this gene.

At last, nuclear receptors involved in the transcriptional regulation of vitamin D cytochrome P450-metabolizing enzymes has been investigated. As already described for the gene encoding the PXR and the CAR, two nuclear receptors involved in metabolism of xenobiotics (Souidi et al. 2005), a modification of the accumulation of *pparα* and *hnf-1α* was observed in the liver. The physiologic effects of such variations are under investigation.

In conclusion, this study showed for the first time that acute contamination by high doses of depleted uranium could modulate both mRNA levels and activity of CYP enzymes involved in vitamin D metabolism. Consequently, this radionuclide could modulate vitamin D_3 target genes expressions by affecting vitamin D_3 active form level. This alteration of DU on vitamin D_3 metabolism observed at short-term may lead to modifications of mineral homeostasis and of the maintenance of skeletal integrity after chronic long term exposure. Indeed, (Kurttio et al. 2005) reported an increased bone turnover in human population after long-term exposure to DU.

Acknowledgments The authors thank C. Baudelin and N. Dudoignon for animal's experimentation and L. Grandcolas, I. Dublineau and C. Linard for helpful assistance and invaluable advice. This study was part of the ENVIRHOM research program supported by the Institute for Radioprotection and Nuclear Safety (IRSN). J.M.A. Lobaccaro is a Professor of the Université Blaise Pascal and is supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, the Université Blaise Pascal, the Fondation pour la Recherche Médicale #INE2000-407031/1, the Fondation BNP-Paribas.

References

Anderson PH, O'Loughlin PD, May BK, Morris HA (2003) Quantification of mRNA for the vitamin D metabolizing enzymes CYP27B1 and CYP24 and vitamin D receptor in kidney using real-time reverse transcriptase–polymerase chain reaction. J Mol Endocrinol 31:123–132

Anderson PH, O'Loughlin PD, May BK, Morris HA (2004) Determinants of circulating 1,25-dihydroxyvitamin D3 levels: the role of renal synthesis and catabolism of vitamin D. J Steroid Biochem Mol Biol 89–90:111–113

Anderson PH, O'Loughlin PD, May BK, Morris HA (2005) Modulation of CYP27B1 and CYP24 mRNA expression in bone is independent of circulating 1,25(OH)2D3 levels. Bone 36:654–662

Armbrecht HJ, Hodam TL, Boltz MA (2003) Hormonal regulation of 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase and 24-hydroxylase gene transcription in opossum kidney cells. Arch Biochem Biophys 409:298–304

Bem H, Bou-Rabee F (2004) Environmental and health consequences of depleted uranium use in the 1991 Gulf War. Environ Int 30:123–134

Berglund M, Akesson A, Bjellerup P, Vahter M (2000) Metal–bone interactions. Toxicol Lett 112–113:219–225

Bleise A, Danesi PR, Burkart W (2003) Properties, use and health effects of depleted uranium (DU): a general overview. J Environ Radioact 64:93–112

Brenza HL, DeLuca HF (2000) Regulation of 25-hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase gene expression by parathyroid hormone and 1,25-dihydroxyvitamin D3. Arch Biochem Biophys 381:143–152

Brown AJ, Dusso A, Slatopolsky E (1999) Vitamin D. Am J Physiol 277:F157–F175

Brzoska MM, Moniuszko-Jakoniuk J (2005) Effect of low-level lifetime exposure to cadmium on calciotropic hormones in aged female rats. Arch Toxicol 79(11):636–646

Cao LP, Bolt MJ, Wei M, Sitrin MD, Chun Li Y (2002) Regulation of calbindin-D9k expression by 1,25-dihydroxyvitamin D(3) and parathyroid hormone in mouse primary renal tubular cells. Arch Biochem Biophys 400:118–124

Carafoli E, Tiozzo R, Pasquali-Ronchetti I, Laschi R (1971) A study of Ca 2+ metabolism in kidney mitochondria during acute uranium intoxication. Lab Invest 25:516–527

Chen KS, DeLuca HF (1995) Cloning of the human 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D-3 24-hydroxylase gene promoter and identification of two vitamin D-responsive elements. Biochim Biophys Acta 1263:1–9

Chen W, Chiang JY (2003) Regulation of human sterol 27-hydroxylase gene (CYP27A1) by bile acids and hepatocyte nuclear factor 4alpha (HNF4alpha). Gene 313:71–82

Chung W, Kim EJ, Lee I, Kim SG, Lee MG, Kim SH (2003) Effects of recombinant human growth hormone on the pharmacokinetics of intravenous chlorzoxazone in rats with acute renal failure induced by uranyl nitrate. Life Sci 73:253–263

den Dekker E, Hoenderop JG, Nilius B, Bindels RJ (2003) The epithelial calcium channels, TRPV5 & TRPV6: from identification towards regulation. Cell Calcium 33:497–507

Domingo JL (2001) Reproductive and developmental toxicity of natural and depleted uranium: a review. Reprod Toxicol 15:603–609

Domingo JL, Llobet JM, Tomas JM, Corbella J (1987) Acute toxicity of uranium in rats and mice. Bull Environ Contam Toxicol 39:168–174

Dublineau I, Grison S, Linard C, Baudelin C, Dudoignon N, Souidi M, Marquette C, Paquet F, Aigueperse J, Gourmelon P (2005) Short-term effects of depleted uranium on mucosal immunity in rat intestine. J Toxicol Environ Health A (in press)

Gueguen Y, Souidi M, Baudelin C, Dudoignon N, Grison S, Dublineau I, Marquette C, Voisin P, Gourmelon P, Aigueperse J (2005) Short-term hepatic effects of depleted uranium on xenobiotic and bile acid metabolizing cytochrome P450 enzymes in the rat. Arch Toxicol 1–9

Haley DP (1982) Morphologic changes in uranyl nitrate-induced acute renal failure in saline- and water-drinking rats. Lab Invest 46:196–208

Kurttio P, Komulainen H, Leino A, Salonen L, Auvinen A, Saha H (2005) Bone as a possible target of chemical toxicity of natural uranium in drinking water. Environ Health Perspect 113:68–72

La Touche YD, Willis DL, Dawydiak OI (1987) Absorption and biokinetics of U in rats following an oral administration of uranyl nitrate solution. Health Phys 53:147–162

Leggett RW (1989) The behavior and chemical toxicity of U in the kidney: a reassessment. Health Phys 57:365–383

Lestaevel P, Houpert P, Bussy C, Dhieux B, Gourmelon P, Paquet F (2005) The brain is a target organ after acute exposure to depleted uranium. Toxicology 212:219–226

Lewin E, Garfia B, Recio FL, Rodriguez M, Olgaard K (2002) Persistent downregulation of calcium-sensing receptor mRNA in rat parathyroids when severe secondary hyperparathyroidism is reversed by an isogenic kidney transplantation. J Am Soc Nephrol 13:2110–2116

Li YC, Pirro AE, Demay MB (1998) Analysis of vitamin D-dependent calcium-binding protein messenger ribonucleic acid expression in mice lacking the vitamin D receptor. Endocrinology 139:847–851

McClain DE, Benson KA, Dalton TK, Ejnik J, Emond CA, Hodge SJ, Kalinich JF, Landauer MA, Miller AC, Pellmar TC, Stewart MD, Villa V, Xu J (2001) Biological effects of embedded depleted uranium (DU): summary of armed forces radiobiology research institute research. Sci Total Environ 274:115–118

Mehta RG, Mehta RR (2002) Vitamin D and cancer. J Nutr Biochem 13:252–264

Nebert DW, Russell DW (2002) Clinical importance of the cytochromes P450. Lancet 360:1155–1162

Pasanen M, Lang S, Kojo A, Kosma VM (1995) Effects of simulated nuclear fuel particles on the histopathology and CYP enzymes in the rat lung and liver. Environ Res 70:126–133

Post SM, Duez H, Gervois PP, Staels B, Kuipers F, Princen HM (2001) Fibrates suppress bile acid synthesis via peroxisome proliferator-activated receptor-alpha-mediated downregulation of cholesterol 7alpha-hydroxylase and sterol 27-hydroxylase expression. Arterioscler Thromb Vasc Biol 21:1840–1845

Prosser DE, Jones G (2004) Enzymes involved in the activation and inactivation of vitamin D. Trends Biochem Sci 29:664–673

Quinn CM, Jessup W, Wong J, Kritharides L, Brown AJ (2005) Expression and regulation of sterol 27-hydroxylase (CYP27A1) in human macrophages: a role for RXR and PPARgamma ligands. Biochem J 385:823–830

Rao YP, Vlahcevic ZR, Stravitz RT, Mallonee DH, Mullick J, Avadhani NG, Hylemon PB (1999) Down-regulation of the rat hepatic sterol 27-hydroxylase gene by bile acids in transfected primary hepatocytes: possible role of hepatic nuclear factor 1alpha. J Steroid Biochem Mol Biol 70:1–14

Rodriguez-Martinez MA, Garcia-Cohen EC (2002) Role of Ca(2+) and vitamin D in the prevention and treatment of osteoporosis. Pharmacol Ther 93:37–49

Ropenga A, Chapel A, Vandamme M, Griffiths NM (2004) Use of reference gene expression in rat distal colon after radiation exposure: a caveat. Radiat Res 161:597–602

Souidi M, Parquet M, Lutton C (1998) Improved assay of hepatic microsomal cholesterol 7 alpha-hydroxylase activity by the use of hydroxypropyl-beta-cyclodextrin and an NADPH-regenerating system. Clin Chim Acta 269:201–217

Souidi M, Parquet M, Ferezou J, Lutton C (1999) Modulation of cholesterol 7alpha-hydroxylase and sterol 27-hydroxylase activities by steroids and physiological conditions in hamster. Life Sci 64:1585–1593

Souidi M, Gueguen Y, Linard C, Dudoignon N, Grison S, Baudelin C, Marquette C, Gourmelon P, Aigueperse J, Dublineau I (2005) In vivo effects of chronic contamination with depleted uranium on CYP3A and associated nuclear receptors PXR and CAR in the rat. Toxicology 214:113–122

Stefanovic V, Ivic MA, Strahinjic S (1987) Calcium and phosphate metabolism in uranyl nitrate-induced acute renal failure. Arch Int Physiol Biochim 95:223–228

Su T, Waxman DJ (2004) Impact of dimethyl sulfoxide on expression of nuclear receptors and drug-inducible cytochromes P450 in primary rat hepatocytes. Arch Biochem Biophys 424:226–234

Wang L, Klopot A, Freund JN, Dowling LN, Krasinski SD, Fleet JC (2004) Control of differentiation-induced calbindin-D9k gene expression in Caco-2 cells by cdx-2 and HNF-1alpha. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 287:G943–G953

Conclusions

Cette étude démontre, pour la première fois, qu'une contamination aiguë à l'uranium appauvri est capable d'affecter le métabolisme de la vitamine D_3 par modulation des CYPs et des récepteurs nucléaires associés. Plus particulièrement, l'administration d'UA induit une stimulation de l'expression ou de l'activité des CYPs impliquées dans sa biosynthèse au niveau hépatique (CYP27A1, CYP2R1) et rénal (CYP27B1). De plus, l'UA, à forte dose, peut moduler l'expression génique du récepteur nucléaire PPARα et du facteur de transcription HNF-1α qui régulent la transcription de la CYP27A1. L'analyse des paramètres sanguins indique des perturbations des taux plasmatiques de vitamine D_3 active, $1,25(OH)_2D_3$, et de PTH. En effet, un jour après administration d'UA, les rats présentent une augmentation du taux de $1,25(OH)_2D_3$, probablement due à la forte surexpression de la *cyp27b1*. A l'inverse une diminution du taux de $1,25(OH)_2D_3$ corrélée avec la diminution du niveau plasmatique de la PTH est observée 3 jours après administration d'UA. D'autre part, ces données mettent en évidence la surexpression d'un gène cible de la vitamine D, *ecac1* (correspondant à un canal calcique exprimé majoritairement au niveau rénal) probablement due à l'augmentation du taux plasmatique de vitamine D_3 active, un jour après l'administration d'UA. Ainsi, cette première étude, réalisée avec de fortes doses et à court terme, identifie le métabolisme de la vitamine D comme une cible de l'uranium et plus particulièrement définit les CYPs et certains récepteurs nucléaires comme des cibles moléculaires de ce radionucléide.

A plus long terme et administré de façon chronique, l'uranium pourrait conduire à la modification de l'homéostasie phosphocalcique, voire à la genèse de pathologies. Pour répondre à cette question, il est nécessaire dans un deuxième temps de réaliser une étude du métabolisme de la vitamine D_3 après exposition chronique à l'UA. Cette étude permettra d'une part, de déterminer si une contamination chronique, même à faible niveau, peut affecter ces mêmes paramètres et d'autre part d'évaluer les éventuelles conséquences physiologiques sur l'homéostasie minérale.

2) Article 2- Effets in vivo d'une contamination chronique à l'uranium appauvri sur le métabolisme de la vitamine D_3 chez le rat.

(**Tissandié E**, Guéguen Y, Lobaccaro JMA, Grandcolas L, Voisin P, Aigueperse J, Gourmelon P and Souidi M. Article publié dans "*Biochimica et biophysica acta-general subjects*", 2007)

Présentation du contexte scientifique

L'uranium est naturellement présent dans les roches, le sol, l'air et l'eau. Toutefois, l'utilisation d'UA à des fins civiles et militaires a considérablement augmenté les niveaux d'uranium contenus dans l'environnement et soulève des inquiétudes concernant les risques sur la santé humaine. L'ingestion chronique de faibles quantités d'uranium constitue le principal mode d'exposition de la population générale. Nous avons démontré précédemment que le métabolisme de la vitamine D_3 est une cible de l'uranium à fortes doses (article 1). Nous proposons donc d'étudier chez le rat les conséquences biologiques d'une ingestion chronique à de faibles doses d'UA sur les CYPs impliquées dans la biosynthèse et la dégradation de la vitamine D_3 (CYP27A1, CYP2R1, CYP27B1 et CYP24A1) et sur les récepteurs nucléaires et autres facteurs impliqués dans leur régulation (PPARα, γ, LXRα, ß, HNF-1α, HNF-4α, VDR, RXRα). Les études de toxicité montrant que l'uranium s'accumule dans le cerveau après contamination chronique et peut y induire des effets toxiques, nous avons étudié également les effets de l'UA sur les acteurs du métabolisme de la vitamine D_3 au niveau de cet organe. Aussi, afin d'estimer l'impact physiologique de l'UA sur ce métabolisme, d'une part, le niveau d'expression des gènes cibles de la vitamine D impliqués dans le transport du calcium au niveau rénal (*ecac1*, *Epithelials Ca2+ channel 1, cabp-d28k, Calbindin-D28K, ncx1,* Na^+/Ca^{2+} *exchanger, pmcab1,* Ca2+-ATPase) et dans la neuroprotection au niveau du cerveau (*nt-3,* neurotrophin 3) a été mesuré, et d'autre part, le taux plasmatique de l'ostéocalcine, un marqueur de la formation osseuse, régulé par la vitamine D, a été déterminé.

Afin de réaliser cette étude, des rats mâles adultes, Sprague-Dawley, âgés d'environ 12 semaines, sont contaminés par ingestion d'eau minérale supplémentée en UA à la concentration de 40 mg U l^{-1} (1 mg/rat/jour). Cette concentration en uranium a été calculée pour rester bien en dessous du seuil de néphrotoxicité qui est fixé à 1 µg d'uranium/g de rein par Diamond et al (Diamond *et al.* 1989) En effet, elle correspond à

environ 1/10ème de la dose toxique pour le rein en dose cumulée sur la durée de la vie de l'animal. Dans ces conditions expérimentales, aucune modification des taux plasmatiques de créatinine et d'urée, marqueurs de la fonction rénale, n'est observée chez les animaux contaminés, confirmant que la dose utilisée n'est pas néphrotoxique. De plus cette dose représente deux fois la plus forte concentration jamais retrouvée sur Terre, dans des eaux souterraines, au Sud de la Finlande. Nous avons choisi d'étudier les effets de l'uranium après 9 mois d'exposition, correspondant à une exposition d'une vingtaine d'années chez l'Homme, afin d'estimer les conséquences d'une contamination à long terme. Ainsi, ce modèle expérimental permet de mimer des situations d'expositions chroniques des populations humaines exposées à l'uranium.

Article 2- In vivo effects of chronic contamination with depleted uranium on vitamin D3 metabolism in rat.

Article publié dans « *Biochimica et biophysica acta-general subjects* »

Tissandié E, Guéguen Y, Lobaccaro JMA, Grandcolas L, Voisin P, Aigueperse J, Gourmelon P and Souidi M.

Available online at www.sciencedirect.com
ScienceDirect
Biochimica et Biophysica Acta 1770 (2007) 266–272
Biochimica et Biophysica Acta BBA
www.elsevier.com/locate/bbagen

In vivo effects of chronic contamination with depleted uranium on vitamin D_3 metabolism in rat

E. Tissandié [a], Y. Guéguen [a], J.M.A. Lobaccaro [b], L. Grandcolas [a], P. Voisin [a], J. Aigueperse [a], P. Gourmelon [a], M. Souidi [a,*]

[a] *Institute for Radiological Protection and Nuclear Safety, Radiological Protection and Human health Division, Radiobiology and Epidemiology Department, Laboratory of Experimental Toxicology, BP no. 17, F-92262 Fontenay-aux-Roses CEDEX, France*

[b] *Compared Physiology and Molecular Endocrinology, UMR Université Blaise Pascal-CNRS 6547, 24 avenue des Landais, F-63177 Aubière Cedex, France*

Received 11 August 2006; received in revised form 10 October 2006; accepted 10 October 2006
Available online 19 October 2006

Abstract

The extensive use of depleted uranium (DU) in today's society results in the increase of the number of human population exposed to this radionuclide. The aim of this work was to investigate *in vivo* the effects of a chronic exposure to DU on vitamin D_3 metabolism, a hormone essential in mineral and bone homeostasis. The experiments were carried out in rats after a chronic contamination for 9 months by DU through drinking water at 40 mg/L (1 mg/rat/day). This dose corresponds to the double of highest concentration found naturally in Finland. In DU-exposed rats, the active vitamin D ($1,25(OH)_2D_3$) plasma level was significantly decreased. In kidney, a decreased gene expression was observed for *cyp24a1,* as well as for *vdr* and *rxrα*, the principal regulators of CYP24A1. Similarly, mRNA levels of vitamin D target genes *ecac1*, *cabp-d28k* and *ncx-1*, involved in renal calcium transport were decreased in kidney. In the brain lower levels of messengers were observed for *cyp27a1* as well as for *lxrβ*, involved in its regulation. In conclusion, this study showed for the first time that DU affects both the vitamin D active form ($1,25(OH)_2D_3$) level and the vitamin D receptor expression, and consequently could modulate the expression of *cyp24a1* and vitamin D target genes involved in calcium homeostasis.
© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Depleted uranium; Cytochrome P450; Vitamin D3; Vitamin D receptor; Chronic contamination

1. Introduction

Uranium is a naturally occurring heavy metal found in Earth's crust. Recently, it has been observed that concentrations of uranium were increasing in the environment as a consequence of the use of depleted uranium (DU) in both civil and military industries, leading to possible exposure of human population [1,2] either through drinking water or the food chain [3]. The chemical and radiological toxicities of this radionuclide have been demonstrated in a variety of organs such as bone, kidney, liver and brain [4–6]. To date, little attention was paid to cellular and molecular effects of chronic ingestion of low uranium quantities on important metabolic functions in these organs. Few studies [7–10], however, report that DU could affect cytochromes P450 (CYPs). Indeed, this enzyme family is involved in the regulation of testosterone [7] and cholesterol metabolism [8] as well as xenobiotic detoxification [9,10]. Cytochromes P450 consist of a superfamily of heme-containing monooxygenases and participates in the metabolism of many drugs as well as endogenous substances including steroids [11]. Among them, vitamin D is a secosteroid hormone

Abbreviations: $1,25(OH)_2D_3$, 1α,25-dihydroxyvitamin D_3; $25(OH)D_3$, 25-hydroxyvitamin D3; CaBP-D28k, Calbindin-D28k; CYP, cytochrome P450; DU, depleted uranium; ECaC1, Epithelial Ca^{2+} channel 1; HNF, hepatocyte nuclear factor; LXR, liver X receptor; NCX1, Na^+/Ca^{2+} exchanger 1; NT3, neurotrophin 3; PMCa1b, Ca^{2+}-ATPase 1b; PPAR, peroxisome proliferator activated receptor; PTH, parathyroid hormone; RXR, retinoid X receptor; VDR, vitamin D receptor

* Corresponding author. Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, Direction de la RadioProtection de l'Homme, Service de Radiobiologie et d'Epidémiologie, Laboratoire de Radiotoxicologie Expérimentale. IRSN, B.P. n°17, F 92262 Fontenay-aux-Roses Cedex, France. Tel.: +33 1 58 35 91 94; fax: +33 1 58 35 84 67.
E-mail address: maamar.souidi@irsn.fr (M. Souidi).

0304-4165/$ - see front matter © 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.bbagen.2006.10.006

playing an essential role in mineral homeostasis and bone metabolism [12]. To carry out these functions, vitamin D must be metabolized to its biologically active form, 1α,25-dihydroxyvitamin D_3 (1,25$(OH)_2D_3$), by two sequential hydroxylation steps catalyzed by CYPs. The first step occurs in liver and involves the mitochondrial CYP27A1 or the microsomal CYP2R1, which synthesizes the major circulating and inactive form of vitamin D_3, 25-hydroxyvitamin D_3 or 25 $(OH)D_3$. In the kidney, the active form 1,25$(OH)_2D_3$ is synthesized by the mitochondrial CYP27B1, whereas hormone inactivation is initiated by CYP24A1 [13,14]. The kidney is also an important target organ for 1,25$(OH)_2D_3$, responsible for the handling of calcium and phosphate in kidney. In target organs of the vitamin D such as intestine, kidney and bone, the active metabolite 1,25(OH)2D3 exerts its effects by binding to the nuclear vitamin D receptor (VDR) which could form a heterodimeric complex with the retinoic acid X receptor alpha (RXRα), the receptor for the 9-*cis* retinoic acid, and acts as a ligand-activated transcription factor by altering the transcription rates of target genes. Among the targets, osteocalcin, an abundant, highly conserved bone-specific protein that is synthesized by osteoblasts, plays an important role in bone mineralization [15]. Calbindin is also an important target since it acts as a calcium binding protein in intestine and kidney, allowing calcium to cross the epithelia [16]. Expression of *cyp24a1* in the kidney is induced by VDR leading to a feed-back loop of regulation [17] while *cyp27a1* expression in liver is regulated by other members of the nuclear receptors family such as the peroxisome proliferated activated receptors (PPAR) γ [18], the hepatocyte nuclear factor (HNF) 4α [19] and the liver X receptor (LXR) [20]. Oppositely, PPAR α is an inhibitor of *cyp27a1* transcription [21]. In addition, HNF1α, a non-nuclear receptor transcription factor, acts positively on *cyp27a1* transcription [22]. Today, it is assumed that the various actors involved in vitamin D metabolism are present in the brain leading to a locally biosynthetic and degradation pathway [23].

Recently, we have reported that acute contamination by high doses of DU modulates both mRNA levels and activities of CYPs enzymes involved in vitamin D metabolism [24]. We hypothesized that a long-term exposure with environmental doses of DU may induce alterations of vitamin D metabolism. The aim of this study was to investigate the biological effects of chronic exposure to DU on vitamin D metabolism using metabolic and physiological approaches. Vitamin D metabolism was investigated by the mRNA measurements of *cyp27a1*, *cyp2r1*, *cyp27b1* and *cyp24a1*, as well as those of the nuclear receptors regulating them, in liver and kidney of rat chronically exposed to DU. Physiological effects was explored by the analysis of the accumulation of VDR-target messengers encoding the epithelial Ca channel (*ecac1*) [25], the calbindin-D28K (*cabp-d28k*) [26], the Na^+/Ca^{2+} exchanger (*ncx1*), the Ca^{2+}-ATPase (*pmca1b*) [27] and the expression of the neurotrophin 3 (*nt-3*), a target gene in the brain [28]. Besides, levels of 25$(OH)D_3$, 1,25$(OH)_2D_3$, parathyroid hormone (PTH), calcium and phosphate as well as osteocalcin were measured in plasma of DU-exposed rats.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and materials

Depleted uranyl nitrate hexahydrate (DU) was obtained from V.W.R. (Fontenay-sous-Bois, France). Hydroxypropyl-β-cyclodextrin (HPβCD) was provided by Dr Michel Riottot (Université Paris-Sud, Orsay, France). [4-^{14}C] cholesterol was obtained from NEN Products (Les Ulis, France). Cholesterol and 27-hydroxycholesterol were obtained from Sigma Diagnostics (Isle d'Abeau Chesnes, France).

2.2. Animals

Twenty Sprague–Dawley male rats, 12 weeks old, weighing about 250 g and obtained from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France) were used and divided into two groups of ten rats (control and exposed). The rats were housed in pairs, with a 12-h light/12-h dark cycle (light on: 08:00 h/20:00 h) and a temperature of 22 ± 1 °C. Water and standard rat pellets (R03 from SAFE, Augy, France) were delivered *ad libitum*. This diet contains 9000 mg/kg calcium, 6000 mg/kg phosphorus and 1500 IU/kg vitamin D_3. All experimental procedures were approved by the Animal Care Committee of the Institute of Radioprotection and Nuclear Safety and complied with French regulations for animal experimentation (Ministry of Agriculture Act No. 87-848, October 19, 1987, modified May 29, 2001).

2.3. Contamination procedures

The rats in the experimental group were exposed to DU in their drinking water for 9 months. DU contained 0.26% ^{235}U and was diluted in mineral water to obtain a dosage of 40 mg U l^{-1} (1 mg/rat/day). This dose was the double of highest concentration found naturally on Earth, in the drinking water of Finland [29]. The rats in control group drank uncontaminated mineral water. After 9 months of contamination, animals were anaesthetized by inhalation (TEM anaesthesia, France) of 95% air/5% isoflurane (Forène®, Abbott France, Rungis, France) and euthanized by intracardiac puncture with a 2-ml insulin syringe to collect blood. Organs were rapidly removed, chilled in ice-cold buffer for enzymatic analyses or put in liquid nitrogen for RNA analyses and stored at −80 °C. Accumulation of uranium in all tissues and urine was previously reported by Paquet et al. [30]. Note that the exposure to DU had no influence on food consumption, body weight or general health status of rats (data not shown).

2.4. Biochemical assays

Plasma calcium and inorganic phosphate (biological chemistry reagents, Thermo Electron Corporation, France) were measured on an automated Konelab 20 (Thermo Electron Corporation, France) system. Plasma 1,25$(OH)_2D_3$ (active Vitamin D) and 25$(OH)D_3$ (the major circulating metabolite) were assayed with a ^{125}I radioimmunoassay kit (IDS, Paris, France). Parathyroid hormone (PTH) and osteocalcin were determined in plasma using the rat PTH IRMA Kit (DSL, Cergy Pontoise, France) and the rat osteocalcin EIA Kit (IDS, Paris, France) respectively.

2.5. Determination of CYP27A1 activity in the liver

The preparation of liver mitochondria was carried out as described elsewhere [31]. Sterol 27-hydroxylase (CYP27A1) in the mitochondrial fractions was assayed with a radioisotopic method that used [4-^{14}C]Cholesterol, solubilized in hydroxypropyl-β-cyclodextrin, as previously reported [32].

2.6. Real-time PCR

Total RNA from the kidney, liver and brain (cortex) was isolated using RNeasy total RNA isolation Kit or RNeasy Lipid Tissue kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) and reverse transcribed with random hexamers using Superscript II First Strand Synthesis System (Invitrogen, Cergy Pontoise,

Table 1
Primer sequences used for the qPCR analysis

Gene (accession no)	Primers	5′–3′sequence	Amplicon size (bp)	References
cyp27a1	fw	GGAAGGTGCCCCAGAACAA	71	[24]
(NM178847)	rev	GCGCAGGGTCTCCTTAATCA		
cyp2r1	fw	CCGATCTTCCCCACGTCTAC	98	[24]
(XM341909)	rev	GCCATTGAGAACCACAGTTGATAT		
cyp27b1	fw	GAGATCACAGGCGCTGTGAAC	107	[50]
(NM053763)	rev	TCCAACATCAACACTTCTTTGATCA		
cyp24a1	fw	TGGATGAGCTGTGCGATGA	75	[50]
(NM201635)	rev	TGCTTTCAAAGGACCACTTGTTC		
rxrα	fw	CGCAAAGACCTGACCTACACC	133	[9]
(NM012805)	rev	TCCTCCTGCACAGCTTCCC		
pparα	fw	CCTCTTCCCAAAGCTCCTTCA	70	[24]
(NM013196)	rev	GTACGAGCTGCGCATGCTC		
pparγ	fw	TCATGACCAGGGAGTTCCTCA	102	[24]
(NM013124)	rev	TCATCTAATTCCAGTGCATTGAACTT		
hnf-1α	fw	ACACCTGGTACGTCCGCAAG	51	[51]
(NM012669)	rev	CGTGGGTGAATTGCTGAGC		
hnf-4α	fw	TGGCAAACACTACGGAGCCT	51	[51]
(NM022180)	rev	CTGAAGAATCCCTTGCAGCC		
lxr α	fw	AGC AAC AGT GTA ACA GGC GCT	62	this study
(NM031627)	rev	GTG CAA TGG GCC AAG GC		
lxr β	fw	GAT CCT CGA GTA AGA TGA CCA CGA TGT AGG	170	this study
(NM031626)	rev	GAT CGG ATC CAT GTC TTC TTC CCC CAC AAG TTC		
vdr	fw	TGACCCCACCTACGCTGACT	79	[50]
(NM017058)	rev	CCTTGGAGAATAGCTCCCTGTACT		
ecac1	fw	CCTTTGAGCTCTTCCTTACCATCA	88	[24]
(NM053787)	rev	AAAGCAAAATAGGTTAGGTGGTACATG		
cabp-d28k	fw	GAA TTG TAG AGT TGG CCC ATG TC	75	[45]
(NM031984)	rev	ACT TCA GTT GCT GGC ATC GA		
hprt	fw	GCTCGAGATGTCATGAAGGAGA	108	[52]
(NM012583)	rev	TCAGCGCTTTAATGTAATCCAGC		
pmca1b	fw	GTT CTG GAA GGA TGG TCG TTA CTG	84	[45]
(NM053311)	rev	CTT CGC CTC CAG CTC CAA		
ncx 1	fw	GAA CCT CAG TGC CAG ACA CAT TT	85	[45]
(NM019268)	*rev*	CCG GTG ACA TTG CCT ATG G		
nt-3	fw	AGCAGAGGCACCCAGAGAAC	67	[45]
(NM031073)	rev	TGCAATCATCGGCTGGAAT		

fw, forward sequence; rev, reverse sequence.

France). Real-time PCR was performed on an Abi Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) by using SYBR chemistry (Applied Biosystems). Ten ng of template DNA was used for each reaction. Thermoprofile conditions were: 50 °C for 2 min, 95 °C for 10 min and 40 cycles at 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. PCR fluorescent signals were normalized to the fluorescent signal obtained from the housekeeping gene HPRT for each sample. Sequences for the forward and reverse primers are listed in Table 1.

2.7. Statistical analysis

Results are reported as means ± SEM. For comparisons between two groups, the unpaired Student's *t* test was performed. The prior level of significance was set at $p<0.05$.

3. Results

3.1. Hormonal and mineral status of the DU-exposed rats

In rats exposed to DU for 9 months (1 mg/rat/day), the plasma level of hormonally active $1,25(OH)_2D_3$ decreased by 56% (Table 2), compared with control rat (24.3 pmol/l vs. 55.4 for the non DU-exposed rats, $p<0.05$). Conversely, the plasma $25(OH)D_3$, the major circulating metabolite of vitamin D, and PTH levels were unchanged between the two groups. Calcium and phosphate concentrations were unaffected in the DU-exposed rats compared to control animals (Table 2). Hormonal and mineral values in controls rats were consistent with the literature data [33,34]. In

Table 2
Hormone and mineral levels in plasma

	Control	DU
25(OH)D3 (nmol/l)	72.0 ± 4.4	67.5 ± 5.7
1α25(OH)D3 (pmol/l)	55.4 ± 10.7	24.3 ± 5.1[a]
PTH (pg/ml)	83.0 ± 12.7	73.5 ± 14.6
Calcium (mmol/l)	2.9 ± 0.04	2.9 ± 0.05
Phosphate (mmol/l)	1.3 ± 0.04	1.3 ± 0.07
Osteocalcin (ng/ml)	5.8 ± 0.43	7.0 ± 0.51

Data are the means ± SEM (n = 8–10); Student's *t* test: [a]$p<0.05$ significantly different from control value.

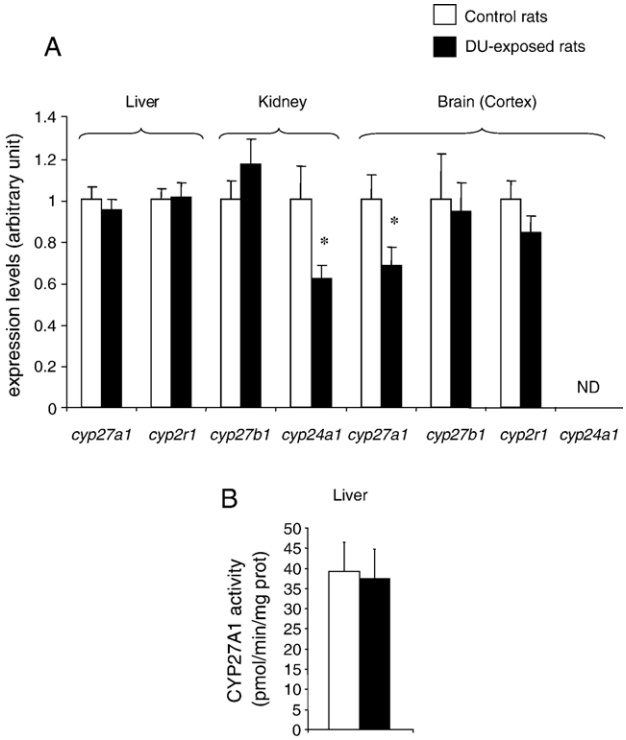


Fig. 1. Vitamin D_3 cytochrome P450-metabolizing enzymes mRNA levels and CYP27A1 activity in rats chronically exposed to depleted uranium. (A) Relative mRNA expression levels of *cyp27a1*, *cyp2r1, cyp27b1 and cyp24a1* measured in liver, kidney and brain (cortex) by real-time PCR of control or DU-exposed rats for 9 months (1 mg/rat/day) in their drinking water. The results are expressed as a ratio to *hprt* mRNA level. Data are the means ± SEM ($n=9$). ND, non detectable. (B) Enzymatic activity of CYP27A1 measured in liver mitochondria of control or DU-exposed rats. Data are the means ± SEM ($n=6$); *$p<0.05$ significantly different from control value.

addition, DU-contamination had no influence on the plasma concentration of osteocalcin.

3.2. Analysis of gene expression and activity of the vitamin D metabolizing enzymes

To analyze at the molecular level the CYPs enzymes involved in vitamin D metabolism, expression of *cyp27a1, cyp2r1, cyp27b1* and *cyp24a1* genes, involved in vitamin D biosynthesis and inactivation was examined using quantitative real-time PCR (Fig. 1A). In the liver, no modification in the levels of *cyp27a1* and *cyp2r1*, encoding proteins involved in the synthesis of $25(OH)D_3$, was observed in the exposed rats compared to control animals. In addition, the enzymatic activity of CYP27A1, evaluated in liver mitochondria, was unchanged whatever the treatment (Fig. 1B). In kidney however, mRNA levels of *cyp24a1,* encoding the enzyme which directs the catabolism of vitamin D, was significantly decreased by 38% ($p<0.05$) in DU-exposed rats when compared with control animals, while mRNA expression of *cyp27b1*, encoding the protein responsible for vitamin D activation, was unaffected (Fig. 1A). In the brain of DU-exposed rats, *cyp27a1* showed a lower level compared to the non DU-exposed rats (decrease by 32%; $p<0.05$). *Cyp24a1* mRNA was undetectable in the brain.

3.3. Analysis of transcription factor mRNA levels

To assess the effects of DU contamination on transcriptional regulators of the CYPs cited above, the mRNA levels of *pparα, pparγ, hnf-1α, hnf-4α, lxr, rxrα,* and *vdr* were quantified by quantitative real-time PCR in liver, kidney and brain. As shown in Fig. 2A, uranium contamination had no effect on RNA levels of *pparα, pparγ, hnf-1α, hnf-4α, lxrα* and *rxrα* involved in the regulation of *cyp27a1* in the liver.

In kidney, significant decreased levels of *vdr* ($p<0.001$), the main regulator of CYP24A1, as well as *rxrα* ($p<0.05$), encoding VDR heterodimer, were observed (43% and 28%, compared to non-exposed rats respectively) (Fig. 2B). Interestingly, a decrease of *vdr* mRNA expression was also observed in the liver (by 26%, $p<0.05$) and the brain (by 53%, $p<0.05$), compared with controls. In the brain, mRNA expression of *lxrβ* was decreased by 40% ($p<0.05$) when compared with the non DU-exposed rats, while *hnf-4α* expression was increased by 3-fold ($p<0.05$) (Fig. 2C).

3.4. Analysis of vitamin D_3 target genes mRNA levels

Because plasma levels of $1,25(OH)_2D_3$ were lower in DU-exposed rats, physiological effects of this decrease was

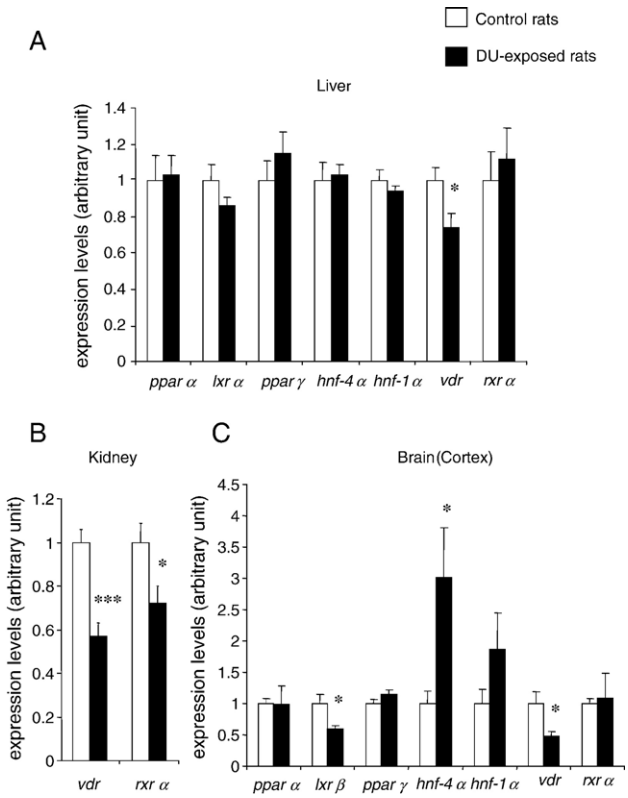


Fig. 2. mRNA level of nuclear receptors associated to vitamin D metabolism in rats chronically exposed to depleted uranium. Relative mRNA expression levels of *pparα*,*lxrα, lxrβ, pparγ, hnf-4α, hnf-1α, rxrα* and *vdr* measured in liver (A), kidney (B) and brain cortex (C) by real-time PCR of control or DU-exposed rats for 9 months (1 mg/rat/day) in their drinking water. The results are expressed as a ratio to *hprt* mRNA level. Data are the means ± SEM ($n=9$); *$p<0.05$ and ***$p<0.001$ significantly different from control value.

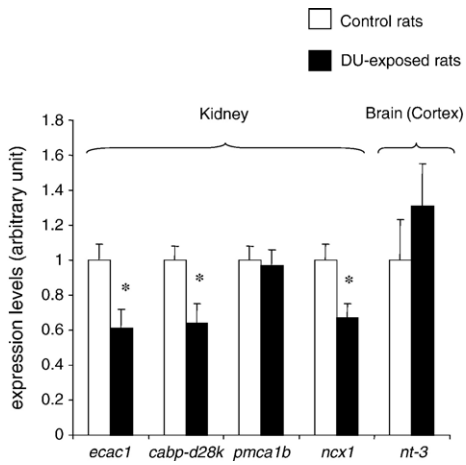


Fig. 3. mRNA level of Vitamin D target genes on control and depleted uranium (DU)-exposed rats. Relative mRNA expression levels of *ecac1*, *cabp-d28k, pmca1b, ncx1 and nt-3* measured in kidneys and in brain cortex by real-time PCR of control or DU-exposed rats for 9 months (1 mg/rat/day) in their drinking water. The results were expressed as a ratio to *hprt* mRNA level. Data are the means ± SEM ($n=9$); *$p<0.05$ significantly different from control value.

investigated. As shown in Fig. 3, mRNA analysis of *ecac1, cabp-d28k* and *ncx1* showed a decreased by 40% ($p<0.05$), 36% ($p<0.05$) and 30% ($p<0.05$) respectively compared to control rats. In contrast, *pmca1b* and *nt-3* mRNAs levels did not differ from controls in the kidney and the brain respectively.

4. Discussion

The extensive use of depleted uranium in today's society results in the increase of the number of human populations exposed to this radionuclide. Bone disorders and alterations of both calcium and phosphate metabolism have been described in humans chronically exposed to low doses of uranium through drinking water [35,36] and in animals exposed to high [37,38] or low [39] doses of uranium. In addition, we reported in a previous work [24] that an acute contamination with DU could affect the vitamin D metabolism, the major regulator of bone and mineral homeostasis. However, little is known about the health effects of long-term environmental exposure to uranium. In order to mimic this situation, male rats were contaminated with low doses by chronic ingestion during 9 months. The daily dose of about 1 mg/rat/day of DU, administered in the drinking water (40 mg/l) was chosen to correspond to values close to those found in some area in Finland [29]. Our data pointed that rats chronically exposed to DU present an alteration of the vitamin D metabolism without any dramatic toxic side effect.

Uranium is a well known nephrotoxic agent and has been shown to affect vital status in rats [40] and other animals [41] contaminated with toxic doses. Besides, we [24] and others [37,42] reported the *in vivo* alteration of blood PTH level, an important regulator of vitamin D_3 metabolism [43], after an acute or a low dose (2 mg kg^{-1}) of DU. At last, human populations exposed to uranium through drinking water [36] or on uranyl nitrate-exposed animals [37,38] show modifications of plasma calcium and phosphate. In our study, blood tests showed no effect on renal function markers such as creatinine and urea and thus confirmed that the dose we used was not nephrotoxic [9]. Moreover, the absence of plasma PTH and osteocalcin variation confirmed the non-toxic level of DU used. Conversely, DU contamination decreased the active 1,25 $(OH)_2D_3$ plasma level whereas the major circulating metabolite $25(OH)D_3$ plasma level was unaffected, which paralleled what we previously obtained after an acute exposure to DU [24]. Interestingly, a similar decreased in the concentration of 1,25 $(OH)_2D_3$ was reported in rats chronically exposed to cadmium, another heavy metal [44], and to cesium, another radionuclide which is highly radioactive [45]. This raises the question whether DU alters vitamin D physiology through its characteristics of a heavy metal, those of a radionuclide, or both. In addition, vitamin D metabolism perturbations have already been reported with other metals such as strontium and lead [46,47]. Our data show that the DU-exposure model we developed could be helpful in the near future to answer this question since no gross alteration was observed in rat unless plasma vitamin D levels.

Among the genes encoding the cytochromes P450 involved in vitamin D biosynthesis (*cyp27a1, cyp2r1, cyp27b1*) and inactivation (*cyp24a1*), expression of all of them were unaffected in liver, as well as enzymatic activity of CYP27A1. These results correlate with the circulating levels of $25(OH)D_3$ observed in both groups of rats. Conversely, a significant decrease of *cyp24a1* mRNA levels was observed in kidney of DU-exposed rats, which could be correlated with the decreased levels of *vdr* and *rxrα* in the same tissues. Since the transcription of *cyp24a1* is induced by $1,25(OH)_2D_3$ through its binding to VDR [17], it could be hypothesized that the lower level of *cyp24a1* results of a combined effect of the low plasma $1,25(OH)_2D_3$ level and affected *vdr* and *rxrα* levels in kidney. The decrease of the plasma $1,25(OH)_2D_3$ has a clear transcriptional effect as shown by the lower levels of VDR-target genes such as *ecac1*, *cabp-d28k* and *ncx1*. No modification of *pmca1b* encoding the plasma membrane Ca^{2+}-ATPase was observed however a previous study pointed that 1,25 $(OH)_2D_3$ is not the main regulator of this gene [27]. Concerning nuclear receptors (PPARα, PPARγ, HNF-1α, HNF-4α, LXR α and RXRα) involved in the transcriptional regulation of CYP27A1, no modification of the levels of their mRNA was observed in the liver.

Conversely to the liver, vitamin D metabolism in the brain seems to be more affected. Indeed DU decreased the levels of *cyp27a1* and *lxrβ*, encoding the nuclear receptor for oxysterols shown to up-regulate *cyp27a1* [20], while increased those of *hnf-4α*, whose protein up-regulates *cyp27a1* [19]. One hypothesis of this increase expression is a compensatory response to the decrease in *cyp27a1* expression. Interestingly, a decrease in *vdr* mRNA levels was also observed in the brain. Despite the diminution of *vdr*, neurotrophin 3 level was not affected. Analysis of the long-term effects of such alterations of gene expression could be of interest in order to characterize physiological impact of the vitamin D deficiency in brain.

In conclusion, we developed an experimental model of DU chronically exposed rats whose vitamin D level is affected without any modification of the mineral homeostasis. Even

though the molecular mechanisms are not elucidated yet, our data showed that DU alters gene expression. Besides vitamin D rickets and high prevalence of vitamin D insufficiency have been suggested to increase these last few years [48,49], it would thus be interesting to check for a chronic environmental uranium exposure in some area.

Acknowledgments

The authors thank T. Loiseau and C. Baudelin for their assistance during animal exposure and experimentation. This study was part of the ENVIRHOM research program supported by the Institute for Radioprotection and Nuclear Safety (IRSN).

References

[1] A. Bleise, P.R. Danesi, W. Burkart, Properties, use and health effects of depleted uranium (DU): a general overview, J. Environ. Radioact. 64 (2003) 93–112.
[2] H. Bem, F. Bou-Rabee, Environmental and health consequences of depleted uranium use in the 1991 Gulf War, Environ. Int. 30 (2004) 123–134.
[3] E. Craft, A. Abu-Qare, M. Flaherty, M. Garofolo, H. Rincavage, M. Abou-Donia, Depleted and natural uranium: chemistry and toxicological effects, J. Toxicol. Environ. Health, Part B. Crit. Rev. 7 (2004) 297–317.
[4] Y.D. La Touche, D.L. Willis, O.I. Dawydiak, Absorption and biokinetics of U in rats following an oral administration of uranyl nitrate solution, Health Phys. 53 (1987) 147–162.
[5] D.E. McClain, K.A. Benson, T.K. Dalton, J. Ejnik, C.A. Emond, S.J. Hodge, J.F. Kalinich, M.A. Landauer, A.C. Miller, T.C. Pellmar, M.D. Stewart, V. Villa, J. Xu, Biological effects of embedded depleted uranium (DU): summary of armed forces radiobiology research institute research, Sci. Total Environ. 274 (2001) 115–118.
[6] P. Lestaevel, P. Houpert, C. Bussy, B. Dhieux, P. Gourmelon, F. Paquet, The brain is a target organ after acute exposure to depleted uranium, Toxicology 212 (2005) 219–226.
[7] M. Pasanen, S. Lang, A. Kojo, V.M. Kosma, Effects of simulated nuclear fuel particles on the histopathology and CYP enzymes in the rat lung and liver, Environ. Res. 70 (1995) 126–133.
[8] Y. Gueguen, M. Souidi, C. Baudelin, N. Dudoignon, S. Grison, I. Dublineau, C. Marquette, P. Voisin, P. Gourmelon, J. Aigueperse, Short-term hepatic effects of depleted uranium on xenobiotic and bile acid metabolizing cytochrome P450 enzymes in the rat, Arch. Toxicol. (2005) 1–9.
[9] M. Souidi, Y. Gueguen, C. Linard, N. Dudoignon, S. Grison, C. Baudelin, C. Marquette, P. Gourmelon, J. Aigueperse, I. Dublineau, In vivo effects of chronic contamination with depleted uranium on CYP3A and associated nuclear receptors PXR and CAR in the rat, Toxicology 214 (2005) 113–122.
[10] Y.J. Moon, A.K. Lee, H.C. Chung, E.J. Kim, S.H. Kim, D.C. Lee, I. Lee, S.G. Kim, M.G. Lee, Effects of acute renal failure on the pharmacokinetics of chlorzoxazone in rats, Drug Metab. Dispos. 31 (2003) 776–784.
[11] D.W. Nebert, D.W. Russell, Clinical importance of the cytochromes P450, Lancet 3 (60) (2002) 1155–1162.
[12] A.S. Dusso, A.J. Brown, E. Slatopolsky, Vitamin D, Am. J. Physiol., Renal Physiol. 289 (2005) F8–F28.
[13] A.J. Brown, A. Dusso, E. Slatopolsky, Vitamin D, Am. J. Physiol. 277 (1999) F157–F175.
[14] D.E. Prosser, G. Jones, Enzymes involved in the activation and inactivation of vitamin D, Trends Biochem. Sci. 29 (2004) 664–673.
[15] J.P. van Leeuwen, M. van Driel, G.J. van den Bemd, H.A. Pols, Vitamin D control of osteoblast function and bone extracellular matrix mineralization, Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr. 11 (2001) 199–226.
[16] T.T. Lambers, R.J. Bindels, J.G. Hoenderop, Coordinated control of renal Ca2+ handling, Kidney Int. 69 (2006) 650–654.
[17] K.S. Chen, H.F. DeLuca, Cloning of the human 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D-3 24-hydroxylase gene promoter and identification of two vitamin D-responsive elements, Biochim. Biophys. Acta. 1263 (1995) 1–9.
[18] C.M. Quinn, W. Jessup, J. Wong, L. Kritharides, A.J. Brown, Expression and regulation of sterol 27-hydroxylase (CYP27A1) in human macrophages: a role for RXR and PPARgamma ligands, Biochem. J. 385 (2005) 823–830.
[19] W. Chen, J.Y. Chiang, Regulation of human sterol 27-hydroxylase gene (CYP27A1) by bile acids and hepatocyte nuclear factor 4alpha (HNF4alpha), Gene 313 (2003) 71–82.
[20] M. Crestani, E. De Fabiani, D. Caruso, N. Mitro, F. Gilardi, A.B. Vigil Chacon, R. Patelli, C. Godio, G. Galli, LXR (liver X receptor) and HNF-4 (hepatocyte nuclear factor-4): key regulators in reverse cholesterol transport, Biochem. Soc. Trans. 32 (2004) 92–96.
[21] S.M. Post, H. Duez, P.P. Gervois, B. Staels, F. Kuipers, H.M. Princen, Fibrates suppress bile acid synthesis via peroxisome proliferator-activated receptor-alpha-mediated downregulation of cholesterol 7alpha-hydroxylase and sterol 27-hydroxylase expression, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 21 (2001) 1840–1845.
[22] Y.P. Rao, Z.R. Vlahcevic, R.T. Stravitz, D.H. Mallonee, J. Mullick, N.G. Avadhani, P.B. Hylemon, Down-regulation of the rat hepatic sterol 27-hydroxylase gene by bile acids in transfected primary hepatocytes: possible role of hepatic nuclear factor 1alpha, J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 70 (1999) 1–14.
[23] E. Garcion, N. Wion-Barbot, C.N. Montero-Menei, F. Berger, D. Wion, New clues about vitamin D functions in the nervous system, Trends Endocrinol. Metab. 13 (2002) 100–105.
[24] E. Tissandie, Y. Gueguen, J.M. Lobaccaro, F. Paquet, J. Aigueperse, M. Souidi, Effects of depleted uranium after short-term exposure on vitamin D metabolism in rat, Arch. Toxicol. 80 (2006) 473–480.
[25] J.G. Hoenderop, D. Muller, A.W. Van Der Kemp, A. Hartog, M. Suzuki, K. Ishibashi, M. Imai, F. Sweep, P.H. Willems, C.H. Van Os, R.J. Bindels, Calcitriol controls the epithelial calcium channel in kidney, J. Am. Soc. Nephrol. 12 (2001) 1342–1349.
[26] R.K. Gill, S. Christakos, Identification of sequence elements in mouse calbindin-D28k gene that confer 1,25-dihydroxyvitamin D3- and butyrate-inducible responses, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90 (1993) 2984–2988.
[27] J.G. Hoenderop, O. Dardenne, M. Van Abel, A.W. Van Der Kemp, C.H. Van Os, R. St -Arnaud, R.J. Bindels, Modulation of renal Ca2+ transport protein genes by dietary Ca2+ and 1,25-dihydroxyvitamin D3 in 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase knockout mice, FASEB J. 16 (2002) 1398–1406.
[28] I. Neveu, P. Naveilhan, C. Baudet, P. Brachet, M. Metsis, 1,25-dihydroxyvitamin D3 regulates NT-3, NT-4 but not BDNF mRNA in astrocytes, NeuroReport 6 (1994) 124–126.
[29] R. Juntunen, Etela-Suomen Kallioporakaivojen uraani-ja radon-tukimukeset (Uranium and radon in wells drilled into bedrock in southern Finland), Report of investigation 98. Espoo: Geologian Tutkimuskimusteskus (1991).
[30] F. Paquet, P. Houpert, E. Blanchardon, O. Delissen, C. Maubert, B. Dhieux, A.M. Moreels, S. Frelon, P. Gourmelon, Accumulation and distribution of uranium in rats after chronic exposure by ingestion, Health Phys. 90 (2006) 139–147.
[31] M. Souidi, M. Parquet, C. Lutton, Improved assay of hepatic microsomal cholesterol 7 alpha-hydroxylase activity by the use of hydroxypropyl-beta-cyclodextrin and an NADPH-regenerating system, Clin. Chim. Acta 269 (1998) 201–217.
[32] M. Souidi, M. Parquet, J. Ferezou, C. Lutton, Modulation of cholesterol 7alpha-hydroxylase and sterol 27-hydroxylase activities by steroids and physiological conditions in hamster, Life Sci. 64 (1999) 1585–1593.
[33] P.H. Anderson, P.D. O'Loughlin, B.K. May, H.A. Morris, Modulation of CYP27B1 and CYP24 mRNA expression in bone is independent of circulating 1,25(OH)2D3 levels, Bone 36 (2005) 654–662.
[34] E. Lewin, B. Garfia, F.L. Recio, M. Rodriguez, K. Olgaard, Persistent downregulation of calcium-sensing receptor mRNA in rat parathyroids when severe secondary hyperparathyroidism is reversed by an isogenic kidney transplantation, J. Am. Soc. Nephrol. 13 (2002) 2110–2116.

[35] P. Kurttio, H. Komulainen, A. Leino, L. Salonen, A. Auvinen, H. Saha, Bone as a possible target of chemical toxicity of natural uranium in drinking water, Environ. Health Perspect. 113 (2005) 68–72.
[36] P. Kurttio, A. Auvinen, L. Salonen, H. Saha, J. Pekkanen, I. Makelainen, S.B. Vaisanen, I.M. Penttila, H. Komulainen, Renal effects of uranium in drinking water, Environ. Health Perspect. 110 (2002) 337–342.
[37] V. Stefanovic, M.A. Ivic, S. Strahinjic, Calcium and phosphate metabolism in uranyl nitrate-induced acute renal failure, Arch. Int. Physiol. Biochim. 95 (1987) 223–228.
[38] E. Carafoli, R. Tiozzo, I. Pasquali-Ronchetti, R. Laschi, A study of Ca 2+ metabolism in kidney mitochondria during acute uranium intoxication, Lab. Invest. 25 (1971) 516–527.
[39] A.M. Ubios, M.B. Guglielmotti, T. Steimetz, R.L. Cabrini, Uranium inhibits bone formation in physiologic alveolar bone modeling and remodeling, Environ. Res. 54 (1991) 17–23.
[40] A.P. Gilman, D.C. Villeneuve, V.E. Secours, A.P. Yagminas, B.L. Tracy, J.M. Quinn, V.E. Valli, R.J. Willes, M.A. Moss, Uranyl nitrate: 28-day and 91-day toxicity studies in the Sprague–Dawley rat, Toxicol. Sci. 41 (1998) 117–128.
[41] A.P. Gilman, D.C. Villeneuve, V.E. Secours, A.P. Yagminas, B.L. Tracy, J.M. Quinn, V.E. Valli, M.A. Moss, Uranyl nitrate: 91-day toxicity studies in the New Zealand white rabbit, Toxicol. Sci. 41 (1998) 129–137.
[42] S. Fukuda, M. Ikeda, M. Chiba, K. Kaneko, Clinical Diagnostic Indicators Of Renal And Bone Damage In Rats Intramuscularly Injected With Depleted Uranium, Radiat. Prot. Dosim. 118 (2006) 307–314.
[43] H.L. Brenza, H.F. DeLuca, Regulation of 25-hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase gene expression by parathyroid hormone and 1,25-dihydroxy-vitamin D3, Arch. Biochem. Biophys. 381 (2000) 143–152.
[44] M.M. Brzoska, J. Moniuszko-Jakoniuk, Bone metabolism of male rats chronically exposed to cadmium, Toxicol. Appl. Pharmacol. 207 (2005) 195–211.
[45] E. Tissandie, Y. Gueguen, J.M. Lobaccaro, J. Aigueperse, P. Gourmelon, F. Paquet, M. Souidi, Chronic contamination with (137)Cesium affects Vitamin D(3) metabolism in rats, Toxicology 225 (2006) 75–80.
[46] J.L. Omdahl, A.P. Evan, Kidney mitochondrial metabolism of 25-hydroxyvitamin D3. Evaluation of in vitro cation modulation, Arch. Biochem. Biophys. 184 (1977) 179–188.
[47] M. Berglund, A. Akesson, P. Bjellerup, M. Vahter, Metal–bone interactions, Toxicol. Lett. 112–113 (2000) 219–225.
[48] S.J. Whiting, M.S. Calvo, Dietary recommendations to meet both endocrine and autocrine needs of Vitamin D, J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 97 (2005) 7–12.
[49] D.J. Raiten, M.F. Picciano, Vitamin D and health in the 21st century: bone and beyond. Executive summary, Am. J. Clin. Nutr. 80 (2004) 1673S–1677S.
[50] P.H. Anderson, P.D. O'Loughlin, B.K. May, H.A. Morris, Quantification of mRNA for the vitamin D metabolizing enzymes CYP27B1 and CYP24 and vitamin D receptor in kidney using real-time reverse transcriptase- polymerase chain reaction, J. Mol. Endocrinol. 31 (2003) 123–132.
[51] T. Su, D.J. Waxman, Impact of dimethyl sulfoxide on expression of nuclear receptors and drug-inducible cytochromes P450 in primary rat hepatocytes, Arch. Biochem. Biophys. 424 (2004) 226–234.
[52] A. Ropenga, A. Chapel, M. Vandamme, N.M. Griffiths, Use of reference gene expression in rat distal colon after radiation exposure: a caveat, Radiat. Res. 161 (2004) 597–602.

Conclusions

Un modèle animal, mimant la contamination chronique des populations exposées à l'uranium, a été utilisé pour la première fois pour montrer que l'ingestion chronique d'une faible dose d'UA peut affecter le niveau de vitamine D_3 active, $1,25(OH)_2D_3$, sans modifier l'homéostasie minérale. Cette étude montre que ce radionucléide peut induire des modifications moléculaires des CYPs et des récepteurs nucléaires impliqués dans le métabolisme de la vitamine D non seulement au niveau du foie et du rein mais également au niveau du métabolisme indépendant dans le cerveau.

L'analyse des paramètres sanguins révèle qu'une contamination chronique à l'UA entraîne une diminution du taux de $1,25(OH)_2D_3$, sans modification du taux de $25(OH)_2D_3$. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus suite à la contamination à de fortes doses d'UA. Cependant les deux types d'exposition aigue et chronique ne mettent pas en jeu les mêmes mécanismes biologiques. En effet, à l'inverse de la contamination aiguë à l'UA qui agit plus particulièrement sur les CYPs impliquées dans la biosynthèse de la vitamine D (CYP27A1, CYP2R1, CYP27B1), la contamination chronique à l'UA agit sur la CYP24A1 impliquée dans sa dégradation et sur le récepteur à la vitamine D, VDR.

Dans le rein, les expressions géniques de *vdr,* le principal récepteur nucléaire régulant la transcription de *cyp24a1*, et de *rxrα,* son partenaire obligatoire sont diminuées chez les rats contaminés à l'UA. La transcription du gène codant la *cyp24a1* étant induite par $1,25(OH)_2D_3$ *via* son interaction avec VDR, la diminution de l'expression de *cyp24a1* pourrait être due à la baisse simultanée du niveau plasmatique de $1,25(OH)_2D_3$ et du taux des ARNm *vdr et rxrα*. Cette hypothèse est particulièrement plausible dans la mesure où le niveau d'expression d'autres gènes cibles de la vitamine D (*ecac1*, *cabp-28k*, et *ncx1*) impliqués dans le transport du calcium dans le rein est également diminué chez les rats traités.

Au vu des effets observés sur le métabolisme de la vitamine D, le rôle respectif des composantes radiologique et chimique de l'uranium est une question importante. Une étude réalisée après ingestion chronique d'UE qui possède une toxicité chimique identique à celle de l'UA et une toxicité radiologique plus importante permettra de mettre en évidence l'impact radiologique de l'uranium sur ce métabolisme.

3) Article 3 – L'uranium enrichi affecte l'expression de VDR et de RXR au niveau rénal chez le rat.

(**Tissandié E**, Guéguen Y, Lobaccaro JMA, Grandcolas L, Aigueperse J, Gourmelon P and Souidi M. Article en révision dans "*Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*").

Présentation du contexte scientifique

L'uranium possède une toxicité chimique due à sa nature de métal lourd et une toxicité radiologique due à sa nature de radioélément. L'étude précédente révèle qu'une exposition chronique à l'UA affecte le métabolisme de la vitamine D. Les effets biologiques observés sont probablement dûs à ses propriétés chimiotoxiques. En effet, dans la mesure où l'UA possède les mêmes propriétés chimiques que l'uranium naturel mais est 60% moins radioactif, la chimiotoxicité est prépondérante. De plus, d'autres métaux lourds tels que le cadmium, le strontium ou le plomb peuvent perturber le métabolisme de la vitamine D. Cependant la radiotoxicité résiduelle de l'UA ne peut pas être totalement négligée. Afin d'identifier les effets biologiques causés par la toxicité radiologique de l'uranium, nous proposons d'étudier les conséquences biologiques d'une ingestion chronique d'UE sur le métabolisme de la vitamine D.

Afin de réaliser ce travail, des rats mâles adultes, Sprague-Dawley, âgés d'environ 12 semaines, sont contaminés, pendant 9 mois, par ingestion d'eau minérale supplémentée en UE sous forme de nitrate d'uranyl, à la concentration de 40 mg U l^{-1} (4.24 % d'^{235}U, activité spécifique = 66.3 kBq.g^{-1}). L'espèce chimique de l'UE est identique à celle de l'UA. En effet, la solution d'UE ajoutée à l'eau de boisson se présente sous la même forme chimique et au même pH que la solution d'UA. Seule son activité spécifique (66.3 kBq.g^{-1}) qui est quatre fois plus élevée que celle de l'UA est différente (14.7 KBq.g^{-1}).

Comme VDR et RXRα semblent des cibles privilégiées de l'uranium, nous avons analysé l'expression génique et l'accumulation protéique de ces deux récepteurs nucléaires, non seulement au niveau du rein mais également au niveau intestinal, un organe cible important pour la 1,25$(OH)_2D_3$. En parallèle, le niveau d'expression des gènes cibles de la vitamine D impliqués dans le transport du calcium au niveau rénal (*ecac1, Epithelials Ca2+ channel 1, cabp-d28k, Calbindin-D28K) et intestinal,* (*ecac2, Epithelials Ca2+ channel 2, cabp-d9k, Calbindin-D9K)* a été mesuré.

Article 3- Enriched uranium affects the expression of vitamin D receptor and retinoid X receptor in rat kidney.

Article sous presse dans « *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* ».

Tissandié E, Guéguen Y, Lobaccaro JMA, Grandcolas L, Aigueperse J, Gourmelon P and Souidi M.

Enriched uranium affects the expression of vitamin D receptor and retinoid X receptor in rat kidney.

Tissandié E[1], Guéguen Y[1], Lobaccaro JMA[2], Grandcolas L[1], Aigueperse J[1], Gourmelon P[1], Souidi M[1*].

[1] Institute for Radiological protection and Nuclear Safety. Radiological Protection and Human health Division. Radiobiology and Epidemiology Department. Laboratory of Experimental Toxicology. BP n°17, F-92262 Fontenay-aux-Roses CEDEX, France.

[2] Compared Physiology and Molecular Endocrinology, UMR Université Blaise Pascal-CNRS 6547, 24 avenue des Landais, F-63177 Aubière Cedex.

***To whom correspondence should be addressed:** Institute for Radiological protection and Nuclear Safety. Radiological Protection and Human health Division. Radiobiology and Epidemiology Department. Laboratory of Experimental Toxicology. BP n°17, F-92262 Fontenay-aux-Roses CEDEX, France. Tel: 33 - 1 58 35 91 94; Fax: 33 - 1 58 35 84 67.

e-mail : maamar.souidi@irsn.fr

Running title: Effect of enriched uranium on vitamin D metabolism

The abbreviations used are: 1,25$(OH)_2D_3$, 1α,25-dihydroxyvitamin D_3; 25$(OH)D_3$, 25-hydroxyvitamin D3; CaBP-D28k, Calbindin-D28k; CaBP-D9k, Calbindin-D9k; CYP, cytochrome P450; DU, depleted uranium; ECaC1, Epithelial Ca^{2+} channel 1; ECaC2, Epithelial Ca^{2+} channel 2; EU, enriched uranium; NCX1, Na^+/Ca^{2+} exchanger 1; NT3, neurotrophin 3; PTH, parathyroid hormone; RXR, retinoid X receptor; VDR, vitamin D receptor.

Abstract

An increasing awareness of the radiological impact of the nuclear power industry and other nuclear technologies is observed nowadays on general population. This led to renew interest to assess the health impact of the use of enriched uranium (EU). The aim of this work was to investigate *in vivo* the effects of a chronic exposure to EU on vitamin D_3 metabolism, a hormone essential in mineral and bone homeostasis. Rats were exposed to EU in their drinking water for 9 months at a concentration of 40 $mg.l^{-1}$ (1 mg/rat/day). The contamination did not change vitamin D plasma level. Vitamin D receptor (*vdr*) and retinoid X receptor alpha (*rxrα*) , encoding nuclear receptors involved in the biological activities of vitamin D, showed a lower expression in kidney, while their protein levels were paradoxically increased. Gene expression of vitamin D target genes, *ecac1* (epithelial Ca^{2+} channel 1) and *cabp-d28k* (Calbindin-D28k), involved in renal calcium transport were decreased. Among the vitamin D target organs examined, these molecular modifications occurred exclusively in the kidney, which confirms that this organ is highly sensitive to uranium exposure.

In conclusion, this study showed that a chronic exposure to EU affects both mRNA and protein expressions of renal nuclear receptors involved in vitamin D metabolism, without any modification of the circulating vitamin D.

Keywords: enriched uranium; cytochrome P450; vitamin D_3; vitamin D receptor; chronic contamination, retinoid X receptor.

1. Introduction

Uranium is the heaviest naturally occurring element, found in small amounts in soil, rock, surface water and groundwater [1]. However, environmental levels of uranium have increased over the last years as a result of human activity such as mill tailings, which is primarily the sandy process waste material from a conventional mill, nuclear industry and military activities [2, 3]. Enrichment processes transform the natural uranium into two products: enriched uranium (EU) containing the higher amount of the fissionable isotope ^{235}U and depleted uranium (DU) with a lower ^{235}U content [4]. Uranium can enter the human body through inhalation, ingestion, or penetration through the skin [5]. Ingestion from food or water is the main source of internally deposited uranium in the general population [6, 7]. It is both an alpha-emitter with a radiotoxic potential and a heavy metal with a chemotoxic potential. The major health effect of depleted or natural uranium exposure has been reported to be chemical kidney toxicity rather than a radiation hazard [8, 9]. However, little is known about the effects of long-term uranium exposure in humans. In animals, studies described effects of chronic exposure to DU or EU through drinking water on the central nervous system [10-13], on reproduction [14] or on xenobiotic detoxification [15]. Recently, we reported that vitamin D_3 metabolism, involved in mineral homeostasis and bone mineralization, was affected after a long-term exposure with environmental doses of DU or ^{137}Cesium (Cs), an other radionuclide [16, 17].

Vitamin D is a secosteroid hormone responsible for intestinal calcium and phosphorus absorption, mobilization of calcium from bone and renal reabsorption of calcium [18]. To exert these functions, vitamin D must be metabolized to its biologically active hormonal form, 1α,25-dihydroxyvitamin D_3 ($1,25(OH)_2D_3$) by cytochromes P450 (CYPs) enzymes. This is a two-step process which involved CYP27A1 or CYP2R1 in the liver, leading to 25-hydroxyvitamin D_3 ($25(OH)D_3$) production, the major circulating and inactive form of vitamin D. In kidney, CYP27B1 produces the active hormone ($1,25(OH)_2D_3$), which can be inactivated by CYP24A1 [19]. The biological effects of $1,25(OH)_2D_3$ are mediated through the vitamin D receptor (VDR), a member of the nuclear receptor superfamily of ligand-activated transcription factors, which could heterodimerize with the retinoid X receptor α (RXRα), which has the 9-*cis* retinoic acid as natural ligand. The resulting liganded complex could alter the transcriptional rate of target genes involved in intestinal and renal calcium transport [20]. CYP24A1 is also an important target of VDR in the kidney leading to a feed-back loop of regulation [21].

In order to dissociate the chemical toxicities and radiological effects of radioactive contaminants on vitamin D metabolism, we previously validated a model of chronically contaminated rats by DU [16] or ^{137}Cs [17], respectively. In both cases, a diminution in $1,25(OH)_2D_3$ plasma level associated with molecular modifications in liver, kidney and brain was observed. Since EU has both chemical and radiological toxicities, we raised the question whether a chronic contamination with EU may induce significant modifications of vitamin D_3 metabolism. For that purpose, rats were exposed to EU in their drinking water at a concentration of 40 $mg.l^{-1}$ (1 mg/rat/day) for 9 months. This dose of 40 $mg.l^{-1}$ was the double of the highest concentration of uranium found naturally on Earth, in some wells of Finland [22]. Hormonal and mineral analysis were performed on blood of rats chronically exposed to EU by measuring the levels of $25(OH)D_3$, $1,25(OH)_2D_3$, parathyroid hormone (PTH), an important regulator of vitamin D metabolism [23], calcium and phosphate ions. Messenger RNA and protein measurements of VDR and RXRα were performed in liver, kidney and intestine as well as in brain. Expression of *cyp27a1*, *cyp2r1*, *cyp27b1* and *cyp24a1* encoding CYPs involved in vitamin D metabolism were also measured, as well as the genes encoding the epithelial Ca^{2+} channels (*ecacs*) [24, 25], calbindins-D (*cabp-ds*) involved in renal and intestinal calcium transport [26, 27], as well as accumulation of vitamin D-dependant genes including the Na^+/Ca^{2+} exchanger (*ncx*) responsible for the extrusion of calcium in the kidney [28], and the neurotrophin 3 (*nt-3*) involved in the brain neuroprotection [29].

2. Materials and methods

2.1. Animals.

Twenty Sprague-Dawley male rats, 12 weeks old, weighting about 250g and obtained from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France) were used and divided into two groups of ten rats (control and EU-exposed). The rats were housed in pairs, with a 12-h light/12-h dark cycle (light on: 08:00 h/20:00 h) and a temperature of 22±1 °C. Water and standard rat pellets (R03 from SAFE, Augy, France) were delivered *ad libitum*. This diet contains 9000 mg/kg calcium, 6000 mg/kg phosphorus and 1500 IU/kg vitamin D_3. All experimental procedures were approved by the Animal Care Committee of the Institute of Radioprotection and Nuclear Safety and complied with French regulations for animal experimentation (Ministry of Agriculture Act No. 87-848, October 19, 1987, modified May 29, 2001).

2.2. Contamination procedures.

The rats in the experimental group were contaminated by mineral water supplemented with

enriched uranium nitrate (95.74% ^{238}U, 4.24% ^{235}U, 0.02% ^{234}U, specific activity 66.3 $kBqg^{-1}$) (AREVA, France) at a concentration of 40 $mg.l^{-1}$ (1 mg/rat/day) for 9 months. This dose of 40 $mg.l^{-1}$ was the double of the highest concentration of uranium found naturally on Earth, in some wells of Finland [22]. After 9 months of contamination, animals were anaesthetized by inhalation (TEM anaesthesia, Lormont, France) of 95% air/5% isoflurane (Forène®, Abbott France, Rungis, France) and euthanized by intracardiac puncture with a 2-ml insulin syringe to collect blood. Organs were rapidly removed, put in liquid nitrogen for RNA and protein extractions and stored at -80°C.

2.3. Biochemical assays.

Plasma calcium, inorganic phosphate, ALT, AST, creatinine and urea were measured on an automated Konelab 20 (Thermo Electron Corporation, France) system. Plasma $1,25(OH)_2D_3$ (active vitamin D) and $25(OH)D_3$ (major circulating metabolite) were assayed with a ^{125}I radioimmunoassay kit (IDS, Paris, France). Parathyroid hormone (PTH) was determined in plasma using the rat PTH IRMA Kit (DSL, Cergy Pontoise, France).

2.4. Real-time PCR.

Total RNA from the kidney, liver, duodenum and brain (cortex) was isolated using RNeasy total RNA isolation Kit or RNeasy Lipid Tissue kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) and reverse transcribed with random hexamers using Superscript II First Strand Synthesis System (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Real-time PCR was performed on an AbiPrism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) using 10 ng of template DNA for each reaction. PCR fluorescent signals were normalized to the fluorescent signal obtained from the housekeeping gene HPRT (hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase) for each sample. Sequences for the forward and reverse primers are listed in Table 1.

2.5. Western-blot analysis

Renal and duodenal total proteins were prepared by using Mammalian cell lysis kit (Sigma, Saint Quentin-Fallavier, France) following the manufacturer's instructions. Protein concentrations were measured using BioRad Protein assay kit (BioRad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France). Fifty micrograms of protein were boiled for 5 min in Laemmli buffer; then separated on a 4-12% acrylamide gradient gel (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) and transferred to nitrocellulose membranes (BioRad Laboratories). Blots were incubated with a blocking solution containing 5% skimmed-milk in phosphate-buffered saline (PBS) for 1h at room temperature and incubated with rabbit polyclonal anti-VDR antibody (1/200; Tebu-bio, Le Perray en Yvelines, France) or rabbit polyclonal RXRα (1/100; Tebu-bio) at 4°C overnight. A glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) antibody (Tebu-bio) was used as an internal control for equal protein loading. The membranes were washed four times with PBS-Tween and immunodetection was performed with a goat anti-rabbit IgG conjugated to a horseradish peroxidase (1/2000; Tebu-bio). The immunoreactive bands were detected by enhanced chemiluminescence and quantified using the LAS-3000 system (Raytest, Courbevoie, France) and Multi Gauge software (Fujifilm).

2.6. Statistical analysis

Results are reported as means ± SEM. For comparisons between two groups, the unpaired Student's *t* test was performed. The prior level of significance was set at $p<0.05$.

3. Results

3.1. General health parameters and hormonal status of the EU-exposed rats.

Physical and plasma biochemical analysis were performed on EU-exposed (1mg/rat/day, for 9 months) and control rats. As indicated in table 2, the experimental contamination of this study did not affect the final body weight or the general health status of the animals. Biochemical markers associated with liver (AST and ALT) or renal (creatinine and urea) functions were unaffected in EU-exposed rats compared to controls. Vitamin D metabolites ($1,25(OH)_2D_3$ and $25(OH)D_3$), PTH and phosphate concentrations in plasma were not altered. Conversely, calcium concentration showed a significant increase in the EU-exposed group compared with control group (2.64 mmol/l vs. 2.50 respectively, $P<0.001$).

3.2. Vitamin D metabolizing enzymes mRNA levels.

Transcript levels of CYPs enzymes involved in the biosynthesis (*cyp27a1, cyp2r1, cyp27b1*) or inactivation (*cyp24a1*) of the vitamin D were quantified by real time PCR (Fig.1). No modification in the mRNA levels of *cyp27a1*, *cyp2r1*, encoding proteins involved in the synthesis of $25(OH)D_3$, and *cyp27b1*, encoding the protein responsible for vitamin D activation, was observed in liver, kidney, and brain of the EU-exposed rats compared to controls (Fig.1A, B, D). Likewise, mRNA levels of *cyp24a1*, responsible for vitamin D inactivation and ubiquitously present in vitamin D target tissues, were unaffected in kidney and duodenum (Fig.1B, C). These data were in accordance with the normal vitamin D concentration in plasma. *Cyp24a1* was undetectable in brain in our conditions because of its too low expression level in this organ.

3.3. VDR and RXRα mRNA and protein levels.

Effects of EU-contamination on VDR and RXRα, responsible for mediating the biological activities of vitamin D in target organs, were analyzed by measuring both messenger and protein levels in kidney, duodenum and brain. As shown in figure 2, significant decreased mRNA levels of *vdr* ($P<0.01$) and *rxrα* ($P<0.05$) were observed in the kidney of EU-treated rats (by 35% and 25% respectively) compared to controls (Fig.2A). Paradoxically, western blots (Fig.2B) pointed out a 2.1- ($P<0.05$) and a 2.2 fold ($P<0.01$) increases of VDR and RXRα, respectively, in kidney (Fig.2C). Gene expression and protein accumulation of these nuclear receptors did not differ from controls in the duodenum and the brain of EU-exposed rats (Fig.2A, B)

3.4. Vitamin D-responsive genes mRNA levels.

The physiological effects of a basal lower expression of VDR and RXRα were investigated by measuring the expression of some target genes in kidney, duodenum and brain. As shown in Figure 3A, mRNA analysis of *ecac1* and *cabp-d28k* in kidney showed a basal decrease by 35% ($P<0.05$) and 73% ($P<0.05$) respectively compared to controls. In contrast, *ncx1*, *ecac2*, *capb-d9k* and *nt-3* basal mRNAs levels did not differ from controls in kidney, duodenum and brain (Fig.3A, B, C).

4. Discussion

Nowadays there is an increasing awareness of the radiological impact of the nuclear power industry and other nuclear technologies on general population. The nuclear accidents involving the processing of enriched uranium such as Tokai-mura accident may lead to the release of this radionuclide in the environment [30]. This led to renewed efforts to assess the health impact of the use of EU.

We previously described that a chronic exposure to DU or ^{137}Cs, which is associated to chemical or radiological toxicities respectively, affect vitamin D metabolism [16, 17]. We thus assumed that chronic exposure to EU, which presents both chemical and radiological toxicities, should have induced a more severe phenotype. However, paradoxical results were obtained.

Rats exposed to a slightly higher dose of what could be found in contaminated area by uranium did not develop a drastic phenotype as showed by the gross health status examination and various plasma markers analyzed. Indeed hepatic ALT and AST as well as renal creatinine and urea showed values within the normal ranges, indicating that the dose of EU used in this study was not toxic for liver and kidney in rats. The only significant variation was found for the calcium concentration in blood that was increased in the exposed animals ($P<0.001$). This isolated higher calcemia was not linked to any plasma change in the PTH or in the various circulating vitamin D. In a previous study, we reported a decrease in the active $1,25(OH)_2D_3$ plasma level of chronically exposed-rats to DU [16]. Not surprisingly, no modification of the expression of the CYPs involved in vitamin D biosynthesis (*cyp27a1, cyp2r1, cyp27b1*) and inactivation (*cyp24a1*) was seen in liver and kidney of the EU-exposed rats, which correlates with the normal concentrations of vitamin D in blood. In the brain, the local vitamin D_3 metabolism was also unaffected while previous report showed a decreased *cyp27a1* mRNA levels in the brain of DU-exposed rats. Since EU was shown to accumulate differently from DU in brain structures [10], we can expect these two radionuclides to induce differential molecular effects in this organ.

In parallel, as shown for DU, a decreased level in *vdr* and *rxrα* was observed in the kidney of EU-exposed rats, totally correlated to a lower amounts of vitamin D-target genes in kidney such as *ecac1* and *cabp-d28k* (Fig 2A and 3A) [16], even though a higher accumulation of the VDR and RXR proteins is observed, suggesting that these effects could be due to the chemical toxicity of uranium. The discrepancy between higher amount of VDR/RXR proteins and a lower expression of the target genes raises several questions regarding their functionality. Even though a defect in the vitamin D-binding cannot be ruled out, several hypotheses have been evoked: i) a variation in the phosphorylation state of the receptor that could interfere with both RXR-heterodimerization and ligand-induced transactivation; ii) an alteration in the levels of the various VDR cofactors such as the co-activators (DRIP family) or co-repressors (NCoR). Besides, heavy metals have been shown to alter the accumulation of nuclear receptors involved in xenobiotic detoxification or lipid metabolism such as the pregnane X receptor (PXR), the constitutive androstane receptor (CAR) and the peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) α [15, 31]. The paradoxical increase of VDR and RXRα protein accumulation in the kidney is probably due to a stabilization of the proteins or a decreased degradation by the proteasome system. It could also be hypothesized that a long-term exposure to uranium contamination induces a compensation mechanism to bypass the decrease in *vdr* and *rxrα* gene expression. Such mechanisms are under investigation.

Besides the effect of EU on the vitamin D regulated genes, the main result is that EU could induce this slight effects only in kidney while intestine and brain were not affected, which confirm that the kidney is the most sensitive organ affected by exposure to uranium [8].

In conclusion, our data show that a chronic exposure to EU affects vitamin D metabolism by modulating expression levels of their nuclear receptors. Although the underlying molecular

mechanism remains to be identified, these results can be of help to better understand the potential hazards of long-term uranium exposure and to develop suitable treatments for exposed individuals.

Acknowledgments

The authors thank T. Loiseau and C. Baudelin for their assistance during animal's exposure and experimentation. This study was part of the ENVIRHOM research program supported by the Institute for Radioprotection and Nuclear Safety (IRSN).

References

1. A. Durakovic. Medical effects of internal contamination with uranium, Croat. Med. J. 40 (1999) 49-66.

2. L.A. Di Lella, F. Nannoni, G. Protano, F. Riccobono, Uranium contents and (235)U/(238)U atom ratios in soil and earthworms in western Kosovo after the 1999 war, Sci. Total. Environ. 337 (2005) 109-18.

3. WHO, Depleted Uranium: Sources, Exposure and Health Effects. World Health Organization, Geneva: Department of Protection of the Human Environnment (2001) Full Report. In WHO (WHO/SDE/PHE/01.1).

4. A. Bleise, P.R. Danesi, W. Burkart, Properties, use and health effects of depleted uranium (DU): a general overview, J. Environ. Radioact. 64 (2003) 93-112.

5. ATSDR, Toxicological profile for uranium, (1999) US Public Health Service, Department of Health and Human Services, Atlanta, GA.

6. D. Brugge., J.L. de Lemos, B. Oldmixon, Exposure pathways and health effects associated with chemical and radiological toxicity of natural uranium: a review, Rev. Environ. Health. 20 (2005) 177-93.

7. D.M. Taylor, S.K. Taylor, Environmental uranium and human health, Rev. Environ. Health. 12 (1997) 147-57.

8. R.W. Leggett, The behavior and chemical toxicity of U in the kidney: a reassessment, Health Phys. 57 (1989) 365-83.

9. N.D. Priest, Toxicity of depleted uranium. Lancet 357 (2001) 244-6.

10. P. Houpert, P. Lestaevel, C. Bussy, F. Paquet, P. Gourmelon, Enriched but not depleted uranium affects central nervous system in long-term exposed rat, Neurotoxicology. 26 (2005) 1015-20.

11. P. Houpert, S. Frelon, P. Lestaevel, C. Bussy, P. Gourmelon, F. Paquet, Parental exposure to enriched uranium induced delayed hyperactivity in rat offspring, Neurotoxicology. 28 (2007) 108-113.

12. P. Lestaevel, C. Bussy, F. Paquet, B. Dhieux., D. Clarencon, P. Houpert, P. Gourmelon, Changes in sleep-wake cycle after chronic exposure to uranium in rats, Neurotoxicol. Teratol. 27 (2005) 835-40.

13. C. Bussy, P. Lestaevel., B. Dhieux, C. Amourette, F. Paquet, P. Gourmelon, P. Houpert, Chronic ingestion of uranyl nitrate perturbs acetylcholinesterase activity and monoamine metabolism in male rat brain, Neurotoxicology 27 (2006) 245-52.

14. V. Linares, M.L. Albina, M. Belles, E. Mayayo, D.J. Sanchez, J.L. Domingo, Combined action of uranium and stress in the rat. II. Effects on male reproduction, Toxicol. Lett. 158 (2005) 186-95.

15. M. Souidi, Y. Gueguen, C. Linard., N. Dudoignon, S. Grison, C. Baudelin, C. Marquette, P. Gourmelon, J. Aigueperse, I. Dublineau, In vivo effects of chronic contamination with depleted uranium on CYP3A and associated nuclear receptors PXR and CAR in the rat, Toxicology. 214 (2005) 113-22.

16. E. Tissandie, Y. Gueguen, J.M. Lobaccaro, L. Grandcolas, P. Voisin, J. Aigueperse, P. Gourmelon, M. Souidi, In vivo effects of chronic contamination with depleted uranium on vitamin D3 metabolism in rat, Biochim. Biophys. Acta. 1770 (2007) 266-72.

17. E. Tissandie, Y. Gueguen, J.M. Lobaccaro, J. Aigueperse, P. Gourmelon, F. Paquet, M. Souidi, Chronic contamination with 137Cesium affects Vitamin D3 metabolism in rats, Toxicology. 225 (2006), 75-80.

18. A.S. Dusso, A.J. Brown, E. Slatopolsky, Vitamin D, Am. J. Physiol. Renal Physiol. 289 (2005) F8-28.

19. D.E. Prosser, G. Jones, Enzymes involved in the activation and inactivation of vitamin D, Trends Biochem. Sci. 29 (2004) 664-73.

20. A.J. Brown., A. Dusso, E. Slatopolsky, Vitamin D, Am. J. Physiol. 277 (1999) F157-75.

21. K.S. Chen, H.F. DeLuca, Cloning of the human 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D-3 24-hydroxylase gene promoter and identification of two vitamin D-responsive elements, Biochim. Biophys. Acta. 1263 (1995) 1-9.

22. R. Juntunen, Etela-Suomen Kallioporakaivojen uraani-ja radon-tukimukeset (Uranium and radon in wells drilled into bedrock in southern Finland). Report of investigation 98. (1991) Espoo: Geologian Tutkimuskimusteskus.

23. H.L. Brenza, H.F. DeLuca, Regulation of 25-hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase gene expression by parathyroid hormone and 1,25-dihydroxyvitamin D3, Arch. Biochem. Biophys. 381 (2000) 143-52.

24. E. den Dekker, J.G. Hoenderop, B. Nilius, R.J. Bindels, The epithelial calcium channels, TRPV5 & TRPV6: from identification towards regulation, Cell. Calcium. 33 (2003) 497-507.

25. J.G. Hoenderop, D. Muller, A.W. Van Der Kemp, A. Hartog, M. Suzuki, K. Ishibashi, M. Imai, F. Sweep, P.H. Willems, C.H. Van Os, R.J. Bindels, Calcitriol controls the epithelial calcium channel in kidney, J. Am. Soc. Nephrol. 12 (2001) 1342-9.

26. H.M. Darwish, H.F. DeLuca, Identification of a 1,25-dihydroxyvitamin D3-response element in the 5'-flanking region of the rat calbindin D-9k gene, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 89 (1992) 603-7.

27. R.K. Gill, S. Christakos, Identification of sequence elements in mouse calbindin-D28k gene that confer 1,25-dihydroxyvitamin D3- and butyrate-inducible responses, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 90 (1993) 2984-8.

28. J.G. Hoenderop, O. Dardenne, M. Van Abel, A.W. Van Der Kemp, C.H. Van Os, R. St -Arnaud, R.J. Bindels, Modulation of renal Ca2+ transport protein genes by dietary Ca2+ and 1,25-dihydroxyvitamin D3 in 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase knockout mice, Faseb J. 16 (2002) 1398-406.

29. I. Neveu, P. Naveilhan, C. Baudet, P. Brachet, M. Metsis, 1,25-dihydroxyvitamin D3 regulates

NT-3, NT-4 but not BDNF mRNA in astrocytes, Neuroreport. 6 (1994) 124-6.

30. D. Bellis, R. Ma, N. Bramall, C.W. McLeod, Airborne emission of enriched uranium at Tokai-mura, Japan, Sci. Total Environ. 264 (2001) 283-6.

31. S.M. Alvarez, N.N. Gomez, L. Scardapane, M.W. Fornes, M.S. Gimenez, Effects of chronic exposure to cadmium on prostate lipids and morphology Biometals (2006)

32. E. Tissandie, Y. Gueguen, J.M. Lobaccaro, F. Paquet, J. Aigueperse, M. Souidi, Effects of depleted uranium after short-term exposure on vitamin D metabolism in rat, Arch. Toxicol. 80 (2006) 473-80.

33. P.H. Anderson, P.D. O'Loughlin, B.K. May, H.A. Morris, Quantification of mRNA for the vitamin D metabolizing enzymes CYP27B1 and CYP24 and vitamin D receptor in kidney using real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction, J. Mol. Endocrinol. 31 (2003) 123-32.

34. G. D. Kutuzova and H.F. DeLuca, Gene expression profiles in rat intestine identify pathways for 1,25-dihydroxyvitamin D(3) stimulated calcium absorption and clarify its immunomodulatory properties, Arch Biochem Biophys. 15 (2004) ; 432(2):152-66.

35. A. Ropenga, A. Chapel, M. Vandamme, N.M. Griffiths, Use of reference gene expression in rat distal colon after radiation exposure: a caveat, Radiat. Res. 161 (2004) 597-602.

Table 1. Primer sequences used for the qPCR analysis.

gene (accession no)	primers	5'-3'sequence	amplicon size (bp)	ref
cyp27a1	fw	GGAAGGTGCCCCAGAACAA	71	[32]
(NM178847)	rev	GCGCAGGGTCTCCTTAATCA		
cyp2r1	fw	CCGATCTTCCCCACGTCTAC	98	[32]
(XM341909)	rev	GCCATTGAGAACCACAGTTGATAT		
cyp27b1	fw	GAGATCACAGGCGCTGTGAAC	107	[33]
(NM053763)	rev	TCCAACATCAACACTTCTTTGATCA		
cyp24a1	fw	TGGATGAGCTGTGCGATGA	75	[33]
(NM201635)	rev	TGCTTTCAAAGGACCACTTGTTC		
rxrα	fw	CGCAAAGACCTGACCTACACC	133	[15]
(NM012805)	rev	TCCTCCTGCACAGCTTCCC		
vdr	fw	TGACCCCACCTACGCTGACT	79	[33]
(NM017058)	rev	CCTTGGAGAATAGCTCCCTGTACT		
ecac1	fw	CCTTTGAGCTCTTCCTTACCATCA	88	[32]
(NM053787)	rev	AAAGCAAAATAGGTTAGGTGGTACATG		
ecac 2	fw	GATGGCACGACCCTTTGGT	69	[34]
(NM053686)	rev	CTT CGG GAG GTA CTT CGA GAC A		
cabp-d9k	fw	GAAGCTGCTGATTCAGTCAGAGTTC	91	[32]
(NM012521)	rev	ATCACCGTTCTTATCCAGCTCTTTAA		
cabp-d28k	fw	GAA TTG TAG AGT TGG CCC ATG TC	75	[17]
(NM031984)	rev	ACT TCA GTT GCT GGC ATC GA		
hprt	fw	GCTCGAGATGTCATGAAGGAGA	108	[35]
(NM012583)	rev	TCAGCGCTTTAATGTAATCCAGC		
ncx 1	fw	GAA CCT CAG TGC CAG ACA CAT TT	85	[17]
(NM019268)	*rev*	CCG GTG ACA TTG CCT ATG G		
nt-3	fw	AGCAGAGGCACCCAGAGAAC	67	[17]
(NM031073)	rev	TGCAATCATCGGCTGGAAT		

fw, forward sequence ; rev, reverse sequence.

Table 2. Effects of enriched uranium on physical and biochemical parameters of rats.

	Control	enriched U-exposed
Final body weight (g)	615.7 ± 10.76	606.7 ± 12.4
Liver (g/100g body weight)	3.17 ± 0.08	3.37 ± 0.13
Kidney (g/100g body weight)	0.57 ± 0.02	0.58 ± 0.01
ALT(U/L)	55.8 ± 8.5	45.5 ± 3.5
AST (U/L)	105.0 ± 17.0	94.0 ± 8.6
Creatinine (µM)	50.4 ± 0.5	53.6 ± 0.3
Urea (mM)	5.8 ± 0.4	6.0 ± 0.2
25(OH)D3 (nmol/l)	69.6 ± 7.6	80.7 ± 4.6
1α25(OH)D3 (pmol/l)	62.8 ± 13.7	69.3 ± 18.5
PTH (pg/ml)	61.2 ± 9.0	64.8 ± 6.6
Calcium (mmol/l)	**2.5 ± 0.03**	**2.64 ± 0.02**[a]
Phosphate (mmol/l)	1.14 ± 0.05	1.25 ± 0.03

Data are the means ± SEM (n=8-10); Student t test : a, p<0.001 significantly different from control value.

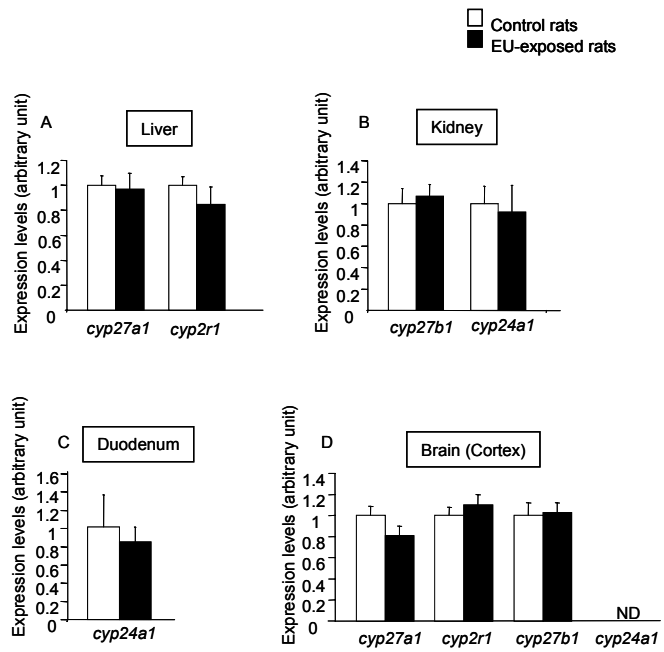


Figure 1. Gene expression of vitamin D3 cytochrome P450-metabolizing enzymes in rats chronically exposed to enriched uranium.
Relative mRNA expression levels of *cyp27a1*, *cyp2r1, cyp27b1* and *cyp24a1* measured in liver (A), kidney (B) duodenum (C) and brain cortex (D) by real-time PCR of control or EU-exposed rats. The results are expressed as a ratio to *hprt* mRNA level. Data are the means ± SEM (n=8). ND, non detectable.

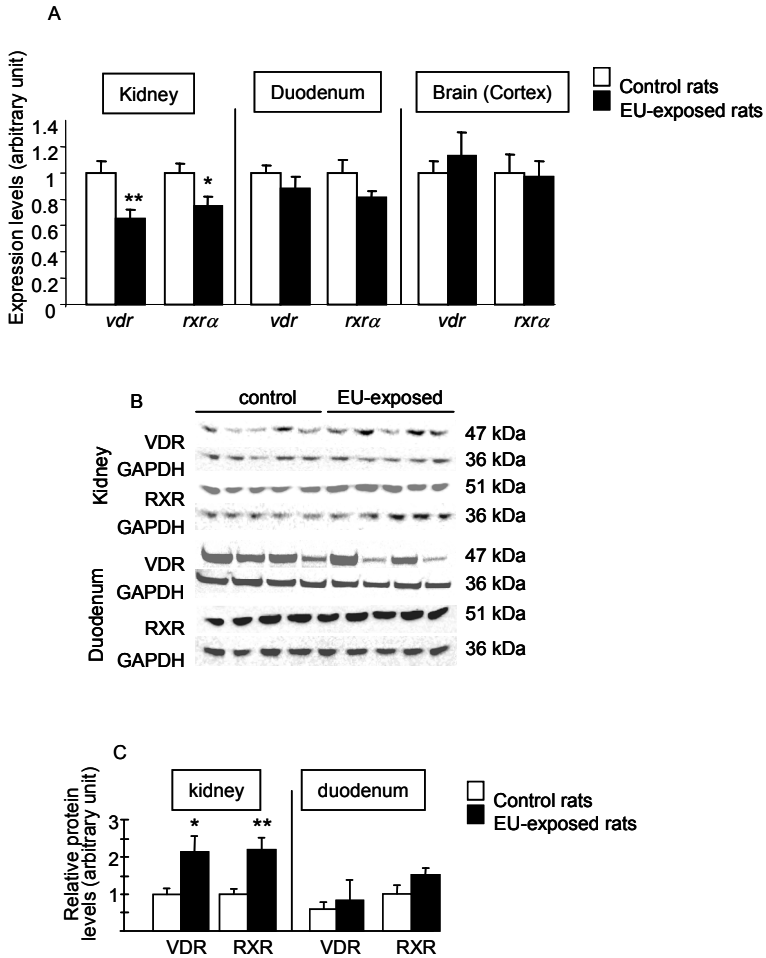


Figure 2. Effect of chronic EU ingestion on mRNA and protein expression levels of vitamin D receptor and RXRα.

(A) Relative mRNA expression levels of *vdr* and *rxrα* measured in kidney, duodenum and brain cortex by real-time PCR of control or EU-exposed rats for 9 months. The results are expressed as a ratio to *hprt* mRNA level. Data are the means ± SEM (n=8); *p<0.05 and **p<0.01 significantly different from control value. **(B)** Western-blot of VDR and RXR from both kidney and duodenum lysates obtained from control or EU-exposed rats. Blots were probed with antibodies against VDR, RXRα or GAPDH, used for normalization of sample loading. Bands were visualised by ECL. **(C)** Densitometric quantitation of western blots. The results were expressed as a relative level between control and contaminated rats. Data were expressed as mean ± SEM (n=4-5) *, P<0.05; **, P<0.01 significantly different from control value.

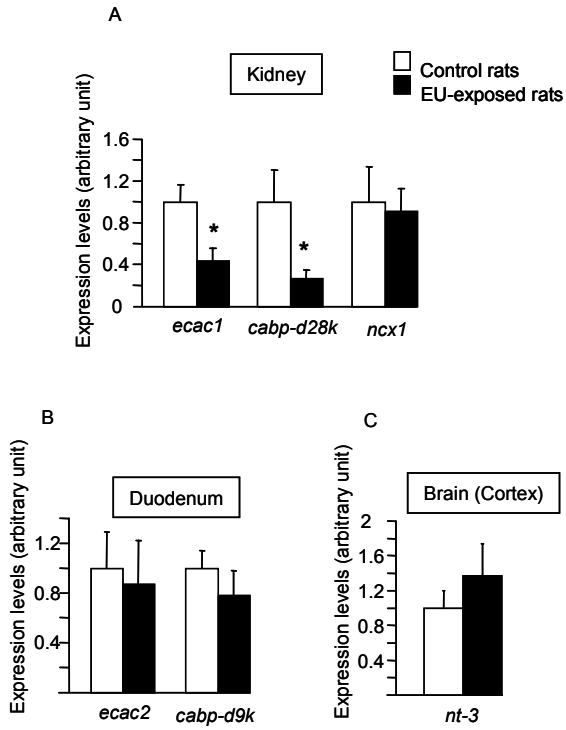


Figure 3. Effect of chronic EU ingestion on mRNA levels of Vitamin D target genes.
Relative mRNA expression levels of ecac1, cabp-d28k, ncx1 and nt-3 measured in kidney (A), duodenum (B) and brain cortex (C) by real-time PCR of control or EU-exposed rats. The results were expressed as a ratio to hprt mRNA level. Data are the means ± SEM (n=8); *$p<0.05$ significantly different from control value.

Conclusions

Cette étude démontre qu'une contamination chronique à l'UE modifie le métabolisme de la vitamine D. Dans ces conditions expérimentales, aucune modification des taux plasmatiques de créatinine et d'urée, marqueurs de la fonction rénale et des transaminases, ALAT et ASAT, marqueurs de la fonction hépatique, n'est observée chez les animaux contaminés, confirmant que la dose d'UE utilisée est ni néphrotoxique, ni hépatotoxique. L'UE induit des modifications moléculaires du métabolisme de la vitamine D uniquement au niveau rénal confirmant que le rein est l'organe le plus sensible à la contamination à l'uranium.

Du fait de la toxicité radiologique supplémentaire de l'UE par rapport à l'UA, la contamination à l'UE devrait être plus agressive. Ainsi, on s'attend à un métabolisme de la vitamine D plus sévèrement affecté. Cependant de façon surprenante, contrairement à la contamination chronique à l'UA, l'exposition à l'UE n'affecte pas le niveau plasmatique de $1,25(OH)_2D_3$. Dans le rein, la diminution de l'expression génique de *vdr* et *rxr*α, corrélée à la diminution des gènes cibles de la vitamine D *ecac1* et *cabp-d28k*, de la même manière qu'après la contamination à l'UA, suggèrent que ces effets sont dûs à la toxicité chimique de l'uranium. Par ailleurs, la modification des niveaux d'expression des gènes codant d'autres récepteurs nucléaires tels que PXR (pregnane X receptor), CAR (constitutive androstane receptor) et PPARα (peroxisome proliferator activated receptor) a déjà été rapportée suite à la contamination chronique à l'uranium et à un autre métal lourd, le cadmium. Contrairement aux taux des ARNm *vdr* et *rxr*α qui sont diminués, l'accumulation protéique des deux récepteurs nucléaires est augmentée après 9 mois de contamination à l'UE. Afin d'expliquer ces résultats, nous avons émis l'hypothèse que, dans le cas d'une contamination à long terme à l'UE, l'organisme tente de compenser la diminution de l'expression génique de *vdr* et de *rxr*α en augmentant la stabilisation des protéines ou encore en diminuant la dégradation des protéines par le protéasome.

La comparaison des effets UA/UE ne permet pas de mettre en évidence des effets propres à la toxicité radiologique de l'uranium mais semble indiquer que l'action de l'uranium sur l'accumulation de *vdr* et *rxra* est due à sa chimiotoxicité.

Un autre radionucléide, le césium 137 peut se retrouver dans l'environnement et contaminer de façon chronique les populations humaines. Il est donc nécessaire de réaliser une étude du métabolisme de la vitamine D_3 après exposition chronique au ^{137}Cs.

B. Effets du césium 137 sur le métabolisme de la vitamine D_3

4) Article 4 - Une contamination chronique au césium 137 affecte le métabolisme de la vitamine D_3 chez le rat.

(**Tissandié E**, Guéguen Y, Lobaccaro JMA, Aigueperse J, Gourmelon P, Paquet F and Souidi M. Article publié dans *"Toxicology"*, 2006)

Présentation du contexte scientifique

Dans cette étude, nous avons choisi d'étudier le métabolisme de la vitamine D en utilisant un modèle animal mimant la contamination chronique des populations exposées au ^{137}Cs, qui possède une toxicité essentiellement radiologique. La dispersion du ^{137}Cs dans l'environnement suite à l'accident de Tchernobyl, entraînant un risque de contamination chronique par ingestion des populations humaines, soulève des interrogations sur l'impact du ^{137}Cs sur la santé humaine. Si les effets du ^{137}Cs en situation de contamination aiguë et à de fortes doses sont assez bien documentés, les effets biologiques d'une exposition chronique à de petites doses de cet élément sont encore méconnus.

D'une part, la toxicité radiologique de ce radionucléide a été démontrée au niveau du foie, du rein et du cerveau qui sont les organes clés du métabolisme de la vitamine D. D'autre part, des troubles de la minéralisation osseuse et de l'homéostasie calcique sont décrits suite à l'accident de Tchernobyl après une exposition aiguë au ^{137}Cs. Enfin, une contamination chronique au ^{137}Cs stimule l'activité de la CYP27A1 impliquée non seulement dans le métabolisme du cholestérol mais également dans celui de la vitamine D. Ainsi, nous avons donc proposé d'étudier chez le rat les conséquences biologiques d'une ingestion chronique de ^{137}Cs sur les CYPs impliquées dans la biosynthèse et la dégradation de la vitamine D_3 au niveau du foie, du rein et du cerveau et sur les récepteurs nucléaires (VDR, RXRα) qui régulent l'action biologique de la vitamine D. Dans le but d'estimer l'impact physiologique du ^{137}Cs sur ce métabolisme, le niveau d'expression des gènes cibles de la vitamine D impliqués dans le transport du calcium au niveau rénal (*ecac1*, *Epithelials Ca2+ channel 1, cabp-d28k, Calbindin-D28K, ncx1, Na^+/Ca^{2+} exchanger, pmcab1,* Ca2+-ATPase) et dans la neuroprotection au niveau du cerveau (*nt-3,* neurotrophin 3) a été mesuré.

Afin de réaliser cette étude, des rats mâles adultes, Sprague-Dawley, âgés d'environ 12 semaines, ont été contaminés pendant 3 mois par ingestion d'eau minérale supplémentée en ^{137}Cs (sous forme de chlorure de césium) à la concentration de 6500 Bq/L. Si on tient compte du volume d'eau ingéré par un rat, cette dose correspond à une

ingestion quotidienne d'environ 150 Bq. Cette dose est similaire à celle ingérée par la population dans certains territoires contaminés juste après l'accident de Tchernobyl (Handl *et al*. 2003).

Article 4 - Chronic contamination with 137Cesium affects vitamin D3 metabolism in rats.

Article publié dans « *Toxicology* ».

Tissandié E, Guéguen Y, Lobaccaro JMA, Aigueperse J, Gourmelon P, Paquet F and Souidi M.

Available online at www.sciencedirect.com
SCIENCE DIRECT®
ELSEVIER
Toxicology 225 (2006) 75–80
TOXICOLOGY
www.elsevier.com/locate/toxicol

Short communication

Chronic contamination with ^{137}Cesium affects Vitamin D_3 metabolism in rats

E. Tissandie [a], Y. Guéguen [a], J.M.A. Lobaccaro [b], J. Aigueperse [a], P. Gourmelon [a], F. Paquet [a], M. Souidi [a,*]

[a] *Institute for Radiological Protection and Nuclear Safety, Radiological Protection and Human Health Division, Radiobiology and Epidemiology Department, Laboratory of Experimental Toxicology, BP No. 17, F-92262 Fontenay-aux-Roses Cedex, France*

[b] *Compared Physiology and Molecular Endocrinology, UMR Université Blaise Pascal-CNRS 6547, 24 avenue des Landais, F-63177 Aubière Cedex, France*

Received 10 April 2006; received in revised form 5 May 2006; accepted 11 May 2006
Available online 19 May 2006

Abstract

Twenty years after Chernobyl disaster, many people are still chronically exposed to low dose of ^{137}Cs, mainly through the food consumption. A large variety of diseases have been described in highly exposed people with ^{137}Cs, which include bone disorders. The aim of this work was to investigate the biological effects of a chronic exposure to ^{137}Cs on Vitamin D_3 metabolism, a hormone essential in bone homeostasis. Rats were exposed to ^{137}Cs in their drinking water for 3 months at a dose of 6500 Bq/l (approximately 150 Bq/rat/day), a similar concentration ingested by the population living in contaminated territories in the former USSR countries. Cytochromes P450 enzymes involved in Vitamin D_3 metabolism, related nuclear receptors and Vitamin D_3 target genes were assessed by real time PCR in liver, kidney and brain. Vitamin D, PTH, calcium and phosphate levels were measured in plasma. An increase in the expression level of *cyp2r1* (40%, $p < 0.05$) was observed in the liver of ^{137}Cs-exposed rats. However a significant decrease of Vitamin D (1,25(OH)D_3) plasma level (53%, $p = 0.02$) was observed. In brain, *cyp2r1* mRNA level was decreased by 20% ($p < 0.05$), while the expression level of *cyp27b1* is increased (35%, $p < 0.05$) after ^{137}Cs contamination.

In conclusion, this study showed for the first time that chronic exposure with post-accidental doses of ^{137}Cs affects Vitamin D_3 active form level and induces molecular modifications of CYPs enzymes involved its metabolism in liver and brain, without leading to mineral homeostasis disorders.
Crown Copyright © 2006 Published by Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Cesium; Cytochrome P450; Vitamin D_3; Rat

1. Introduction

Twenty years after the explosion of the Chernobyl nuclear power plant, some populations are still exposed to chronic contamination by radionuclide such as ^{137}Cs and the internal radiations are probably due to the ingestion of contaminated foods (Morita et al., 2005; Schwaiger et al., 2004). A large increase of thyroid cancers was reported in contaminated areas (Cherenko et al.,

Abbreviations: 1,25(OH)$_2$D$_3$, 1α,25-dihydroxyvitamin D_3; ^{137}Cs, cesium; ALT, alanine amino-transferase; AST, aspartate amino-transferase; CaBP-D28k, Calbindin-D28k; CYP, cytochrome P450; ECaC1, epithelial Ca^{2+} channel 1; NCX1, Na^+/Ca^{2+} exchanger; NT-3, neurotrophin 3; PMCA1b, Ca^{2+}-ATPase; PTH, parathyroid hormone; RXR, retinoid X receptor; VDR, Vitamin D receptor

* Corresponding author at: IRSN/DRPH/SRBE, B.P. No. 17, F 92262 Fontenay-aux-Roses Cedex, France. Tel.: +33 1 58 35 91 94; fax: +33 1 58 35 84 67.
E-mail address: maamar.souidi@irsn.fr (M. Souidi).

0300-483X/$ – see front matter. Crown Copyright © 2006 Published by Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.tox.2006.05.006

2004). Other studies reported that exposed population develops various malfunctions affecting the cardiovascular, nervous, immune, digestive and hepato-biliary systems (Bandazhevskaya et al., 2004; Ivanov et al., 2000; Vykhovanets et al., 2000; Shkala, 1998).

Because of the persistence of contamination with ^{137}Cs after the Chernobyl accident, questions regarding public health for the populations living in contaminated areas were raised. Indeed ^{137}Cs was shown to spread throughout the human body, in skeletal muscle, endocrine glands, heart, liver, kidney and brain (Bandazhevsky, 2003; Messiha, 1984). These reports raise the question of the cesium's radiation damage in these organs and the potential induction of physiological disorders. Today, no data on cellular and molecular effects of chronic low-level exposure to ^{137}Cs on important metabolic functions in these organs is available so far. Enlightening that fact, even though various bone diseases and impairment in bone mineralization leading to osteoporosis have been reported in animals voluntary exposed to radiations (Fritz, 1972) or in humans chronically exposed after the Chernobyl accident (Rozhinskaia et al., 1994; Kharchenko et al., 2001), no study has been performed on Vitamin D metabolism. Indeed Vitamin D is an essential component in bone health by maintaining mineral (calcium and phosphate) and bone homeostasis.

In a previous work, we reported that other radionuclide such as depleted uranium could affect Vitamin D metabolism and particularly cytochromes P450 (CYPs) enzymes involved in this metabolism (Tissandie et al., 2006). These enzymes are members of a superfamily of hemoproteins which participate in the metabolism of many drugs as well as endogenous substances such as Vitamin D. Hence, deregulations of Vitamin D metabolism could be associated to pathologies such as osteoporosis, osteomalacia or cancer (Holick, 2003).

The aim of this work was thus to investigate the possible biological effects of chronic exposure to post-accidental doses of ^{137}Cs on Vitamin D metabolism in liver and kidney as well as on the independent Vitamin D metabolism in the brain. Gene expression levels of cytochromes P450, namely *cyp27a1*, *cyp2r1*, *cyp27b1* (involved in Vitamin D synthesis), *cyp24a1* (involved in Vitamin D catabolism) and the associated nuclear receptors known to regulate these CYPs (Vitamin D receptor (VDR) and its heterodimer retinoid X receptor (RXR)) were measured by real time PCR. Expression of Vitamin D target genes involved in renal calcium transport namely epithelial Ca channel (*ecac1*), calbindin-D28K (*cabp-d28k*), Na^+/Ca^{2+} exchanger (*ncx1*), and Ca^{2+}-ATPase (*pmca1b*) (Hoenderop et al., 2002) was analysed, as well as expression of neurotrophin 3 (*nt-3*) (Garcion et al., 2002), a Vitamin D target gene in brain involved in neuroprotection. In addition, plasma levels of $1,25(OH)_2D_3$ (the active form of Vitamin D), $25(OH)D_3$ (the principal circulating form) and parathyroid hormone (PTH), an important regulator of Vitamin D metabolism, were also determined. Calcium and phosphate plasma concentrations were estimated as well.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Twenty Sprague–Dawley male rats, 12 weeks old, weighing about 250 g and obtained from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France) were divided into two groups (control and exposed) of 10 rats each. All experimental procedures were approved by the Animal Care Committee of the Institute of Radioprotection and Nuclear Safety and complied with French regulations for animal experimentation (Ministry of Agriculture Act No. 87-848, 19 October 1987, modified 29 May 2001).

2.2. Contamination procedures

In the experimental group, rats were exposed to ^{137}Cs in their drinking water for 3 months, at a dose of 6500 Bq/l (150 Bq/rat/day) (CERCA, Pierrelatte, France). In the control group, rats drank uncontaminated mineral water. After 3 months of contamination, animals were anaesthetized by inhalation (Technique et Equipement Medical (T.E.M.) anaesthesia, France) of 95% air/5% isoflurane (Forène, Abbott France, Rungis) and euthanized by intracardiac puncture with a 2-ml insulin syringe to collect blood. After the anaesthesia, organs were removed within 4–5 min, and put in liquid nitrogen for RNA extraction and stored at −80 °C.

2.3. Biochemical assays

All biological chemistry reagents are from Thermo Electron Corporation (Cergy Pontoise, France). Plasma calcium, inorganic phosphate, ALT, AST, creatinine and urea were measured on an automated Konelab 20 (Thermo Electron Corporation, France) system. Plasma $1,25(OH)_2D_3$ (active Vitamin D) and $25(OH)D_3$ (the principal circulating form) were assayed with a 1,25-Vitamin D EIA kit and a 25-hydroxyvitamin D RIA kit (Immunodiagnostic systems, Paris, France). Parathyroid hormone (PTH) was determined using the rat intact PTH ELISA Kit (Immunodiagnostic Systems, Paris, France).

2.4. Real-time PCR

Total RNA from the kidney, liver and brain (cortex) was isolated using RNeasy total RNA isolation Kit or RNeasy Lipid Tissue kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) and reverse transcribed with BD Sprint PowerScript PrePrimed 96 Plate (BD Biosciences Clontech, Erembodegem, Belgium). Real-time PCR was performed on an Abi Prism 7000 Sequence

Table 1
Primer sequences used for the qPCR analysis

Gene (accession no.)	Primers	5′–3′sequence	Amplicon size (bp)	Reference
cyp27a1 (NM178847)	fw rev	GGAAGGTGCCCCAGAACAA GCGCAGGGTCTCCTTAATCA	71	Tissandie et al. (2006)
cyp2r1 (XM341909)	fw rev	CCGATCTTCCCCACGTCTAC GCCATTGAGAACCACAGTTGATAT	98	Tissandie et al. (2006)
cyp27b1 (NM053763)	fw rev	GAGATCACAGGCGCTGTGAAC TCCAACATCAACACTTCTTTGATCA	107	Anderson et al. (2003)
cyp24a1 (NM201635)	fw rev	TGGATGAGCTGTGCGATGA TGCTTTCAAAGGACCACTTGTTC	75	Anderson et al. (2003)
rxrα (NM012805)	fw rev	CGCAAAGACCTGACCTACACC TCCTCCTGCACAGCTTCCC	133	Souidi et al. (2005)
vdr (NM017058)	fw rev	TGACCCCACCTACGCTGACT CCTTGGAGAATAGCTCCCTGTACT	79	Anderson et al. (2003)
ecac1 (NM053787)	fw rev	CCTTTGAGCTCTTCCTTACCATCA AAAGCAAAATAGGTTAGGTGGTACATG	88	Tissandie et al. (2006)
cabp-d28k (NM031984)	fw rev	GAA TTG TAG AGT TGG CCC ATG TC ACT TCA GTT GCT GGC ATC GA	75	This study
hprt (NM012583)	fw rev	GCTCGAGATGTCATGAAGGAGA TCAGCGCTTTAATGTAATCCAGC	108	Ropenga et al. (2004)
pmca1b (NM053311)	fw rev	GTT CTG GAA GGA TGG TCG TTA CTG CTT CGC CTC CAG CTC CAA	84	This study
ncx1 (NM019268)	fw rev	GAA CCT CAG TGC CAG ACA CAT TT CCG GTG ACA TTG CCT ATG G	85	This study
nt-3 (NM031073)	fw rev	AGCAGAGGCACCCAGAGAAC TGCAATCATCGGCTGGAAT	67	This study

fw, forward sequence; rev, reverse sequence.

Detection System (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) using 10 ng of template DNA for each reaction. Samples were normalized to hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase and fold-inductions calculated relative to the control. Sequences for the forward and reverse primers are listed in Table 1.

2.5. Statistical analysis

Results are reported as means ± S.E. For comparisons between two groups, the unpaired Student's *t*-test was performed. The prior level of significance was set at $p < 0.05$.

3. Results and discussion

The widespread dispersion of the ^{137}Cs after the Chernobyl accident and the physical long half-life of this radionuclide (about 30 years) resulted in an extensive contamination with ^{137}Cs of large territories. For 20 years after the Chernobyl disaster, many people have thus been chronically exposed to low doses of ^{137}Cs by the contaminated food (Vilic et al., 2005). Epidemiological studies of these populations have shown an increase in thyroid cancer (Likhtarov et al., 2005). Cardiovascular disorders (Bandazhevskaya et al., 2004) and alterations of the immune system (Vykhovanets et al., 2000) were reported in these populations. In addition, modifications of the bone mineral density have been pointed in highly exposed workers to ionizing radiation during Chernobyl accident such as liquidators, leading to osteoporosis (Kharchenko et al., 2001). It is interesting to note that bone cancers were already reported in ^{137}Cs-treated animals (Fritz, 1972). These bone alterations suggested possible disturbances in Vitamin D_3 metabolism, which occurs in liver, kidney and brain, and known to play an essential role in maintaining calcium and bone homeostasis (Dusso et al., 2005).

In order to investigate the role of cesium exposure on Vitamin D metabolism we used rats exposed to low doses of ^{137}Cs by chronic ingestion. Note that the administered dose, in the drinking water (6500 Bq/l), was similar to

Table 2
Biochemical parameters in plasma

	Control	^{137}Cs exposed
ALT (U/l)	35.6 ± 2.8	34.2 ± 4.7
AST (U/l)	71.4 ± 4.7	68.5 ± 5.3
Creatinine (μmol/l)	49.18 ± 1.11	49.29 ± 0.64
Urea (mmol/l)	6.62 ± 0.2	5.86 ± 0.26
1,25(OH)D_3 (pmol/l)	92.4 ± 17.1	44.0 ± 7[a]
25(OH)D_3 (nmol/l)	102.1 ± 9.9	98.0 ± 7.5
PTH (pg/ml)	142.6 ± 15.8	156.4 ± 12.2
Calcium (mmol/l)	2.71 ± 0.03	2.71 ± 0.06
Phosphate (mmol/l)	1.44 ± 0.07	1.48 ± 0.05

Data are the means ± S.E.M. (n = 9–10). Student's t-tests.
[a] $p = 0.02$ significantly different from control value.

those ingested by the population living in contaminated territories (Handl et al., 2003).

In a first part, biological parameters were investigated. As shown in Table 2, blood analyses showed no effect on markers of hepatic (ALT and AST) and renal function (creatinine and urea) in ^{137}Cs-exposed rats compared to control animals. These findings confirm that post-accidental doses of ^{137}Cs used in this study was not toxic for liver and kidney in rats, while previous reports on liquidators or people living in contaminated areas reported alteration of liver and kidney histology (Liubchenko et al., 1994; Romanenko et al., 2001). In addition, an increase of calcium concentration in cytoplasm of cattle erythrocytes was previously reported after Chernobyl accident (Shevchenko et al., 1993). However, in the present study, calcium and phosphate plasma level were not affected by the ^{137}Cs contamination (Table 2). These findings do not correlate with the previous studies, due to low doses ingested by day and the duration of contamination insufficient to cause similar alterations. A marked reduction in plasma 1,25$(OH)_2D_3$ level (53%, $p = 0.02$) was observed in ^{137}Cs-treated group compared with control group whereas the plasma level of 25$(OH)_2D_3$ was unaffected (Table 2). Surprisingly, the ^{137}Cs chronic contamination affects the Vitamin D_3 active form (1,25$(OH)_2D_3$) plasma level whereas PTH plasma level, an important regulator of Vitamin D metabolism is unaffected (Table 2). These observations realized in blood suggest a disruption of hepatic and/or renal Vitamin D_3 metabolism.

In the second part of this work, cytochromes P450 involved in Vitamin D_3 biosynthesis (*cyp27a1*, *cyp2r1*, *cyp27b1*) and catabolism (*cyp24a1*) in liver and kidney were investigated at the molecular level by the measurement of their mRNA levels to determine if this 3-month contamination with ^{137}Cs has a biological effect at the transcriptional level (Fig. 1). An increase of the gene expression of *cyp2r1* by 40% ($p < 0.05$), responsible of the first step of Vitamin D activation, was observed in the liver of ^{137}Cs-exposed rats when compared to control rats, without modification of others

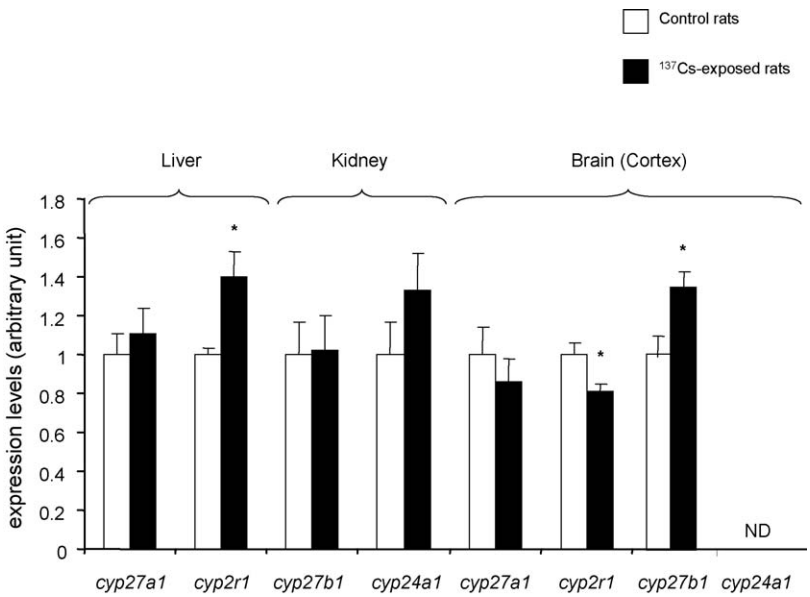


Fig. 1. Vitamin D_3 cytochrome P450-metabolizing enzymes mRNA levels in rats exposed to cesium 137 (^{137}Cs). Relative mRNA expression levels of *cyp27a1*, *cyp2r1*, *cyp27b1* and *cyp24a1* measured in liver, kidney and brain (cortex) by real-time PCR of control or ^{137}Cs-exposed rats for 3 months (150 Bq/rat/day) in their drinking water. The results are expressed as a ratio to *hprt* mRNA level. Data are the means ± S.E.M. (n = 6–8), $^{*}p < 0.05$ significantly different from control value. ND, not determined.

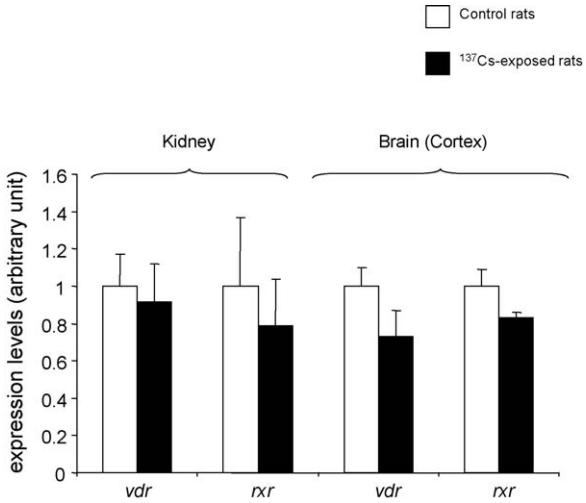


Fig. 2. mRNA level of nuclear receptors associated to Vitamin D metabolism in rats exposed to cesium 137 (^{137}Cs). Relative mRNA expression levels of *rxr* and *vdr* measured in kidney and in brain (cortex) by real-time PCR of control or ^{137}Cs-exposed rats for 3 months (150 Bq/rat/day) in their drinking water. The results are expressed as a ratio to *hprt* mRNA level. Data are the means ± S.E.M. ($n = 6$–8).

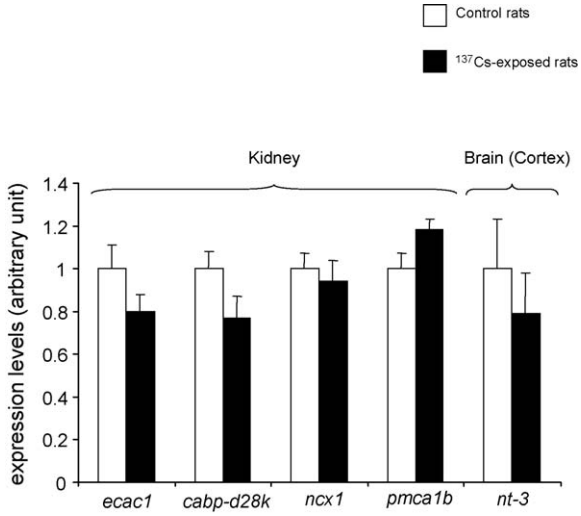


Fig. 3. mRNA level of Vitamin D target genes in rats exposed to cesium 137 (^{137}Cs). Relative mRNA expression levels of *ecac1*, *cabp-d28k*, *ncx1*, *pmca1b* and *nt-3* measured in kidney and in brain cortex by real-time PCR of control or ^{137}Cs-exposed rats for 3 months (150 Bq/rat/day) in their drinking water. The results were expressed as a ratio to *hprt* mRNA level. Data are the means ± S.E.M. ($n = 6$–8).

cytochromes P450 expression. Since CYP2R1 plays an essential role in the metabolic activation of Vitamin D_3, one hypothesis is that the increase in *cyp2r1* mRNA level may be a compensatory response to the decrease in plasma $1,25(OH)_2D_3$ level observed after 3 months of ^{137}Cs-contamination. In the brain, the local Vitamin D_3 metabolism was also affected. As shown in Fig. 1, a 20% decrease in *cyp2r1* mRNA level ($p < 0.05$) was observed, while the mRNA level of *cyp27b1*, responsible of production of the biologically active form ($1,25(OH)_2D_3$), is increased by 35% ($p < 0.05$) after ^{137}Cs contamination. These results demonstrated, for the first time, that Vitamin D_3 cytochromes P450-metabolizing enzymes could be altered by small post-accidental concentrations of ^{137}Cs chronically ingested.

In kidney and brain, gene expression of *vdr*, encoding Vitamin D receptor the principal regulator of Vitamin D_3 metabolism, was unaffected, as well as of *rxr*, encoding the retinoid X receptor, its obligate heterodimer (Fig. 2).

Similarly, no modification of the expression of Vitamin D target genes involved in calcium transport in kidney (*ecac1*, *cabp-d28k*, *ncx1*, *pmca1b*) and in neuroprotection (*nt-3*) was observed in the brain (Fig. 3).

In conclusion, an experimental animal model was efficiently used for the first time to demonstrate that chronic exposure with post-accidental doses of ^{137}Cs could affect Vitamin D_3 active form level and lead to molecular modifications of CYPs enzymes involved in Vitamin D metabolism. The absence of any significant physiological alteration of mineral homeostasis suggests that an exposure to ^{137}Cs longer than 3 months and/or a higher dose might be necessary.

Acknowledgments

The authors thank T. Loiseau, C. Baudelin and L. Grandcolas for their assistance during animal's exposure and experimentation. This study was part of the ENVIRHOM research program supported by the Institute for Radioprotection and Nuclear Safety (IRSN). JMAL is supported by grants from the CNRS, the Université Blaise Pascal, The Fondation pour la Recherche Médicale et the Fondation BNP-Paribas.

References

Anderson, P.H., O'Loughlin, P.D., May, B.K., Morris, H.A., 2003. Quantification of mRNA for the vitamin D metabolizing enzymes CYP27B1 and CYP24 and vitamin D receptor in kidney using real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. J. Mol. Endocrinol. 31, 123–132.

Bandazhevskaya, G.S., Nesterenko, V.B., Babenko, V.I., Yerkovich, T.V., Bandazhevsky, Y.I., 2004. Relationship between caesium (137Cs) load, cardiovascular symptoms, and source of food in 'Chernobyl' children—preliminary observations after intake of oral apple pectin. Swiss Med. Wkly. 134, 725–729.

Bandazhevsky, Y.I., 2003. Chronic Cs-137 incorporation in children's organs. Swiss. Med. Wkly. 133, 488–490.

Cherenko, S.M., Larin, O.S., Gorobeyko, M.B., Sichynava, R.M., 2004. Clinical analysis of thyroid cancer in adult patients exposed

to ionizing radiation due to the Chernobyl nuclear accident: 5-year comparative investigations based on the results of surgical treatment. World J. Surg. 28, 1071–1074.

Dusso, A.S., Brown, A.J., Slatopolsky, E., 2005. Vitamin D. Am. J. Physiol. Renal Physiol. 289, F8–F28.

Fritz, T., 1972. Cesium 137 late effects of single intravenous injections in beagles. ANL 7970, Argone National Laboratory Annual Report, pp. 206–208.

Garcion, E., Wion-Barbot, N., Montero-Menei, C.N., Berger, F., Wion, D., 2002. New clues about vitamin D functions in the nervous system. Trends Endocrinol. Metab. 13, 100–105.

Handl, J., Beltz, D., Botsch, W., Harb, S., Jakob, D., Michel, R., Romantschuk, L.D., 2003. Evaluation of radioactive exposure from 137Cs in contaminated areas of Northern Ukraine. Health Phys. 84, 502–517.

Hoenderop, J.G., Dardenne, O., Van Abel, M., Van Der Kemp, A.W., Van Os, C.H., St-Arnaud, R., Bindels, R.J., 2002. Modulation of renal Ca^{2+} transport protein genes by dietary Ca^{2+} and 1,25-dihydroxyvitamin D3 in 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase knockout mice. FASEB J. 16, 1398–1406.

Holick, M.F., 2003. Vitamin D: a millenium perspective. J. Cell Biochem. 88, 296–307.

Ivanov, V.K., Maksioutov, M.A., Chekin, S., Kruglova, Z.G., Petrov, A.V., Tsyb, A.F., 2000. Radiation-epidemiological analysis of incidence of non-cancer diseases among the Chernobyl liquidators. Health Phys. 78, 495–501.

Kharchenko, V.P., Rassokhin, B.M., Zubovskii, G.A., 2001. Value of bone densitometry in the determination of vertebral mineral density in participants of the clean-up after Chernobyl accident. Med. Tr. Prom. Ekol., 29–32.

Likhtarov, I., Kovgan, L., Vavilov, S., Chepurny, M., Bouville, A., Luckyanov, N., Jacob, P., Voilleque, P., Voigt, G., 2005. Post-Chernobyl thyroid cancers in Ukraine. Report 1: estimation of thyroid doses. Radiat. Res. 163, 125–136.

Liubchenko, P.N., Kovaleva, L.I., Nikolaeva, A.P., Bendikov, E.A., Dubinina, E.B., Ol'shanskii, V.A., 1994. Intrahepatic circulation in participants of clean-up after the Chernobyl Atomic Energy Plant accident. Med. Tr. Prom. Ekol., 15–17.

Messiha, F.S., 1984. Lithium, rubidium and cesium: cerebral pharmacokinetics and alcohol interactions. Pharmacol. Biochem. Behav. 21 (Suppl. 1), 87–92.

Morita, N., Takamura, N., Ashizawa, K., Shimasaki, T., Yamashita, S., Okumura, Y., 2005. Measurement of the whole-body ^{137}Cs in residents around the Chernobyl nuclear power plant. Radiat. Prot. Dosimetry 113, 326–329.

Romanenko, A., Morell-Quadreny, L., Nepomnyaschy, V., Vozianov, A., Llombart-Bosch, A., 2001. Radiation sclerosing proliferative atypical nephropathy of peritumoral tissue of renal-cell carcinomas after the Chernobyl accident in Ukraine. Virch. Arch. 438, 146–153.

Ropenga, A., Chapel, A., Vandamme, M., Griffiths, N.M., 2004. Use of reference gene expression in rat distal colon after radiation exposure: a caveat. Radiat. Res. 161, 597–602.

Rozhinskaia, L., Marova, E.I., Rassokhin, B.M., Purtova, G.S., Bukhman, A.I., Oganov, V.S., Rakhmanov, A.S., Bakulin, A.V., Rodionova, S.S., Mishchenko, B.P., 1994. Osteopenic syndrome in liquidators of the aftereffects of the accident at the Chernobyl power plant. Prob. Endokrinol. (Mosk) 40, 24–27.

Schwaiger, M., Mueck, K., Benesch, T., Feichtinger, J., Hrnecek, E., Lovranich, E., 2004. Investigation of food contamination since the Chernobyl fallout in Austria. Appl. Radiat. Isot. 61, 357–360.

Shevchenko, A.S., Kobialko, V.O., Shevchenko, T.S., Lazarev, N.M., Astasheva, N.P., Aleksakhin, R.M., 1993. Modification of Ca^{2+} metabolism in the blood cells of cattle with radiation-induced thyroid disorder after the Chernobyl nuclear power plant accident. Radiat. Biol. Radioecol. 33, 775–782.

Shkala, L.V., 1998. Metabolic disorders in digestive and hepatobiliary pathology in those who worked in the cleanup of the aftermath of the accident at the Chernobyl Atomic Electric Power Station. Lik Sprava, 42–45.

Souidi, M., Gueguen, Y., Linard, C., Dudoignon, N., Grison, S., Baudelin, C., Marquette, C., Gourmelon, P., Aigueperse, J., Dublineau, I., 2005. In vivo effects of chronic contamination with depleted uranium on CYP3A and associated nuclear receptors PXR and CAR in the rat. Toxicology 214, 113–122.

Tissandie, E., Gueguen, Y., Lobaccaro, J.M., Paquet, F., Aigueperse, J., Souidi, M., 2006. Effects of depleted uranium after short-term exposure on vitamin D metabolism in rat. Arch. Toxicol.

Vilic, M., Barisic, D., Kraljevic, P., Lulic, S., 2005. 137Cs concentration in meat of wild boars (*Sus scrofa*) in Croatia a decade and half after the Chernobyl accident. J. Environ. Radioact. 81, 55–62.

Vykhovanets, E.V., Chernyshov, V.P., Slukvin, I.I., Antipkin, Y.G., Vasyuk, A., Colos, V., 2000. Analysis of blood lymphocyte subsets in children living around Chernobyl exposed long-term to low doses of cesium-137 and various doses of iodine-131. Radiat. Res. 153, 760–772.

Conclusions

Un modèle animal, mimant la contamination chronique des populations exposées au ^{137}Cs, a été utilisé pour la première fois pour montrer que l'ingestion chronique d'une faible dose de ^{137}Cs peut affecter le niveau de vitamine D_3 active, $1,25(OH)_2D_3$, sans modifier les taux de phosphate et de calcium plasmatiques. Aucune modification des taux plasmatiques de créatinine et d'urée, marqueurs de la fonction rénale et des transaminases, ALAT et ASAT, marqueurs de la fonction hépatique, n'est observée chez les animaux contaminés, confirmant que dans ces conditions expérimentales d'exposition à de faibles quantités de ^{137}Cs, la contamination n'est pas toxique pour le foie et le rein.

De manière intéressante, l'analyse des paramètres sanguins révèle qu'une contamination chronique au ^{137}Cs entraîne une diminution du taux de $1,25(OH)_2D_3$, sans modification du taux de $25(OH)_2D_3$, de la même manière qu'après contamination à l'UA. Dans le foie et le cerveau, le niveau des ARNm *cyp2r1* et *cyp27b1* est modifié chez les rats contaminés, indiquant que la contamination au ^{137}Cs agit sur l'expression génique des enzymes qui jouent un rôle essentiel dans l'activation de la vitamine D.

Cette étude montre que la contamination au ^{137}Cs modifie le métabolisme de la vitamine D au niveau moléculaire sans conséquence physiopathologique. Cependant, les études épidémiologiques réalisées sur les populations vivant dans les territoires contaminées mettent en évidence une susceptibilité accrue des enfants face à la contamination aux ^{137}Cs. Au vue du rôle primordial du métabolisme de la vitamine D chez l'organisme en croissance, il est nécessaire dans un deuxième temps de réaliser une étude du métabolisme de la vitamine D_3 après exposition chronique au ^{137}Cs sur cette catégorie de la population.

2) Article 5 – Dysfonctionnement du métabolisme de la vitamine D_3 chez le rat suite à une contamination chronique au césium 137 durant la période de développement post-natal.

(**Tissandié E**, Guéguen Y, Lobaccaro JMA, Grandcolas L, Grison S, Aigueperse J and Souidi M. Article soumis).

Présentation du contexte scientifique

Les études épidémiologiques réalisées sur les populations vivant dans les territoires contaminés suite à l'accident de Tchernobyl rapportent une augmentation de l'incidence des cancers de la thyroïde et des pathologies non cancéreuses, telles que des troubles cardiovasculaires et des déficits immunitaires, particulièrement chez les enfants L'ensemble de ces études, qui rapportent de nombreux effets toxiques du césium en particulier chez les enfants, met en évidence une susceptibilité accrue de cette catégorie de la population face à la contamination au ^{137}Cs. Les études épidémiologiques réalisées sur des femmes allaitantes vivant dans les territoires contaminés montrent que le ^{137}Cs se retrouve dans le lait maternel et est transféré au nouveau-né. Johansson et al (Johansson *et al.* 1998) rapportent que 15% du ^{137}Cs ingéré quotidiennement par une mère *via* l'alimentation est transféré au nourrisson allaité.

L'étude précédente montre que chez un modèle de rat adulte, l'ingestion chronique d'une faible dose de ^{137}Cs peut affecter le métabolisme de la vitamine D sans modifier l'homéostasie minérale. Chez l'enfant, les troubles du métabolisme de la vitamine D peuvent conduire à des pathologies graves telles que le rachitisme qui se caractérise par un défaut de la minéralisation osseuse. Notre objectif est donc de déterminer les effets biologiques du ^{137}Cs sur le métabolisme de la vitamine D chez l'individu en croissance au niveau hépatique, rénal et intestinal. Afin de réaliser cette étude, des rats nouveau-nés ont été exposés au ^{137}Cs *via* le lait maternel issu de mères contaminées par ingestion d'eau minérale supplémentée en ^{137}Cs à la concentration de 6500 Bq/l (équivalent à 150 Bq/rat/jour). Des ratons mâles, âgés de 21 jours, correspondant à la période d'allaitement, ont été utilisés pour cette étude.

Article 5 - Vitamin D metabolism impairment in the rat's offspring following maternal exposure to cesium 137.

Article soumis

Tissandié E, Guéguen Y, Lobaccaro JMA, Grandcolas L, Grison S, Aigueperse J and Souidi M.

Vitamin D metabolism impairment in the rat's offspring following maternal exposure to cesium 137.

*Tissandie E[(1)], Guéguen Y[(1)], Lobaccaro JMA[(2)], Grandcolas L[(1)], Grison S[(1)], Aigueperse J[(1)], Souidi M[(1)]**

[(1)] Institute for Radiological protection and Nuclear Safety. Radiological Protection and Human health Division. Radiobiology and Epidemiology Department. Laboratory of Experimental Toxicology. BP n°17, F-92262 Fontenay-aux-Roses CEDEX, France.

[(2)] Compared Physiology and Molecular Endocrinology, UMR Université Blaise Pascal-CNRS 6547, 24 avenue des Landais, F-63177 Aubière Cedex.

***To whom correspondence should be addressed:** IRSN / DRPH / SRBE, B.P. n°17, F 92262 Fontenay-aux-Roses Cedex, FRANCE. Tel: 33 - 1 58 35 91 94; Fax: 33 - 1 58 35 84 67.

e-mail : maamar.souidi@irsn.fr

3 figures and 2 Tables submitted

Running title: Effect of ^{137}Cs on vitamin D_3 metabolism in rat's offspring

Keywords: cesium; cytochrome P450; vitamin D_3; rat**,** offspring

The abbreviations used are: $1,25(OH)_2D_3$, 1α,25-dihydroxyvitamin D_3; $25(OH)D_3$, 25-hydroxyvitamin D_3; ^{137}Cs, cesium; ALT, alanine amino-transferase; AST, aspartate amino-transferase; CaBP-D, Calbindin-D; CYP, cytochrome P450; ECaC, Epithelial Ca^{2+} channel ; PTH, parathyroid hormone; RXR, retinoid X receptor; VDR, vitamin D receptor.

Abstract

Previous works clearly showed that chronic contamination by ^{137}Cesium alters vitamin D metabolism. Since children are known to be a high-risk group for vitamin D metabolism disorders, effects of ^{137}Cs on vitamin D biosynthetic pathway were investigated in newborn rats. The experiments were performed in 21-day-old male offspring of dams exposed to ^{137}Cs in their drinking water at a dose of 6500 Bq/l (150 Bq/rat/day) during the lactation period. Significant modifications of blood calcium (-7%, $p<0.05$), phosphate (+80%, $p<0.01$) and osteocalcin (-25%, $p<0.05$) levels were observed in contaminated offspring, associated with an increase of blood vitamin D_3 (+25%, $p<0.01$). Besides, decreased expression levels of *cyp2r1* and *cyp27b1* (-26% and -39% respectively, $p<0.01$) were measured in liver and kidney suggesting a physiological adaptation in response to the rise in vitamin D level. Expressions of *vdr, ecac1*, *cabp-d28k, ecac2 and cabp-9k* involved in renal and intestinal calcium transport were unaffected. Altogether, these data show that early exposure to post-accidental doses of ^{137}Cs induces the alteration of vitamin D metabolism, associated with a dysregulation of the mineral homeostasis.

Keywords: 137 cesium; chronic contamination; cytochrome P450; vitamin D_3; maternal exposure

1. Introduction

In 1986, the Chernobyl accident caused significant deposition of cesium 137 (^{137}Cs) in the environment, leading to a substantial exposure of human population by consumption of contaminated food and water (Handl et al., 2003; Takatsuji et al., 2000). ^{137}Cs is both a gamma and beta emitter with a half-life of about 30 years. Cesium is a chemical analogue of potassium that is distributed relatively uniformly among the body tissues. It enters into the cell by substituting for potassium in activation of the sodium pump (Leggett et al., 2003). Radiological toxicity of this radionuclide has been demonstrated in many organs including liver (Stojadinovic and Jovanovic, 1966) and kidney (Nikula et al., 1996), both organs being responsible for the conversion of vitamin D to its active hormonal form. Recently we used an adult rat model to demonstrate that chronic exposure with post-accidental doses of ^{137}Cs affect vitamin D metabolism without any modification of the mineral homeostasis (Tissandie et al., 2006a).

Epidemiological studies realized on population living in regions contaminated by Chernobyl fallout reported that a marked increase in the incidence of thyroid cancer and non-cancer diseases, such as immunological, cardiovascular pathologies and ocular defects, occurs in children (Bandazhevskaya et al., 2004; Likhtarov et al., 2005; Sumner, 2007; Titov et al., 1995). Authors established a correlation between children ^{137}Cs burden and the increased frequency of arterial hypertension, electrocardiogram alterations and immune system dysfunctions, suggesting thus an age effect of the contamination. Hence, public health policy needs additional data regarding the potential health effects of ^{137}Cs on children. Indeed this radionuclide is found in the breast milk of mothers living in contaminated areas and can be transferred to nursing infants (Johansson et al., 1998; Thornberg and Mattsson, 2000). Johansson and al estimated that approximately 15% of the mothers'daily ^{137}Cs intake via the food is transferred to their newborns (Johansson et al., 1998).

Since children are known to be a high-risk group for vitamin D metabolism disorders, the effects of ^{137}Cs on vitamin D biosynthetic pathway were investigated in newborn rats, through the milk of lactating mothers, using a similar dose to that ingested by the population living in contaminated territories (Handl et al., 2003). Vitamin D metabolism of ^{137}Cs-contaminated offspring was evaluated by measuring plasma vitamin D status as well as gene expressions of vitamin D cytochrome P450 (CYPs) metabolizing enzymes and vitamin D nuclear receptor. Besides, we studied mRNA levels of the vitamin D-responsive genes involved in renal and intestinal calcium transport. Physiological impact was estimated by measuring mineral status and a marker of bone formation.

2. Materials and methods

2.1 Animals.

All studies were performed on offspring of nine Sprague-Dawley female rats, 12 weeks old, obtained from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France) and housed in a room on a 12-h light/12-h dark cycle (light on: 08:00 h/20:00 h) maintained at 22±1 ◦C. The dams were housed under these conditions until the birth of the pups. Water and food were delivered *ad libitum*. All experimental procedures were approved by the Animal Care Committee of the Institute of Radioprotection and Nuclear Safety and complied with French regulations for animal experimentation (Ministry of Agriculture Act No. 87-848, October 19, 1987, modified May 29, 2001).

2.2.Contamination procedures.

Rat dams (n=4) were exposed to ^{137}Cs in their drinking water at a dose of 6500 Bq/l (150 Bq/rat/day) (CERCA, Pierrelatte, France) from the day of parturition during 21 days (continuous treatment during lactation). Untreated dams (n=5) drank uncontaminated mineral water throughout the treatment period.

Twenty one day-old male offspring were anaesthetized by inhalation (Technique et Equipement Medical (T.E.M.) anaesthesia, France) of 95% air/5% isoflurane (Forène, Abbott France, Rungis) and euthanized by intracardiac puncture with a 2-ml insulin syringe to collect blood. After the anaesthesia, organs were rapidly removed, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for further RNA extraction.

2.3 Biochemical assays and histopathology.

All biological chemistry reagents were from Thermo Electron Corporation (Cergy Pontoise, France). Plasma calcium, inorganic phosphate, ALT, AST, creatinine and urea were measured on an automated Konelab 20 (Thermo Electron Corporation, France) system. Plasma $1,25(OH)_2D_3$ (active vitamin D) and $25(OH)D_3$ (the principal circulating form) were assayed with a 1,25-vitamin D EIA kit and a 25-hydroxyvitamin D RIA kit (Immunodiagnostic systems, Paris, France). Parathyroid hormone (PTH) and osteocalcin (bone formation marker) were determined using the rat intact PTH ELISA Kit (Immunodiagnostic systems, Paris, France) and the rat osteocalcin EIA Kit (IDS, Paris, France) respectively.

Thin sections of the liver and the kidney were cut in a microtome and stained with hematoxylin and eosin to be examined under a light microscope. Damage was assessed by expert

laboratory pathologist (Biodoxis, Romainville, France) on classical used criteria.

2.4 Real-time PCR.

Total RNA from the kidney, liver and duodenum was isolated using RNeasy total RNA isolation Kit or RNeasy Lipid Tissue kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) and reverse transcribed with random hexamers using Superscript II First Strand Synthesis System (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Real-time PCR was performed on an Abi Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) by using SYBR chemistry (Applied Biosystems). Ten ng of template DNA was used for each reaction. Thermoprofile conditions were: 50°C for 2 min, 95°C for 10 min and 40 cycles at 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. PCR fluorescent signals were normalized to the fluorescent signal obtained from the housekeeping gene HPRT for each sample. Sequences for the forward and reverse primers are listed in Table 1.

2.5 Statistical analysis.

Results are reported as means ± SE. For comparisons between two groups, the unpaired Student's *t* test was performed. The prior level of significance was set at $p<0.05$.

3. Results and discussion

Cesium-137 is one of the most important nuclear fission elements that contaminated the environment after the explosion of the Chernobyl nuclear power plant. Population groups of special concern are the children living in contaminated regions. The present study was carried out to evaluate the changes in hepatic and renal vitamin D metabolism of newborn rats chronically exposed to ^{137}Cs through breast-feeding and to assess the consequences on mineral status.

In a first part, physical and biochemical parameters were investigated in order to evaluate general toxicity. As indicated in table 2, body weight as well as liver and kidney weights did not significantly differ between 21-day-old ^{137}Cs-exposed offsprings and control group. No clear neonatal toxicity was pointed out. Biochemical markers associated with renal function (creatinine and urea) showed values within the normal ranges indicating that ^{137}Cs exposure was not nephrotoxic in these experimental conditions (Table 2). However, among the biochemical markers associated with liver function (AST and ALT), a slight increase of ALT serum concentration ($p<0.05$) was observed in ^{137}Cs-exposed rat offspring compared to controls (table 2). Increased serum ALT level has already been reported in rats after an acute contamination with ^{137}Cs, while the AST concentration remained unchanged (Stojadinovic and Jovanovic, 1966). In addition, mild elevations of the two aminotransferases were seen in a few patients hospitalized following both internal and external exposure to an opened $^{137}CsCl$ source (Brandao-Mello et al., 1991). Our findings confirm Stojadinovic et al results and probably indicate a moderate disruption of liver function in contaminated rat pups. Conversely, under the same experimental conditions, adult rats exposed to ^{137}Cs in their drinking water showed no hepatic toxicity as pointed out by the normal ALT and AST levels in plasma (Tissandie et al., 2006a). Such a discrepancy between the newborn toxicity and the adult safety has already been reported after maternal exposure to CsCl and transfer of Cs^+ to the nursing neonates by breast-feeding (Messiha, 1988). In parallel, no major structural change on histological analysis of both liver and kidney (data not shown).

As observed in Table 2, blood tests revealed a high hyperphosphataemia and a slight hypocalcaemia in ^{137}Cs-exposed pups. Phosphate concentration showed a significant increase by 80% (2.7 mmol/l *vs.* 1.5 for the untreated rats, $P<0.01$) after ^{137}Cs contamination whereas calcium concentration decreased by 7% (2.6 mmol/l *vs.* 2.8 for the untreated rats, $P<0.05$). An acute rise in plasma phosphate is characteristically accompanied by hypocalcaemia to avoid subsequent precipitation of calcium phosphate. Interestingly, alterations of calcium homeostasis have already been reported in cattle after Chernobyl accident (Shevchenko et al., 1993). In addition a reduced serum osteocalcin level, a marker of osteoblastic activity and bone formation rate (Yang and Grey, 2006), was observed in ^{137}Cs-exposed pups (25% compared to the non-exposed pups, $P<0.05$) (Table 2). This lower level of blood osteocalcin is associated with the decreased calcium concentration and suggests that *de novo* synthesis of bone is slower in contaminated rat offsprings. Other studies described bone disorders mineral in clean-up workers after Chernobyl accident (Kharchenko et al., 2001; Rozhinskaia et al., 1994). At last, ^{137}Cs-exposed pups showed a significant increased level of $1,25(OH)_2D_3$, the hormonally active form of vitamin D (25%, $p<0.01$; compared to control group) (Table 2). The rise in this hormone level could be a compensatory response to the hypocalcaemia and to the lower serum osteocalcin level observed in contaminated pups. Conversely, plasma levels of $25(OH)D_3$, the principal circulating form of vitamin D and PTH, an important regulator of vitamin D metabolism, are unaffected (Table 2). These findings are in line with our previous study performed in adult rats demonstrating that ^{137}Cs contamination induced $1,25(OH)_2D_3$ plasma level variations (Tissandie et al., 2006a). Finally, combined alterations of bone homeostasis and phosphate and calcium

metabolisms in ^{137}Cs-exposed offspring indicate that ^{137}Cs ingestion induces a more severe phenotype in the growing organisms rather than in the adult rats that did not show any mineral disorders (Tissandie et al., 2006a).

In the second part of the study, vitamin D metabolism and activity were investigated at the molecular level. Hepatic and renal CYPs enzymes involved in vitamin D biosynthesis (CYP27A1, CYP2R1 and CYP27B1) and catabolism (CYP24A1) were examined by the measurement of their mRNA levels, since this family of enzymes has been shown to be biological targets of Cesium and Uranium (Moon et al., 2003; Pasanen et al., 1995; Souidi et al., 2005; Tissandie et al., 2006a; Tissandie et al., 2006b). As shown in Fig. 1, a decreased gene expression level of *cyp2r1* and *cyp27b1* (26% and 39% respectively, $p<0.01$) was observed in liver and kidney of exposed pups, suggesting a physiological adaptation in response to the increase of $1,25(OH)_2D_3$ level. Besides, no modification of the levels of the mRNA encoding the vitamin D receptor (VDR), which targets $1,25(OH)_2D_3$ activity, was observed (Fig. 2) while, a significant decreased level of *rxrα*, encoding VDR heterodimer, was seen in the kidney of ^{137}Cs-exposed offsprings (25%; $p<0.001$) (Fig. 2). Despite change in $1,25(OH)_2D_3$ plasma level and in the accumulation of rxrα, ^{137}Cs contamination had no effect on mRNA levels of vitamin D target genes encoding the epithelial Ca channel (*ecac1* and *ecac2)* and the calbindin-D (*cabp-d28k* and *cabp-d9k*) involved in renal and duodenal calcium transport (Fig. 3). Hence, the decrease of calcium concentration observed in ^{137}Cs-exposed pups seems to be linked to the hyperphosphataemia, as previously suggested, rather than to a defect in renal or intestinal calcium absorption.

Altogether, these results show, that, conversely to what was observed in adults, chronic exposure with low doses of ^{137}Cs during postnatal development affects mineral homeostasis and vitamin D metabolism. Hence, this study clearly points out for the first time the greater susceptibility of the growing mammals to vitamin D metabolism disorders. Therefore, children living in contaminated territories after Chernobyl accident should be considered a high-risk group for ^{137}Cs toxicity.

Acknowledgments

The authors thank T. Loiseau and C. Baudelin for their assistance during animal's exposure and experimentation. This study was part of the ENVIRHOM research program supported by the Institute for Radioprotection and Nuclear Safety (IRSN)

Reference

Anderson, P. H., P. D. O'Loughlin, B. K. May, and H. A. Morris. 2003. Quantification of mRNA for the vitamin D metabolizing enzymes CYP27B1 and CYP24 and vitamin D receptor in kidney using real-time reverse transcriptase- polymerase chain reaction. J Mol Endocrinol 31:123-32.

Bandazhevskaya, G. S., V. B. Nesterenko, V. I. Babenko, T. V. Yerkovich, and Y. I. Bandazhevsky. 2004. Relationship between caesium (137Cs) load, cardiovascular symptoms, and source of food in 'Chernobyl' children -- preliminary observations after intake of oral apple pectin. Swiss Med Wkly 134:725-9.

Brandao-Mello, C. E., A. R. Oliveira, N. J. Valverde, R. Farina, and J. M. Cordeiro. 1991. Clinical and hematological aspects of 137Cs: the Goiania radiation accident. Health Phys 60:31-9.

Handl, J., D. Beltz, W. Botsch, S. Harb, D. Jakob, R. Michel, and L. D. Romantschuk. 2003. Evaluation of radioactive exposure from 137Cs in contaminated areas of Northern Ukraine. Health Phys 84:502-17.

Johansson, L., A. Björeland, and G. Agren. 1998. Tranfer of 137Cs to infants via human breast milk. Radiat Prot Dosimetry 79:165-67.

Kharchenko, V. P., B. M. Rassokhin, and G. A. Zubovskii. 2001. [Value of bone densitometry in the determination of vertebral mineral density in participants of the clean-up after Chernobyl accident]. Med Tr Prom Ekol:29-32.

Kutuzova, G. D., and H. F. Deluca. 2004. Gene expression profiles in rat intestine identify pathways for 1,25-dihydroxyvitamin D(3) stimulated calcium absorption and clarify its immunomodulatory properties. Arch Biochem Biophys 432:152-66.

Leggett, R. W., L. R. Williams, D. R. Melo, and J. L. Lipsztein. 2003. A physiologically based biokinetic model for cesium in the human body. Sci Total Environ 317:235-55.

Likhtarov, I., L. Kovgan, S. Vavilov, M. Chepurny, A. Bouville, N. Luckyanov, P. Jacob, P. Voilleque, and G. Voigt. 2005. Post-Chornobyl thyroid cancers in Ukraine. Report 1: estimation of thyroid doses. Radiat Res 163:125-36.

Messiha, F. S. 1988. Maternal cesium chloride ingestion and the newborn. Neurosci Biobehav Rev 12:209-13.

Moon, Y. J., A. K. Lee, H. C. Chung, E. J. Kim, S. H. Kim, D. C. Lee, I. Lee, S. G. Kim, and M. G. Lee. 2003. Effects of acute renal failure on the pharmacokinetics of chlorzoxazone in rats. Drug Metab Dispos 31:776-84.

Nikula, K. J., B. A. Muggenburg, W. C. Griffith, W. W. Carlton, T. E. Fritz, and B. B. Boecker. 1996. Biological effects of 137CsCl injected in beagle dogs of different ages. Radiat Res 146:536-47.

Pasanen, M., S. Lang, A. Kojo, and V. M. Kosma. 1995. Effects of simulated nuclear fuel particles on the histopathology and CYP enzymes in the rat lung and liver. Environ Res 70:126-33.

Ropenga, A., A. Chapel, M. Vandamme, and N. M. Griffiths. 2004. Use of reference gene expression in rat distal colon after radiation exposure: a caveat. Radiat Res 161:597-602.

Rozhinskaia, L., E. I. Marova, B. M. Rassokhin, G. S. Purtova, A. I. Bukhman, V. S. Oganov, A. S. Rakhmanov, A. V. Bakulin, S. S. Rodionova, and B. P. Mishchenko. 1994. [Osteopenic syndrome in liquidators of the aftereffects of the accident at the

Chernobyl power plant]. Probl Endokrinol (Mosk) 40:24-7.

Shevchenko, A. S., V. O. Kobialko, T. S. Shevchenko, N. M. Lazarev, N. P. Astasheva, and R. M. Aleksakhin. 1993. [Modification of Ca2+ metabolism in the blood cells of cattle with radiation-induced thyroid disorder after the Chernobyl nuclear power plant accident]. Radiats Biol Radioecol 33:775-82.

Souidi, M., Y. Gueguen, C. Linard, N. Dudoignon, S. Grison, C. Baudelin, C. Marquette, P. Gourmelon, J. Aigueperse, and I. Dublineau. 2005. In vivo effects of chronic contamination with depleted uranium on CYP3A and associated nuclear receptors PXR and CAR in the rat. Toxicology 214:113-122.

Stojadinovic, S., and M. Jovanovic. 1966. Activity of transaminases in the rat serum after internal contamination with 137Cs and 90Sr. Strahlentherapie 131:633-6.

Sumner, D. 2007. Health effects resulting from the Chernobyl accident. Med Confl Surviv 23:31-45.

Takatsuji, T., H. Sato, J. Takada, S. Endo, M. Hoshi, V. F. Sharifov, Veselkina, II, I. V. Pilenko, W. A. Kalimullin, V. B. Masyakin, A. I. Kovalev, I. Yoshikawa, and S. Okajima. 2000. Relationship between the 137Cs whole-body counting results and soil and food contamination in farms near Chernobyl. Health Phys 78:86-9.

Thornberg, C., and S. Mattsson. 2000. Increased 137Cs metabolism during pregnancy. Health Phys 78:502-6.

Tissandie, E., Y. Gueguen, J. M. Lobaccaro, J. Aigueperse, P. Gourmelon, F. Paquet, and M. Souidi. 2006a. Chronic contamination with 137Cesium affects Vitamin D3 metabolism in rats. Toxicology 225:75-80.

Tissandie, E., Y. Gueguen, J. M. Lobaccaro, F. Paquet, J. Aigueperse, and M. Souidi. 2006b. Effects of depleted uranium after short-term exposure on vitamin D metabolism in rat. Arch Toxicol 80:473-80.

Titov, L. P., G. D. Kharitonic, I. E. Gourmanchuk, and S. I. Ignatenko. 1995. Effects of radiation on the production of immunoglobulins in children subsequent to the Chernobyl disaster. Allergy Proc 16:185-93.

Yang, L., and V. Grey. 2006. Pediatric reference intervals for bone markers. Clin Biochem 39:561-8.

Table 1. Primer sequences used for the qPCR analysis.

gene (accession no)	primers	5'-3'sequence	amplicon size (bp)	ref
cyp27a1	fw	GGAAGGTGCCCCAGAACAA	71	(Tissandie et al., 2006b)
(NM178847)	rev	GCGCAGGGTCTCCTTAATCA		
cyp2r1	fw	CCGATCTTCCCCACGTCTAC	98	(Tissandie et al., 2006b)
(XM341909)	rev	GCCATTGAGAACCACAGTTGATAT		
cyp27b1	fw	GAGATCACAGGCGCTGTGAAC	107	(Anderson et al., 2003)
(NM053763)	rev	TCCAACATCAACACTTCTTTGATCA		
cyp24a1	fw	TGGATGAGCTGTGCGATGA	75	(Anderson et al., 2003)
(NM201635)	rev	TGCTTTCAAAGGACCACTTGTTC		
rxrα	fw	CGCAAAGACCTGACCTACACC	133	(Souidi et al., 2005)
(NM012805)	rev	TCCTCCTGCACAGCTTCCC		
vdr	fw	TGACCCCACCTACGCTGACT	79	(Anderson et al., 2003)
(NM017058)	rev	CCTTGGAGAATAGCTCCCTGTACT		
ecac1	fw	CCTTTGAGCTCTTCCTTACCATCA	88	(Tissandie et al., 2006b)
(NM053787)	rev	AAAGCAAAATAGGTTAGGTGGTACATG		
ecac 2	fw	GATGGCACGACCCTTTGGT	69	(Kutuzova and Deluca, 2004)
(NM053686)	rev	CTT CGG GAG GTA CTT CGA GAC A		
cabp-d9k	fw	GAAGCTGCTGATTCAGTCAGAGTTC	91	(Tissandie et al., 2006b)
(NM012521)	rev	ATCACCGTTCTTATCCAGCTCTTTAA		
cabp-d28k	fw	GAA TTG TAG AGT TGG CCC ATG TC	75	(Tissandie et al., 2006a)
(NM031984)	rev	ACT TCA GTT GCT GGC ATC GA		
hprt	fw	GCTCGAGATGTCATGAAGGAGA	108	(Ropenga et al., 2004)
(NM012583)	rev	TCAGCGCTTTAATGTAATCCAGC		

fw, forward sequence ; rev, reverse sequence.

Table 2. Biochemical parameters in plasma.

	Control	^{137}Cs-exposed
Final body weight (g)	84.7 (3.8)	81.6 (2.8)
Liver (g / 100g body weight)	4.8 (0.2)	4.6 (0.1)
Kidney (g / 100g body weight)	1.2 (0.1)	1.2(0.1)
ALT(U/L)	**42.1 (1.7)**	**47.4 (1.7)**[a]
AST (U/L)	82.1 (9.6)	91.3 (3.7)
Creatinine (µM)	36.7 (0.5)	37.1 (0.3)
Urea (mM)	6.0 (0.3)	5.9 (0.2)
25(OH)D3 (nmol/l)	181.0 (14.6)	199.1 (14.8)
1α25(OH)D3 (pmol/l)	**1056.7 (62.1)**	**1311.0 (42.7)**[b]
PTH (pg/ml)	259.9 (15.5)	262.8 (27.7)
Calcium (mmol/l)	**2.8 (0.1)**	**2.6 (0.1)**[a]
Phosphate (mmol/l)	**1.5 (0.3)**	**2.7 (0.2)**[b]
Osteocalcin (ng/ml)	**71.2 (9.2)**	**47.1 (6.8)**[a]

Data are the means +/- SEM (N=6-14). Student *t* tests : a, $p<0.05$, b, $p<0.01$ significantly different from control value.

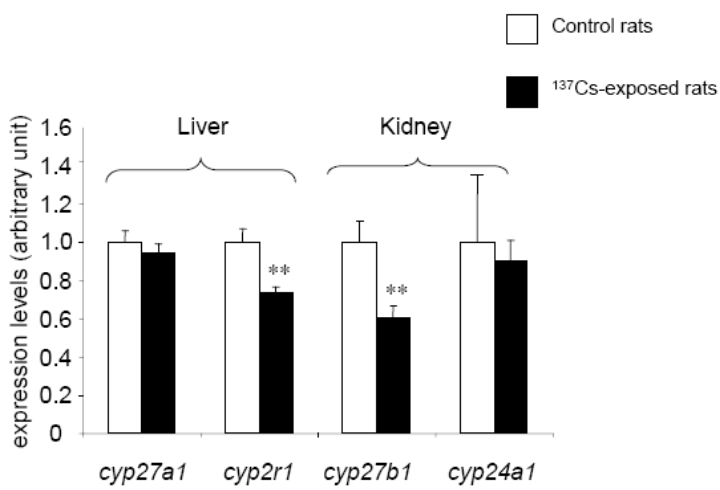


Figure 1. mRNA level vitamin D cytochrome P450-metabolizing enzymes in 137Cs-exposed rat offspring.
Relative mRNA expression levels of *cyp27a1*, *cyp2r1, cyp27b1 and cyp24a1* measured in liver and kidney by real-time PCR of control or 137Cs-exposed 21-day-old rat offspring. The results are expressed as a ratio to *hprt* mRNA level. Data are the means ± SEM (N=8); *p<0.01 significantly different from control value.

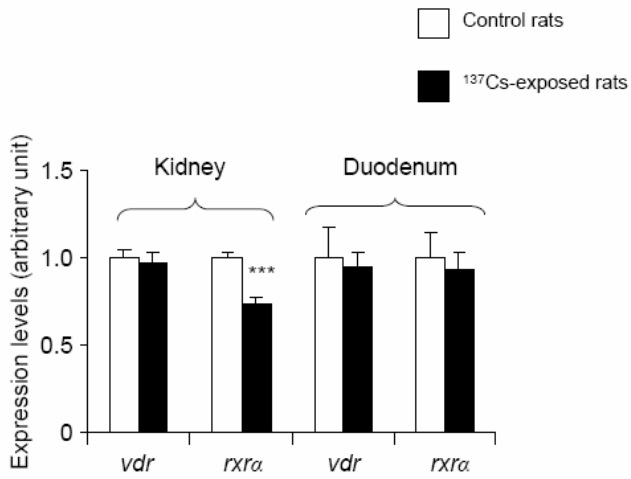


Figure 2. mRNA level of nuclear receptors associated to vitamin D metabolism in 137Cs-exposed rat offspring.
Relative mRNA expression levels of vdr and *rxrα* measured in kidney and duodenum by real-time PCR of control or *137Cs-exposed 21-day-old rat offspring. The results are expressed as a ratio to hprt* mRNA level. Data are the means ± *SEM (N=8); ***p<0.001 significantly different from control value*.

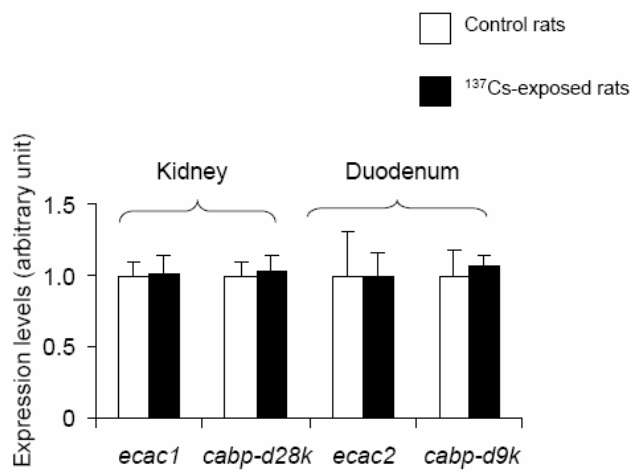


Figure 3. mRNA level of Vitamin D responsive genes in 137Cs-exposed rat offspring.
Relative mRNA expression levels of *ecac1*, *cabp-d28k, ecac2* and *cabp-d9k* measured in kidneys and duodenum by real-time PCR of control or 137Cs-exposed 21-day-old rat offspring. The results were expressed as a ratio to *hprt* mRNA level. Data are the means ± SEM (N=8).

Conclusions

Cette étude montre qu'une exposition chronique à de faibles doses de ^{137}Cs durant la période de développement post-natal affecte non seulement le métabolisme de la vitamine D au niveau hormonal et moléculaire mais modifie également l'homéostasie phosphocalcique. En effet, une augmentation du taux de phosphate, une légère diminution du taux de calcium et une diminution du taux de l'ostéocalcine sont observées chez les ratons exposés au ^{137}Cs. Dans ces conditions, plusieurs hypothèses peuvent être émises. D'une part, l'hypocalcémie observée peut être une conséquence directe de l'hyperphophatémie *via* la précipitation du calcium par le phosphate. D'autre part, la diminution du niveau de l'ostéocalcine qui est souvent associée à une baisse de la calcémie, peut mettre en évidence un défaut d'ostéoformation. Ces perturbations du statut minéral et de l'homéostasie osseuse indiquent que l'ingestion de ^{137}Cs induit un phénotype plus sévère chez l'organisme en croissance par rapport à l'adulte qui ne présente aucun trouble du statut minéral. De plus l'augmentation du taux plasmatique de $1,25(OH)_2D_3$, observée chez les ratons traités, est probablement une réponse à l'hypocalcémie et à la diminution du taux de l'ostéocalcine provoquées par la contamination au césium. En parallèle, les expressions géniques de *cyp2r1* et de *cyp27b1*, impliquées dans la synthèse de la vitamine D active, sont diminuées dans le foie et le rein suggérant une adaptation physiologique en réponse à l'augmentation du niveau plasmatique de $1,25(OH)_2D_3$.

En conclusion, ces résultats montrent qu'une exposition chronique au ^{137}Cs durant la période de développement post-natal affecte le métabolisme de la vitamine D et contrairement à ce qui avait été observé chez le modèle adulte, ces perturbations sont associées à un dysfonctionnement de l'homéostasie minérale. Ainsi, les enfants vivant dans les territoires contaminés peuvent être considérés comme un groupe à risque face à la contamination au ^{137}Cs.

Discussion générale et perspectives

I. DISCUSSION GENERALE

Le risque sanitaire d'exposition chronique des êtres humains à l'uranium ou au ^{137}Cs existe du fait de leur présence naturelle et/ou accidentelle dans l'environnement. Cependant à ce jour, très peu d'études se sont intéressées aux conséquences d'une exposition chronique à de faibles doses de ces deux radionucléides.

Les toxicités de l'uranium et du ^{137}Cs ont été démontrées au niveau du foie, du rein et du cerveau qui sont les organes clés du métabolisme de la vitamine D. De plus, une contamination aiguë ou chronique à l'uranium ou au ^{137}Cs modifie l'homéostasie osseuse et phosphocalcique. Cependant les effets de ces deux radionucléides sur le métabolisme de la vitamine D, hormone essentielle au maintien minéral de l'organisme, ne sont pas connus.

Notre travail a démontré que le métabolisme de la vitamine D est bien une cible de l'uranium et du ^{137}Cs, même après contamination chronique. Cependant de par leurs caractéristiques chimiques et radiologiques différentes et de par leurs propriétés différentes d'accumulation dans l'organisme, il paraît difficile de comparer leurs effets biologiques. C'est pourquoi, les effets de l'uranium et du ^{137}Cs sur le métabolisme de la vitamine D seront discutés séparément.

A. Caractérisation des effets de l'uranium sur le métabolisme de la vitamine D

Nous avons suivi une démarche toxicologique classique qui consistait, dans un premier temps, à identifier les principales cibles moléculaires de ce radionucléide suite à une contamination aiguë à fortes doses d'uranium et à court terme, et dans un deuxième temps, à mettre en évidence des effets aux plus fortes concentrations environnementales. L'uranium apparaît comme un toxique très particulier de par sa double toxicité chimique, due à sa nature de métal lourd, et radiologique, due à sa nature de radioélément. C'est pourquoi, afin d'évaluer la part des deux types de toxicités, nous avons étudié les conséquences biologiques d'une ingestion chronique d'UA et d'UE.

Les études *in vivo* et *in vitro* montrent que les métaux lourds peuvent modifier le métabolisme de la vitamine D. Fraser et al (Fraser 1980) suggèrent que le cadmium et le strontium, sous forme d'ions métalliques divalents Cd^{2+} et le Sr^{2+}, rentrent dans les mitochondries des cellules rénales par compétition avec les ions Ca^{2+} et inhibent la formation de $1,25(OH)_2D_3$ soit directement en diminuant l'activité de la CYP27B1 soit indirectement en supprimant la sécrétion de PTH. De la même manière, nous avons montré que, 3 jours après contamination aiguë à l'UA, les animaux présentent une diminution du taux de $1,25(OH)_2D_3$ corrélée avec une diminution du niveau plasmatique de la PTH (article 1). Ces résultats suggèrent que l'uranium, sous forme d'ion uranyle UO_2^{2+}, pourrait agir de la même manière que les autres ions métalliques divalents en diminuant l'activité de la CYP27B1 et en supprimant la sécrétion de PTH.

A fortes doses, il est reconnu que l'uranium est un agent néphrotoxique. Dans nos conditions de contamination aiguë à l'UA, l'augmentation des taux plasmatiques de créatinine et d'urée traduit l'apparition d'une insuffisance rénale. On peut donc émettre l'hypothèse que les effets observés sur le métabolisme de la vitamine D pourraient être une conséquence d'un dysfonctionnement rénal. En effet, il a été montré que les animaux développant une insuffisance rénale modérée présentent une diminution du taux de $1,25(OH)_2D_3$ qui s'accompagne d'une forte augmentation des niveaux d'ARNm *cyp27b1* dans le rein (Takemoto *et al.* 2003), de la même manière que les rats traités avec de fortes doses d'UA (article 1). En revanche, contrairement à la contamination aiguë à l'UA qui provoque une forte diminution du taux plasmatique de la PTH, l'insuffisance rénale conduit à une augmentation du niveau de cette hormone, qui agirait pour compenser la diminution de vitamine D active. Ainsi le dysfonctionnement rénal provoqué par l'UA n'explique pas à lui seul le phénotype que nous avons observé suite à la contamination aiguë. Ces résultats vont dans le sens d'une action directe de l'uranium sur le métabolisme de la vitamine D.

Dans les conditions de contamination chronique à de faibles dose d'UA, les animaux ne montrent aucun signe de néphrotoxicité mais présentent une diminution du niveau plasmatique de $1,25(OH)_2D_3$ et des modifications moléculaires des CYPs et des récepteurs nucléaires impliqués dans le métabolisme de la vitamine D au niveau du foie, du rein et du cerveau (article 2). Il est intéressant de noter que des rats, contaminés pendant 12 mois par ingestion de cadmium, un métal lourd néphrotoxique, contenu dans l'eau de boisson à une concentration de 1 mg/L, présentent un profil plasmatique similaire, à savoir un taux de $1,25(OH)_2D_3$ diminué sans modification des niveaux de $25(OH)_2D_3$ et de PTH (Brzoska and Moniuszko-Jakoniuk 2005a). De par leurs caractéristiques chimiques et/ou leurs propriétés

similaires d'accumulation dans l'organisme, l'uranium et le cadmium semblent agir de la même manière sur le métabolisme de la vitamine D.

Au niveau moléculaire, les récepteurs nucléaires VDR et RXRα apparaissent comme des cibles privilégiées de la contamination chronique à l'UA. En effet, après 9 mois d'ingestion chronique d'UA, les animaux présentent une diminution de l'expression génique de *vdr* au niveau du rein, du foie et du système nerveux central ainsi qu'une diminution de l'expression génique de *rxrα,* son partenaire obligatoire au niveau rénal (article 2). La transcription des gènes codant la *cyp24a1* et les transporteurs de calcium (*ecac1*, *cabp-28k* et *ncx1*) étant induite par $1,25(OH)_2D_3$ via son interaction avec VDR, nous avons émis l'hypothèse que la diminution de l'expression de *cyp24a1* et des transporteurs de calcium observée au niveau rénal chez les animaux contaminés pourrait être due à la baisse simultanée du niveau plasmatique de $1,25(OH)_2D_3$ et du taux des ARNm *vdr et rxrα* (article 2). Par ailleurs, on retrouve cette diminution de l'expression de *vdr* et de *rxrα*, chez les rats contaminés de façon chronique à UE (article 3). Ces résultats confirment que les récepteurs nucléaires impliqués dans le métabolisme de la vitamine D sont des cibles importantes de l'uranium et nous permettent d'émettre l'hypothèse que l'action de l'uranium sur l'accumulation de *vdr* et *rxra* serait due à sa chimiotoxicité. De la même manière, une étude réalisée sur des cultures primaires d'hépatocytes humains montre que l'arsenic, qui appartient à la famille des métaux lourds et qui se caractérise par une toxicité uniquement chimique, diminue l'expression génique de *rxra* (Noreault *et al.* 2005b). Ces résultats confirment que la toxicité chimique de l'uranium joue un rôle important dans son action sur les récepteurs nucléaires.

De façon surprenante, après 9 mois de contamination à l'UE, contrairement aux taux des ARNm *vdr* et *rxrα* qui sont diminués, l'accumulation protéique des deux récepteurs nucléaires est augmentée. Ces résultats sont d'autant plus surprenants que l'expression génique de *ecac1* et de *cabp-28k*, dont la transcription est activée par VDR et RXRα, est diminuée au niveau rénal chez les animaux traités (article 3). Une diminution de la fonctionnalité de VDR pourrait expliquer cette baisse de l'expression des gènes cibles malgré l'augmentation de l'accumulation protéique de VDR et RXRα. De manière intéressante, dans une étude portant sur l'influence du polymorphisme de VDR sur la toxicité du plomb, les auteurs montrent que la diminution de l'activité de VDR entraîne une diminution de la concentration plasmatique de plomb et donc une toxicité moindre (Rezende *et al.* 2007). En effet, le plomb, comme l'uranium est un métal lourd qui se fixe à la surface de l'os qui représente le site de stockage à long terme du toxique. Le plomb plasmatique comprend une fraction diffusible pouvant se répartir dans tout l'organisme et

étant considérée comme la fraction la plus toxique. Or le plomb diffuse du compartiment osseux vers le sang par résorption osseuse. VDR, de par son rôle dans la minéralisation et la résorption osseuse, agit sur le relargage du plomb dans le compartiment sanguin et donc sur sa toxicité. C'est pourquoi les auteurs associent la diminution de l'activité de VDR avec une baisse de la toxicité. De la même manière, après 9 mois de contamination chronique à l'uranium, la diminution de la fonctionnalité de VDR pourrait contribuer à limiter la toxicité de l'uranium.

L'étude des effets d'une contamination chronique à l'UE avait été initiée dans le but de mettre en évidence des effets propres à la toxicité radiologique de l'uranium. Un métabolisme de la vitamine D plus sévèrement affecté due à sa radiotoxicité supplémentaire par rapport à l'UA avait été envisagé. Cependant de façon surprenante, contrairement à la contamination chronique à l'UA, l'exposition à l'UE n'affecte pas le niveau plasmatique de $1,25(OH)_2D_3$ (article 3). De plus, la comparaison des effets UE et UA, indique que l'UE induit des modifications moléculaires uniquement au niveau rénal alors que l'UA induit des modifications plus importantes et dans différents organes (foie, rein, cerveau). Pour expliquer ce phénotype moins sévère chez les rats contaminés à l'UE, il est possible d'envisager la mise en place d'un mécanisme de compensation, qui serait inexistant lors de la contamination à l'UA. Ainsi les effets de l'UE, qui représente une toxicité plus importante que l'UA, se déclencheraient plus précocement et induiraient la mise en place d'un mécanisme de défense par organisme. Un tel mécanisme a déjà été proposé dans une étude visant à déterminer les effets de l'uranium sur le stress oxydatif au niveau du système nerveux central chez le rat (Lestaevel *et al.* 2007). Dans cette étude, les auteurs montrent que les effets de l'UE sur le métabolisme du glutathion sont visibles à un temps de contamination précoce (1,5 mois de contamination) et disparaissent à un temps plus tardif (9 mois de contamination). A l'inverse, l'UA modifie la synthèse et la dégradation du glutathion uniquement après 9 mois de contamination. De la même manière, l'UE pourrait perturber le métabolisme de la vitamine D à un temps plus précoce que le temps 9 mois observé. Pour vérifier cette hypothèse, il serait intéressant d'analyser l'évolution de ce métabolisme au cours du temps, par exemple, après 1 mois, 3 mois et 6 mois de contamination à l'UE.

Comment l'uranium agit-il sur le métabolisme de la vitamine D ?

Etant donné que la comparaison des effets UA/UE ne permet pas de mettre en évidence des effets propres à la toxicité radiologique de l'uranium, on peut supposer que

les effets de l'uranium sur le métabolisme de la vitamine D sont dûs principalement à sa chimiotoxicité. Deux types d'hypothèses peuvent être émis : les phénotypes observés après contamination à l'UA et à l'UE sont liés soit à un effet direct du métal sur les différents acteurs du métabolisme de la vitamine D soit à un effet indirect en réponse à son action sur un autre système physiologique (figure 16).

- Hypothèse d'une action directe:

i) Les métaux lourds comme l'arsenic ou le plomb peuvent agir sur les enzymes de type cytochromes P450 et les récepteurs nucléaires à la fois au niveau transcriptionnel, traductionnel et post-traductionnel (Korashy and El-Kadi 2005; Noreault *et al.* 2005a; Noreault *et al.* 2005b). Comme l'uranium pénètre dans la cellule et s'accumule dans certains organites tels que les lysosomes et les mitochondries (Galle 1998) il pourrait agir directement sur l'expression génique et protéique des CYPs et des récepteurs nucléaires impliquées dans le métabolisme de la vitamine D. De la même manière, l'activité de la CYP27B1 et de la CYP24A1 pourrait être modifiée par l'uranium par une compétition au niveau du site actif de l'enzyme entre l'uranium et le fer. Ce mécanisme pourrait expliquer la modification du taux plasmatique de $1,25(OH)_2D_3$ après exposition à de fortes doses d'UA (article 1) et après contamination chronique à l'UA (article 2).

- ii) Il a été montré qu'un autre métal lourd, le cadmium se lie directement à VDR, probablement au niveau des deux motifs en doigts de Zinc du domaine de liaison à l'ADN (Veenstra *et al.* 1998). Dans cette étude, les auteurs montrent qu'une concentration trop élevée de cadmium inhibe la liaison de VDR sur les séquences VDRE présentes dans le promoteur des gènes cibles. Une étude récente démontre que l'uranium peut inhiber la capacité des protéines contenant des motifs en doigts de Zinc à se lier sur des séquences d'ADN *via* son interaction directe avec la protéine (Hartsock *et al.* 2007). L'ensemble de ces données nous laisse penser que l'uranium pourrait interagir avec VDR et RXRα, voire modifier leurs strucures tri-dimensionnelles en prenant la place du métal chélaté par les Cys, et inhiber la capacité de liaison de l'hétérodimère sur les séquences VDRE. Il en résulterait une diminution de la transactivation des gènes cibles. Ce mécanisme pourrait expliquer la diminution des niveaux d'ARNm des gènes cibles de la vitamine D, observée après contamination chronique à l'UE, malgré l'augmentation de l'expression protéique de VDR et RXRα (article 3).

iii) Une contamination à l'uranium naturel (UN), même à faible dose, peut générer du stress oxydatif au niveau des cellules rénales et du cortex cérébral. En effet, une étude globale du génome a mis en évidence une augmentation du taux d'ARNm *sod1* (*superoxide*

dismutase 1) et *gpx* 3 (*gluthathione peroxidase 3*), qui sont des marqueurs de stress oxydatif, ainsi qu'une augmentation de la production de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) dans les cellules rénales de souris contaminées de façon chronique par ingestion d'UN (Taulan *et al.* 2004). De plus, après 3 mois de contamination chronique à l'uranium, une étude rapporte l'augmentation des TBARS (*thiobarbituric acid reactive substances*), un autre marqueur de stress oxydatif, dans le cortex cérébral chez le rat (Linares *et al.* 2007). I*n vitro,* il a été démontré que les espèces réactives oxygénées telles que l'oxyde nitrique (NO) ou le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) inhibent la fixation de l'hétérodimère VDR-RXR sur les séquences d'ADN VDRE et empêchent la transactivation des gènes cibles (Kroncke *et al.* 2002). Ces données nous permettent d'émettre l'hypothèse que, dans le cas d'une contamination chronique, l'uranium pourrait provoquer une augmentation de la production d'espèces réactives oxygénées au sein des cellules rénales et par conséquent diminuer l'activité de VDR et RXRα en inhibant la fixation de l'hétérodimère VDR/RXRα sur les séquences d'ADN VDRE. Ce mécanisme pourrait également expliquer la diminution des niveaux d'ARNm des gènes cibles de la vitamine D, observée après contamination chronique à l'UE, malgré l'augmentation des niveaux de protéines VDR et RXRα (article 3).

- Hypothèse d'une action indirecte:

Les enzymes et les récepteurs nucléaires impliqués dans le métabolisme de la vitamine D sont régulés par des cytokines inflammatoires (Zehnder *et al.* 2002), des hormones telles que les estrogènes ou l'insuline et de nombreux autres facteurs tels que le FGF-23 ou l'IGF-1 (pour revue, partie introductive). Ainsi l'uranium pourrait agir indirectement sur les acteurs de ce métabolisme *via* les médiateurs de l'inflammation, les hormones ou d'autres facteurs.

Dans les conditions de contamination à long terme, une combinaison d'effets directs et indirects de l'uranium apparaît comme l'hypothèse la plus probable.

B. Caractérisation des effets du césium 137 sur le métabolisme de la vitamine D

L'étude des effets d'une contamination chronique au ^{137}Cs a été initiée dans le but de répondre à des préoccupations de santé publique, 20 ans après l'accident de Tchernobyl.

Suite à une contamination chronique, le ^{137}Cs induit des effets similaires à l'UA sur le métabolisme de la vitamine D. En effet, l'analyse des paramètres sanguins révèle que les deux types de contamination entraînent une diminution du taux de $1,25(OH)_2D_3$, sans modification des taux de $25(OH)_2D_3$ et de PTH (article 4). Bien que l'uranium et le césium s'accumule différemment dans l'organisme et ont des propriétés chimiques et radiologiques différentes, ces deux radionucléides diminuent de façon similaire le niveau de la vitamine D et induisent des modifications moléculaires des enzymes impliquées dans son métabolisme. Cependant, contrairement à la contamination à l'UA, le ^{137}Cs ne modifie pas l'expression des récepteurs nucléaires (VDR et RXRα) et des gènes cibles de la vitamine D impliqués dans le transport du calcium (article 4). La comparaison des deux types de contamination Cs/UA indique que la diminution du taux de vitamine D active n'est pas associée aux mêmes types de modifications moléculaires.

Nos résultats montrent que l'ingestion chronique de ^{137}Cs induit un phénotype plus sévère chez l'organisme en croissance par rapport à l'adulte. D'une part, les ratons exposés au ^{137}Cs *via* le lait maternel, présentent une augmentation du taux plasmatique d'ALAT, indiquant une atteinte de la fonction hépatique, contrairement au modèle adulte qui ne présente aucun signe de toxicité hépatique. De manière intéressante, une étude réalisée chez la souris montre également une toxicité plus importante du ^{137}Cs au niveau du foie, du cerveau, de la rate et des testicules chez le souriceau par rapport à l'adulte (Messiha 1988). D'autre part, chez le rat adulte, nous avons montré que l'ingestion chronique d'une faible dose de ^{137}Cs affecte le métabolisme de la vitamine D sans modifier l'homéostasie minérale. En revanche, une exposition au ^{137}Cs durant la période de développement post-natal affecte non seulement le métabolisme de la vitamine D au niveau hormonal et moléculaire mais modifie également l'homéostasie phosphocalcique (article 5). En effet les ratons contaminés présentent une hyperphosphatémie accompagnée d'une légère hypocalcémie. Nous avons émis l'hypothèse que l'hypocalcémie pouvait être une conséquence directe de l'hyperphophatémie *via* la précipitation du calcium par le phosphate. De plus, cette étude a révélé une diminution du taux de l'ostéocalcine qui peut mettre en évidence un défaut de formation osseuse chez les ratons exposés. Ces troubles du statut minéral pendant la phase primordiale d'acquisition osseuse pourraient entraîner un retard de développement du tissu osseux. Afin de vérifier cette hypothèse, il sera nécessaire d'étudier plus en détail le métabolisme osseux chez les ratons contaminés, en mesurant par exemple d'autres marqueurs du remodelage osseux (phosphatase alcaline, télopeptides, désoxypyridinoline,etc.) ou en effectuant des mesures de la masse minérale osseuse (BMC) ou de la densité minérale osseuse (BMD), qui reflètent la masse et la minéralisation osseuse, par des techniques absorptiométriques.

L'hypocalcémie et la diminution du taux de l'ostéocalcine sont probablement à l'origine de l'augmentation du taux plasmatique de $1,25(OH)_2D_3$, observée chez les ratons contaminés au ^{137}Cs.

Contrairement, à l'uranium, le césium 137 possède une toxicité chimique très faible. Seule sa radiotoxicité, due à sa nature d'émetteur β et γ, est à considérer . A notre connaissance, aucune donnée n'est disponible sur les effets des rayonnements ionisants sur le métabolisme de la vitamine D. Il nous est donc impossible d'établir un parallèle entre la contamination au ^{137}Cs et l'action des rayonnements ionisants. Seules des études *in vitro* réalisées sur des lignées de kératinocytes humains rapportent que l'irradiation aux rayons UV-B est un inducteur de l'expression génique de la *cyp27a1* (Lehmann *et al.* 1999). Cependant l'action directe des rayons UV-B sur la CYP27A1 n'a pas été clairement démontrée.

Comment le césium 137 agit-il sur le métabolisme de la vitamine D ?

Les effets du césium sur le métabolisme de la vitamine D sont dûs principalement à sa radiotoxicité. Deux types d'hypothèses peuvent être émis : les phénotypes observés après contamination au ^{137}Cs sont liés soit à un effet direct des rayonnements ionisants émis par le radionucléide sur les différents acteurs du métabolisme de la vitamine D soit à un effet indirect des rayonnements ionisants en réponse à leurs actions sur un autre système physiologique (figure 17).

Hypothèse d'une action directe:

Au sein de la cellule, les rayonnements ionisants émis par le ^{137}Cs peuvent léser les molécules (glucides, lipides, protéines, acides nucléiques) de deux manières : i) par transfert direct de l'énergie du rayonnement qui entraîne l'ionisation de la molécule et ainsi la modification de sa structure chimique, ou ii) par formation de radicaux libres qui initient des réactions chimiques d'oxydo-réductions avec des molécules biologiques situées à proximité, entrainant l'altération structurelle de ces dernières. Dans ce dernier cas, l'action toxique du ^{137}Cs passe par une perturbation de la balance oxydative cellulaire. Un tel mécanisme a déjà été rapporté lors d'une exposition chronique au ^{137}Cs. En effet, Romanenko et *al* ont mis en évidence l'augmentation des marqueurs de stress oxydatif, tels que la synthase inductible de l'oxyde nitrique (iNOS), la cyclo-oxygénase- 2 (COX-2) et la 8-hydroxy-2'-désoxyguanosine (8-OHdG) au niveau de l'épithélium de la vessie chez des personnes ayant vécu plus de 13 ans en Ukraine dans les territoires contaminés au ^{137}Cs.

Les auteurs suggèrent que l'exposition à long terme à de faibles doses de radiations ionisantes génère du stress oxydatif et pourrait favoriser la carcinogénèse urothéliale (Romanenko *et al.* 2000b). Or, le stress oxydatif est capable de modifier l'expression génique des enzymes de type cytochromes P450 (Barker *et al.* 1994; Nagai *et al.* 2004). Dans les cellules rénales, il a été démontré que les radicaux libres abaissent la production de $1,25(OH)_2D_3$ en inhibant la stimulation de la CYP27B1 par la PTH au niveau protéique et en diminuant l'activité de la CYP27B1 (Armbrecht *et al.* 2007). Ces données nous permettent d'émettre l'hypothèse qu'après 3 mois de contamination à long terme, le ^{137}Cs, s'accumulant au niveau des cellules du foie, du système nerveux central et du rein, peut générer du stress oxydatif et entraîner d'une part la modification de l'expression génique de la *cyp2r1* et de la *cyp27b1*, d'autre part une diminution de la production de $1,25(OH)_2D_3$ (article 4).

Hypothèse d'une action indirecte:

De la même manière que l'uranium, le ^{137}Cs pourrait agir indirectement sur les acteurs de ce métabolisme *via* des médiateurs de l'inflammation ou des hormones. En effet des dérèglements du système immunitaire (humoral et cellulaire) et de certains systèmes hormonaux (hormones stéroïdiennes) sont décrits sur les populations vivant dans les territoires contaminés suite à l'accident de Tchernobyl ou chez l'animal après ingestion chronique de ^{137}Cs. De plus une augmentation de la fréquence des cancers de la thyroïde est rapportée sur les populations exposées (pour revue, partie introductive). Ces désordres hormonaux et immunitaires peuvent avoir un impact sur le métabolisme de la vitamine D.

II. PERSECTIVES

A la suite de cette étude de toxicologie descriptive, il apparaît indispensable dans un premier temps de déterminer les mécanismes moléculaires responsables des divers phénotypes observés, à savoir si les conséquences des contaminations à l'uranium et au césium 137 sur le métabolisme de la vitamine D sont dues à des effets directs ou indirects. Pour répondre à cette question, plusieurs stratégies peuvent être envisagées.

- Tout d'abord, il sera nécessaire de réaliser des études *in vitro* sur des cellules rénales (HEK293) et des hépatocytes (HEPG2) humains incubés ou non avec une solution de

nitrate d'uranyle ou une solution de chlorure de césium. L'analyse de l'activité des CYPs (CYP27A1, CYP2R1, CYP27B1 et CYP24A1), à partir des mitochondries et des microsomes préalablement isolés, de même que l'analyse de l'expression génique et protéique des enzymes et des récepteurs nucléaires PPARα, γ, LXRα, β, HNF-4α, VDR, et RXRα et du facteur HNF-1α permettront de mettre en évidence l'effet direct de l'uranium et du ^{137}Cs sur les différents acteurs du métabolisme.

- Les résultats obtenus après contamination chronique à l'UA ou à l'UE indiquent que VDR et RXRα sont des cibles privilégiées de l'uranium. Nous avons émis plusieurs hypothèses concernant l'action de l'uranium sur ces récepteurs nucléaires :

i) Soit l'uranium peut interagir directement avec VDR et RXRα et inhiber leur capacité de liaison sur les séquences VDRE. La mise en évidence d'un tel mécanisme pourra être réalisée à partir de protéines VDR et RXRα purifiées, préalablement incubées ou non avec des concentrations croissantes de nitrate d'uranyl. Après ajout de séquences nucléotidiques contenant des VDRE radiomarquées (^{32}P) et de $1,25(OH)_2D_3$, la capacité de liaison de l'hétérodimère VDR-RXRα sur l'ADN pourra être mesurée par des analyses de retard sur gel. Dans ce cas, la visualisation des complexes s'effectue par autoradiographie. Cependant, il est possible que l'uranium puisse impressionner le film autoradiographique. Il serait alors envisageable d'utiliser une technique d'autoradiographie numérique, le béta-imager qui localise et mesure tous les radioéléments béta directement dans le gel.

ii) Soit l'uranium peut provoquer une augmentation de la production d'espèces réactives oxygénées au sein des cellules rénales qui entraînerait la diminution de la fixation de l'hétérodimère VDR/RXR sur les séquences d'ADN VDRE. La mise en évidence d'un tel mécanisme pourra être réalisée de deux manières. Soit à partir de cellules rénales (HEK293) incubées ou non avec des concentrations croissantes de nitrate d'uranyl. La fixation de l'hétérodimère VDR/RXRα sur les séquences d'ADN VDRE sera mesurée par la technique d'immunoprécipitation de la chromatique (ChIP). Soit à partir d'extraits nucléaires issus de cellules rénales (HEK293) préalablement incubées avec des concentrations croissantes de nitrate d'uranyl. Comme précédemment, la capacité de liaison de l'hétérodimère VDR-RXRα sur l'ADN sera mesurée par des analyses de retard sur gel utilisant des séquences nucléotidiques contenant des VDRE radiomarquées, suivies d'une détection par autoradiographie classique sur film ou par autoradiographie numérique.

iii) Quelque soit le mode d'action de l'uranium (interaction directe du métal ou stimulation de la production d'espèces réactives oxygénées), nous avons émis l'hypothèse

que ce radionucléide pouvait inhiber la transactivation des gènes cibles au niveau rénal. Pour vérifier cette hypothèse, il sera nécessaire de réaliser des tests de transactivation sur des cellules rénales qui consisteront à analyser l'expression d'un gène rapporteur (luciférase) sous le contrôle des promoteurs ECAC1, CABP28K ou CYP24A1.

Le but de ce travail est d'évaluer l'impact d'une exposition chronique à l'uranium et au césium sur la santé humaine. Nous avons montré que l'ingestion chronique de faibles quantités d'UA et de ^{137}Cs conduit à la diminution du taux plasmatique de $1,25(OH)_2D_3$ chez le rat. Il reste à déterminer dans quelles mesures les données expérimentales obtenues chez l'animal sont extrapolables à l'Homme. Deux types d'études épidémiologiques peuvent être envisagés :

- Dans un premier temps, il serait intéressant de mesurer le taux plasmatique de $1,25(OH)_2D_3$ chez des populations exposées à l'uranium naturel ou au ^{137}Cs *via* l'eau de boisson ou l'alimentation et chez les vétérans de la guerre du Golf, exposés à l'UA à partir de blessures. Si ces études mettent en évidence des modifications du niveau de vitamine D active, le taux plasmatique de ce métabolite pourrait être proposé comme bio-marqueur potentiel d'une contamination interne à l'uranium ou au ^{137}Cs. En parallèle, une analyse biochimique des taux de calcium, de phosphates et des marqueurs sériques et urinaires du remodelage osseux (ostéocalcine, phosphatase alcaline, télopeptides, désoxypyridinoline, excrétion urinaire de calcium, etc.) pourrait être réalisée chez ces populations. L'augmentation d'un marqueur de la résorption osseuse (Télopeptide C-terminal du Collagène de Type-I, CTx) et d'un marqueur de la formation osseuse (ostéocalcine) mettant en évidence une association entre le taux d'uranium dans l'eau potable et l'augmentation du remodelage osseux a déjà été observée sur une population de Finlande (Kurttio *et al.* 2005). Il serait intéressant d'envisager ces études épidémiologiques en priorité sur les enfants, les femmes enceintes ou les personnes âgées qui sont plus sensibles à un dysfonctionnement du métabolisme de la vitamine D.

- Il est reconnu aujourd'hui que l'hypovitaminose D ou un dysfonctionnement du métabolisme de la vitamine D augmentent le risque d'apparition de pathologies osseuses et sont des facteurs pouvant favoriser l'apparition de certaines maladies inflammatoires intestinales, autoimmunes (diabètes de types 1, scléroses multiples), ou prolifératives (psoriasis, cancer du colon ou des ovaires) (Peterlik and Cross 2005). Dans un deuxième temps, des études épidémiologiques visant à établir un lien entre l'apparition de ce type de pathologies et l'exposition chronique à l'uranium ou au césium 137 pourraient être envisagées.

Il ne faut pas oublier que les individus vivant dans les territoires contaminés suite à l'accident de Tchernobyl sont aujourd'hui exposés non seulement au ^{137}Cs mais également à de nombreux autres radionucléides dont l'uranium et le strontium, dispersés eux aussi à la suite de l'explosion du réacteur. Dans ce contexte de multiple pollution, on peut imaginer que la combinaison des effets de l'uranium et du césium 137 pourrait avoir des conséquences plus néfastes sur le métabolisme de la vitamine D. De la même manière, les individus vivant dans certaines régions naturellement riches en uranium peuvent être exposés à l'uranium naturel présent dans leur eau de boisson mais également à d'autres polluants tels que le cadmium, le mercure, le plomb etc. La combinaison d'une contamination chronique au cadmium, déjà connu pour perturber le métabolisme de la vitamine D, et d'une contamination chronique à l'uranium pourrait avoir des effets plus néfastes sur ce métabolisme et des conséquences physiopathologiques plus importantes. Afin de vérifier ces hypothèses, il serait intéressant d'étudier le métabolisme de la vitamine D sur des modèles animaux contaminés simultanément à des doses environnementales de ^{137}Cs et d'UA ou de cadmium et d'UA.

III. CONCLUSION GENERALE

Nos travaux de thèse ont montré que le métabolisme de la vitamine D est une cible de l'uranium et du ^{137}Cs. Un modèle animal, mimant la contamination chronique des populations exposées à l'uranium et au ^{137}Cs, a été utilisé pour la première fois pour montrer que l'ingestion chronique d'une faible dose d'UA ou de ^{137}Cs peut diminuer le niveau plasmatique de $1,25(OH)_2D_3$. Cependant cette diminution n'est pas associée aux mêmes types de modifications moléculaires. En effet, l'uranium a pour cibles principales les récepteurs nucléaires VDR et RXRα et les gènes cibles de la vitamine D (ECAC1, CABP-28K, NCX1 et CYP24A1*)* alors que le ^{137}Cs a pour cibles principales les enzymes impliquées dans sa biosynthèse (CYP2R1 et CYP27b1). Les résultats de nos études permettent de proposer de nouvelles hypothèses sur le mode d'action de ces deux radionucléides. Des études *in vitro* sur des cellules rénales et des hépatocytes seront nécessaires afin de déterminer les mécanismes moléculaires précis mis en jeu.

Chez le modèle adulte, les perturbations du métabolisme de la vitamine D ne sont pas associées à un dysfonctionnement de l'homéostasie minérale. En revanche nos études montrent que l'exposition chronique au ^{137}Cs durant la période de développement post-

natal affecte non seulement le métabolisme de la vitamine D mais également l'homéostasie minérale. Ces résultats suggèrent une susceptibilité accrue des enfants face à la contamination aux ^{137}Cs, par rapport aux adultes.

Il est vrai qu'il faut rester prudent dans l'extrapolation à l'Homme de ces données obtenues chez l'animal, d'autant plus que les effets biologiques constatés sur métabolisme de la vitamine D après contamination chronique à l'uranium et au ^{137}Cs sont modérés et n'entraînent pas de conséquences physiopathologiques, que ce soit chez le modèle adulte ou le modèle raton. Cependant, nos résultats montrent clairement un impact plus important sur le modèle raton et nous amènent à poser la question des effets néfastes de ces contaminations sur des catégories de la population plus ciblées telles que les enfants, les femmes enceintes ou les personnes âgées.

Annexes

Revues générales

Article 1 – Vitamine D : métabolisme, regulation et pathologies associées.

Article publié dans « *Médecine sciences* ».

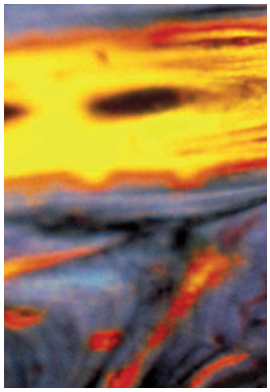
Tissandié E, Guéguen Y, Lobaccaro JMA, Aigueperse J et Souidi M.

MEDECINE/SCIENCES 2006 ; 22 : 1095-100

Vitamine D : métabolisme, régulation et maladies associées

Emilie Tissandié, Yann Guéguen, Jean-Marc A. Lobaccaro, Jocelyne Aigueperse, Maâmar Souidi

> La vitamine D, considérée comme une véritable hormone, est essentielle au maintien de l'homéostasie phosphocalcique de l'organisme. Sa biosynthèse, tout comme sa dégradation, sont assurées par des enzymes de type cytochromes P450. La régulation de ces enzymes fait intervenir des hormones qui répondent à des variations de l'homéostasie calcique et des facteurs, appelés récepteurs nucléaires, qui modulent leur expression génique. Les affections liées à une hypovitaminose ou à une déficience métabolique (rachitisme, ostéomalacie, ostéoporose) illustrent le rôle crucial de la vitamine D dans la minéralisation osseuse et l'absorption du calcium. La découverte récente de son rôle physiologique dans la neuroprotection, l'immunité, la différenciation et la prolifération cellulaires justifie un intérêt grandissant pour cette hormone. Ainsi, une meilleure compréhension des différents acteurs impliqués dans son métabolisme et sa régulation constitue aujourd'hui un enjeu majeur pour mieux apprécier le rôle de cette vitamine. <



E. Tissandié, Y. Guéguen, J. Aigueperse, M. Souidi : Institut de radioprotection et de sûreté nucléaire (IRSN), Département de radioprotection de l'Homme, Service de radiobiologie et d'épidémiologie, Laboratoire de radiotoxicologie expérimentale, BP 17, 92262 Fontenay-aux-Roses Cedex, France.
J.M.A. Lobaccaro : Physiologie comparée et endocrinologie moléculaire, UMR CNRS-Université Blaise Pascal 6547, 24, avenue des Landais, 63177 Aubière Cedex, France.
maamar.souidi@irsn.fr

La vitamine D ou calciférol est essentielle au maintien de l'homéostasie phosphocalcique de l'organisme. C'est la forme active de cette vitamine, la 1,25-dihydroxyvitamine D, qui augmente la capacité d'absorption du calcium (et du phosphore) par l'intestin, diminue sa fuite urinaire et mobilise le calcium osseux. Cette hormone présente également une activité de régulation de la défense immunitaire ainsi que la capacité de moduler la différenciation et la prolifération de certains types cellulaires. La biosynthèse et la dégradation de la vitamine D sont assurées par des enzymes de type cytochromes P450 (CYP). La régulation de son métabolisme a été très étudiée au cours de ces dernières années. Les variations de la calcémie entraînent la libération d'hormones agissant sur ces CYP. La vitamine D agit aussi directement sur sa propre synthèse par une boucle de régulation négative *via* son récepteur nucléaire VDR *(vitamin D receptor)*. De nombreuses études *in vitro* et *in vivo* ont démontré l'existence de ces rétrocontrôles et ont permis une meilleure compréhension des affections osseuses et endocriniennes liées au statut vitaminique D comme le rachitisme et l'ostéomalacie. Ces maladies résultent principalement du défaut d'exposition solaire et des carences d'apport alimentaire en vitamine D. Elles peuvent également être induites par l'action de médicaments sur le récepteur nucléaire PXR *(pregnane X receptor)* et, plus rarement, par des anomalies géniques du récepteur de la vitamine D ou d'une des enzymes de la biosynthèse de l'hormone.

Métabolisme de la vitamine D

Le terme de « vitamine D » recouvre deux composés. L'ergocalciférol, ou vitamine D_2, est présent dans l'alimentation d'origine végétale (céréales mais également

Article reçu le 12 décembre 2005, accepté le 5 mai 2006.

champignons, levures). Le cholécalciférol, ou vitamine D_3, est produit par la peau sous l'action des rayons ultraviolets mais on le trouve également dans des aliments d'origine animale (poissons gras, aliments lactés enrichis) [1]. Les vitamines D_2 et D_3 sont utilisées dans la prévention et le traitement curatif du rachitisme. Compte tenu de l'importance de la synthèse endogène et des faibles concentrations d'ergocalciférol dans l'alimentation, les principaux dérivés proviennent de la vitamine D_3 d'origine endogène.

Biosynthèse de la vitamine D_3

Cette biosynthèse *(Figure 1)* est initiée principalement dans la peau où les rayons UVB réagissent avec le 7-déhydrocholestérol (provitamine D cutanée) pour produire la pré-vitamine D_3, qui est isomérisée en cholécalciférol (ou vitamine D_3). Son activation est catalysée par des CYP localisées dans les cellules hépatiques et rénales [1]. La première étape est une hydroxylation en position 25 qui conduit à la formation de 25-hydroxyvitamine D_3 ($25(OH)D_3$), forme de réserve de la vitamine D_3, et dont la demi-vie plasmatique est de deux à trois semaines. Cette hydroxylation hépatique est réalisée par des CYP situées dans le réticulum endoplasmique ou dans les mitochondries. Aujourd'hui, la CYP2R1 localisée dans les microsomes apparaît comme le candidat majeur à la synthèse de $25(OH)D_3$. En effet, les individus porteurs d'une mutation du gène de la CYP2R1 possèdent un taux circulant de $25(OH)D_3$ anormalement bas [2]. Cependant, la CYP27A1 mitochondriale, qui intervient dans la biosynthèse des acides biliaires [3], la CYP2J3 et la CYP3A4 microsomales peuvent également catalyser cette hydroxylation [4]. Du fait de l'identification encore trop récente de la CYP2R1, peu de données sont disponibles sur cette enzyme dans la littérature. Ainsi, la suite de cette revue décrira essentiellement la CYP27A1 qui est la première enzyme identifiée pouvant réaliser cette première étape hépatique. La $25(OH)D_3$ est ensuite prise en charge par la protéine plasmatique DBP *(vitamin D binding protein)* afin d'être véhiculée jusqu'au rein. L'endocytose du complexe $25(OH)D_3$/DBP *via* la mégaline est l'une des voies d'entrée dans la cellule rénale du tube contourné proximal [5]. Les animaux ayant un défaut du gène codant la mégaline maintiennent spontanément un niveau de $1,25(OH)_2D_3$ suffisant pour ne pas développer de rachitisme ou d'hyperparathyroïdie secondaire en cas d'apport normal de vitamine D, suggérant une entrée normale de $25(OH)D_3$ [6]. La seconde étape est une hydroxylation en position 1 par la CYP27B1 mitochondriale qui conduit à la 1,25-dihydroxyvitamine D_3 ($1,25(OH)_2D_3$), forme biologiquement active, dont la demi-vie plasmatique est d'environ quatre heures.

À côté de cette production rénale majeure, des sites mineurs de production de $1,25(OH)_2D_3$ ont été identifiés dans le placenta, le cerveau, la prostate, les kératinocytes, les ostéoblastes et les macrophages qui expriment CYP27B1. Cependant, cette production extra-rénale ne contribue pas habituellement à la formation de $1,25(OH)_2D_3$ plasmatique [7].

Une fois synthétisée, la vitamine D_3 active diffuse dans l'organisme et agit sur ses organes cibles tels que l'intestin, l'os, les reins et les parathyroïdes. D'autres sites d'action ont été identifiés : l'épiderme où elle participe au maintien de l'intégrité du tissu en agissant sur la synthèse d'involucrine, une protéine majeure de la membrane cornée des kératinocytes ; le système nerveux central où elle assure une action protectrice par la synthèse de facteurs neurotrophiques. L'existence d'un métabolisme de la vitamine D_3 propre à ces deux organes fait suspecter une action autocrine et/ou paracrine dans ces tissus [8-10].

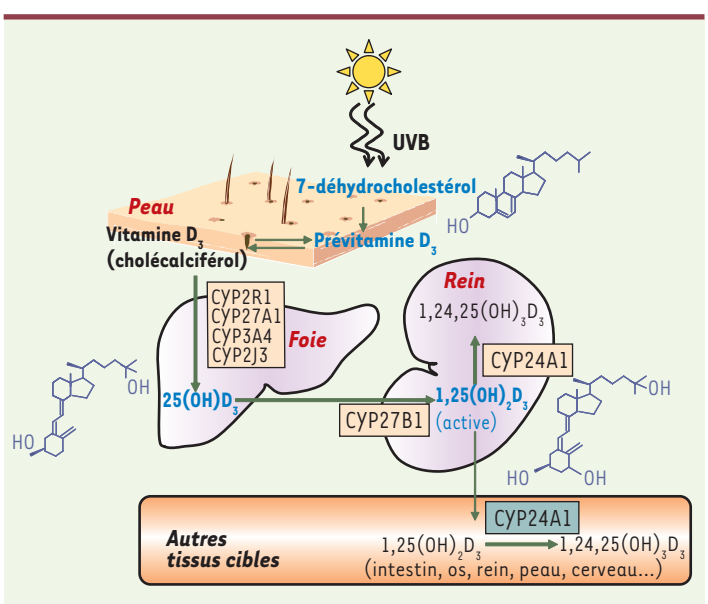


Figure 1. ***Schéma du métabolisme de la vitamine D3.*** Dans la peau, le précurseur de la vitamine D_3, le 7-déhydrocholestérol, est transformé en pré-vitamine D_3 qui est secondairement isomérisée en vitamine D_3 (ou cholécalciférol). Dans le foie, la 25-hydroxyvitamine D_3 ou $25(OH)D_3$ est synthétisée à partir de la vitamine D_3 après action de CYP27A1, CYP2R1, CYP2J3 ou CYP3A4. Dans les tissus cibles, la 1α-hydroxylase CYP27B1 synthétise la forme biologiquement active 1,25-dihydroxyvitamine D_3 ou $1,25(OH)_2D_3$. Son catabolisme (essentiellement dans le rein) est initié par la 24-hydroxylase CYP24A1.

Catabolisme de la vitamine D_3

La concentration circulante en $1,25(OH)_2D_3$ (vitamine D active) dépend également de son catabolisme *(Figure 1)* réalisé dans des cellules cibles. La CYP24A1 catalyse la conversion de $1,25(OH)_2D_3$ en 1,24,25-trihydroxyvitamine D_3 ($1,24,25(OH)_3D_3$), première étape dans la voie de dégradation de la vitamine D pour aboutir à une

forme inactive, l'acide calcitroïque. Contrairement à CYP27A1 et CYP27B1, localisées principalement dans le foie et le rein respectivement, CYP24A1 est ubiquitaire, contrôlant ainsi le taux de vitamine D_3 active à l'échelle de l'organisme.

Régulation du métabolisme de la vitamine D

La régulation du métabolisme de la vitamine D_3 dépend essentiellement des enzymes impliquées dans sa synthèse (CYP27A1 et B1) ou son catabolisme (CYP24A1). Cette régulation fait intervenir des hormones (surtout la PTH ou parathormone) qui répondent à des variations de l'homéostasie calcique et des molécules d'origine lipidique ayant une activité autocrine ou paracrine *via* des récepteurs nucléaires *(Figure 2)*.

Régulation de la synthèse

La concentration circulante de $25(OH)D_3$ est peu régulée. En effet, plus la quantité de vitamine D synthétisée ou ingérée est grande, plus la production de $25(OH)D_3$ est importante. Néanmoins, dans le foie, CYP27A1, impliquée dans sa synthèse, est modulée à l'étape transcriptionnelle par des récepteurs nucléaires [11-14]. On peut citer, entre autres, PPARα et γ, dont les ligands sont des acides gras poly-insaturés, HNF4α activé par des phosphorylations et SHP, un récepteur nucléaire ayant une activité de répression transcriptionnelle.

Dans le rein, l'activité de la CYP27B1, responsable de la production de l'hormone active ($1,25(OH)D_3$), est étroitement régulée. La PTH libérée par les glandes parathyroïdes lors d'une hypocalcémie exerce un contrôle positif. À l'inverse, une hypercalcémie, une hypophosphatémie et/ou une augmentation de la concentration plasmatique en $1,25(OH)_2D_3$ inhibent la libération de PTH. De plus, les phosphates, le calcium et la $1,25(OH)_2D_3$ peuvent également agir directement sur l'enzyme et donc sur le taux circulant de l'hormone active [1, 3]. Cependant, les mécanismes moléculaires précis sont mal connus à ce jour. Le mécanisme d'autorégulation par la $1,25(OH)_2D_3$ sera développé ci-dessous. La PTH intervient en augmentant l'activité du promoteur de la CYP27B1 *via* la phosphorylation du facteur de transcription CREB *(cAMP-dependent response element binding protein)* [15]. De nombreux autres facteurs comme l'IGF-I *(insulin-like growth factor I)*, l'insuline, la calcitonine (hormone produite par les cellules C de la thyroïde), le FGF 23 *(fibroblastic growth factor 23)* interviennent également dans la régulation de la CYP27B1 [1, 8, 16, 17].

Régulation du catabolisme

La dégradation de la vitamine D_3 dépend, dans les reins, de la régulation de la CYP24A1. Les apports en phosphates et la PTH modulent l'activité et l'expression de cette enzyme de manière opposée à leur effet sur CYP27B1 *(Figure 2)*. De plus, une étude récente propose une régulation par la calcitonine de l'expression du gène codant CYP24A1 *via* la voie de signalisation Ras-PKC zêta (protéine kinase C d'isoforme zêta) [18] *(Figure 2)*. Néanmoins, le principal facteur de transcription impliqué dans la régulation du gène codant la 24-hydroxylase est le récepteur « classique » de la vitamine D_3, VDR *(vitamin D receptor)*. Cette protéine appartient à la superfamille des récepteurs nucléaires, facteurs de transcription activés par des ligands (hormones ou molécules lipophiles). La $1,25(OH)_2D_3$ stimule la transcription de CYP24A1 *via* sa fixation sur l'hétérodimère formé par VDR et RXR *(retinoic X receptor)*, le récepteur de l'acide rétinoïque 9-*cis*, qui reconnaît des séquences spécifiques (séquences VDRE, *vitamin D response element)* dans le promoteur du gène [19] *(Figure 3)*. Par ailleurs, VDR aurait un rôle direct dans l'inhibition de l'expression de la CYP27B1 dans les reins. Cette répression résulterait de la liaison de l'hétérodimère VDR/RXR à un facteur de trans-

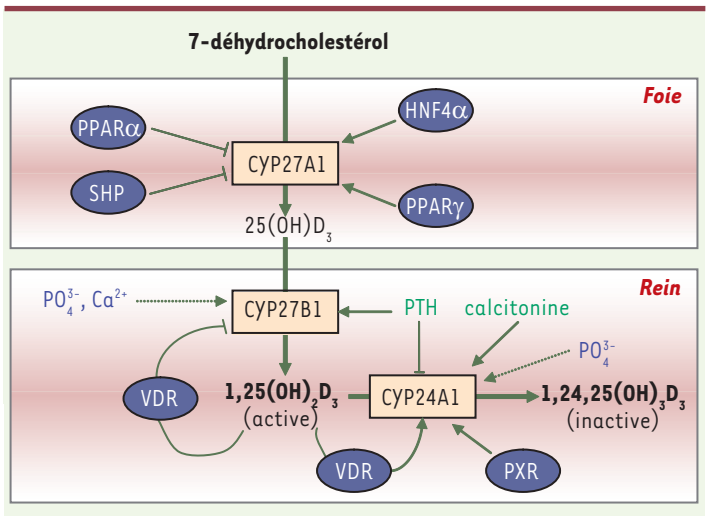


Figure 2. Régulation du métabolisme de la vitamine D3 par les hormones, les minéraux et les récepteurs nucléaires. Dans le foie, l'expression de la CYP27A1 est stimulée par les récepteurs nucléaires HNF4α *(hepatic nuclear factor 4α)* et PPARγ *(peroxisome proliferator-activated receptor γ)* et inhibée par PPARα et SHP *(small heterodimer partner)*. Dans le rein, la parathormone (PTH) est le régulateur positif principal de la CYP27B1, enzyme responsable de la production de la vitamine D_3 active. L'hypocalcémie et l'hypophosphatémie induisent une augmentation de l'activité et de l'expression de cette enzyme, alors que l'hypercalcémie et l'hyperphosphatémie exercent un contrôle négatif. La $1,25(OH)_2D_3$, elle même, *via* son interaction avec VDR *(vitamin D receptor)* inhibe l'expression rénale de la CYP27B1 et stimule la transcription de la CYP24A1 rénale, responsable de l'inactivation de la vitamine D_3. La CYP24A1 est régulée également par les apports phosphatés et par la PTH. Cette dernière inhibe l'expression de l'enzyme. Au contraire, la calcitonine et le récepteur nucléaire PXR *(pregnane X receptor)* induisent son expression. Flèche droite, stimulation ; flèche brisée, inhibition ; flèche en pointillée : faible action de régulation.

cription de type bHLH *(basic helix-loop-helix)* capable d'interagir avec un motif consensus appelé « boîte E » présent sur le promoteur de la CYP27B1 [20]. *Via* l'action de VDR, la $1,25(OH)_2D_3$ peut exercer un contrôle sur sa propre synthèse et son propre catabolisme. Un autre récepteur nucléaire, PXR *(pregnane X receptor)*, impliqué dans la régulation du métabolisme des xénobiotiques et des médicaments, permettrait l'induction du gène codant CYP24A1 grâce à son interaction avec les séquences VDRE [21] *(Figure 2)*. Ainsi, les médicaments anti-épileptiques ou anti-convulsifs, activateurs de PXR, de même que les corticostéroïdes, peuvent conduire à une carence en vitamine D. Lorsque ce type de médicament est prescrit à long terme, comme c'est le cas pour les personnes épileptiques ou souffrant d'arthrite, un apport supplémentaire en vitamine D peut s'avérer nécessaire.

Rôles biologiques de la vitamine D

La $1,25(OH)_2D_3$ est une hormone hypercalcémiante. Elle agit essentiellement à trois niveaux. (1) Intestinal : elle permet une absorption intestinale accrue du calcium alimentaire et secondairement celle des phosphates. Deux sites d'action sont reconnus. Sur la bordure en brosse des cellules intestinales, cette hormone augmente la synthèse du transporteur de calcium (CaT1) qui est le mode d'action majeur pour l'absorption intestinale du calcium. Dans les cellules intestinales, elle augmente la synthèse de la protéine calbindine qui favorise le transport du calcium contre un gradient de concentration entre les cellules intestinales et le plasma, entraînant ainsi la diffusion passive des ions phosphates. (2) Osseux : en réponse à une hypocalcémie, la vitamine D active de façon directe la résorption osseuse en favorisant la différenciation et l'activation des cellules souches mésenchymateuses de l'os en ostéoclastes. (3) Rénal : l'hormone augmente la réabsorption tubulaire du calcium par action directe sur le canal épithélial calcique (ECaC). Son effet stimulant sur la réabsorption tubulaire des phosphates est secondaire à l'inhibition de la sécrétion de PTH produite par l'hypercalcémie associée à l'administration de vitamine D. Elle accélère également le transport du calcium et des phosphates par un mécanisme dépendant de la PTH [1, 22].

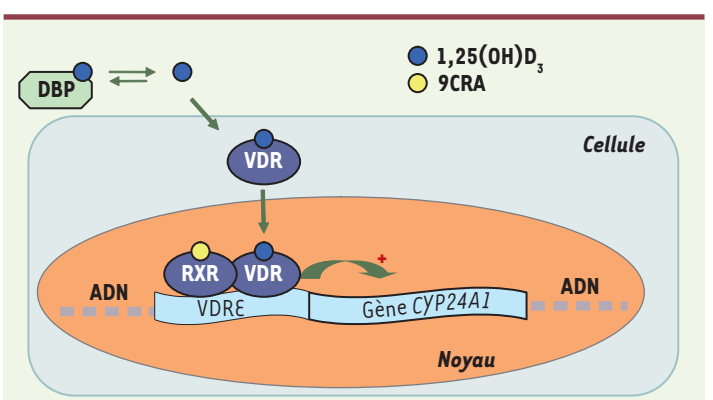


Figure 3. ***Schéma de la régulation transcriptionelle de l'expression de CYP24A1 par le récepteur de la vitamine D.*** La vitamine D active, $1,25(OH)_2D_3$, circule liée à DBP *(vitamin D binding protein)*. $1,25(OH)_2D_3$ pénètre dans la cellule cible et va se lier à son récepteur nucléaire VDR *(vitamin D receptor)*. Le complexe $1,25(OH)_2D_3$/VDR forme un hétérodimère avec RXR *(retinoic X receptor)* dont le ligand est l'acide rétinoïque 9-cis (9CRA). L'heterodimère VDR/RXR se lie à des séquences spécifiques (séquences VDRE, *vitamin D response element*) situées en amont du gène de la CYP24A1. Il s'ensuit une activation (+) de la transcription du gène de CYP24A1.

L'action de la $1,25(OH)_2D_3$ s'exerce *via* deux voies différentes. La plus connue implique la liaison de $1,25(OH)_2D_3$ à VDR qui induit une activation ou une répression de la transcription de gènes cibles, comme décrit ci-dessus. Des études plus récentes suggèrent l'existence d'une voie dite « non génomique », plus rapide, faisant intervenir un VDR membranaire capable d'activer la voie de transduction impliquant la protéine kinase C et capable de modifier le métabolisme des phospho-inositides et la distribution intracellulaire du calcium [23].

À côté de son rôle bien établi dans la régulation de l'homéostasie phosphocalcique, la vitamine D possède d'autres fonctions physiologiques *(Figure 4)* telles que des effets immunomodulateurs ainsi qu'une implication dans le contrôle de la différenciation de nombreux types cellulaires et l'inhibition de leur prolifération [24, 25]. La mise en évidence de ces nouvelles propriétés a initié de nombreuses études concernant l'utilisation de cette hormone et de ses analogues moins hypercalcémiants dans le traitement des maladies hyperprolifératives (cancers) et dans celui des maladies auto-immunes (diabète de type 1) [26, 27]. Parmi les analogues de la vitamine D, on peut citer, par exemple, le calcipotriène utilisé dans le traitement du psoriasis. Enfin, il faut également noter que la $24,25(OH)_2D_3$, un métabolite, aurait un rôle dans la croissance, le développement et la réparation des os [28].

Maladies associées au métabolisme de la vitamine D

Les maladies liées au statut vitaminique D sont très souvent le résultat d'une carence en vitamine D. Cette carence entraîne un rachitisme chez le jeune en croissance [29]. Chez l'adulte, un trouble de la minéralisation osseuse, appelé ostéomalacie [30], peut entraîner une hypersécrétion de PTH. Chez la personne âgée, cette carence constitue un terrain favorable à l'ostéoporose, maladie caractérisée par une masse minérale basse et des altérations de la microarchitecture osseuse [31]. Les fractures sont la complication la plus fréquente et s'accompagnent d'une augmentation de la morbidité et de la mortalité. Il est

intéressant de noter que l'ostéomalacie peut résulter de la prise prolongée de médicaments tels que le phénobarbital [32], qui après activation du récepteur nucléaire PXR, induit l'expression de CYP24A1, ce qui conduit à la dégradation incontrôlée de la vitamine D active entraînant une altération de l'homéostasie phosphocalcique [33].

Il existe également des maladies héréditaires du métabolisme de la vitamine D à transmission autosomique récessive. Le rachitisme pseudo-carentiel de type I résulte d'une anomalie de l'expression du gène codant CYP27B1 [34]. Le taux de $25(OH)D_3$ est normal chez les individus atteints du rachitisme pseudo-carentiel de type I alors que le taux de $1,25(OH)_2D_3$ s'effondre. Des déformations et douleurs osseuses, un retard de croissance et une myasthénie caractérisent la maladie. L'administration de $1,25(OH)_2D_3$ est nécessaire pendant toute la vie des personnes atteintes de cette affection. A l'inverse, le rachitisme pseudo-carentiel de type II résulte d'une anomalie de l'expression du gène codant VDR. Il se caractérise donc par une résistance des organes cibles à l'action de $1,25(OH)_2D_3$ dont le taux est élevé. Ce rachitisme pseudo-carentiel de type II se manifeste par un tableau de rachitisme sévère et précoce, associé à une alopécie dans 80 % des cas. Le traitement consiste en l'administration de doses massives de tous les dérivés de la vitamine D_3 et de calcium [35].

À côté de ces états de carence, de déficit ou d'insuffisance en vitamine D, un apport excessif (intoxication) peut entraîner une hypervitaminose qui provoque une hypercalcémie par augmentation de l'absorption intestinale et de la résorption osseuse. Cette hypercalcémie peut conduire à des atteintes rénales (lithiases et néphrocalcinoses). Les cas d'hypervitaminose endogène sont rares sauf dans certaines maladies telles que les granulomatoses qui se caractérisent par une production non contrôlée de $1,25(OH)_2D_3$ [36, 37].

Conclusions

La vitamine D est connue depuis longtemps pour son rôle primordial dans le contrôle de l'homéostasie phosphocalcique et dans la minéralisation osseuse. La mise en évidence plus récente de son rôle physiologique dans l'immunité, la différenciation cellulaire, la prolifération et la neuroprotection justifie un intérêt grandissant pour cette hormone.

Au cours de ces dernières années, l'étude du métabolisme de la vitamine D, de son mécanisme d'action et de ses « nouveaux » tissus cibles a été abordée, notamment, par l'utilisation d'outils de biologie cellulaire et moléculaire. Les données obtenues ont mis en évidence les principaux acteurs de ce métabolisme : enzymes de type cytochromes P450 (CYP27A1, CYP2R1, CYP27B1 et CYP24A1) et récepteur nucléaire VDR qui jouent un rôle majeur dans le contrôle du métabolisme de la vitamine D. De façon plus surprenante, la production de vitamine D a pu être mise en évidence dans d'autres tissus (placenta, cerveau, prostate, peau). Si l'existence de cette synthèse locale suggère une action autocrine et/ou paracrine de cette hormone, les cibles moléculaires et surtout les fonctions physiologiques d'une telle synthèse sont encore en cours d'étude.

Un manque de vitamine D entraîne un rachitisme chez l'enfant ainsi qu'une exacerbation de l'ostéoporose et le développement d'une ostéomalacie chez l'adulte. L'allongement de la durée de vie et l'incidence des fractures provoquées par l'ostéoporose ont fait de cette affection un problème de santé publique très actuel. De plus, une grande partie de la recherche sur la vitamine D a trait au développement de l'utilisation du $1,25(OH)_2D_3$ comme agent prévenant ou retardant la survenue de certaines maladies auto-immunes (diabète de type 1) ou proliferatives (cancers solides, leucémie, psoriasis). Une meilleure compréhension du rôle des CYP impliquées dans le métabolisme de la vitamine D ainsi que de celui des facteurs régulant leur expression comme les récepteurs nucléaires et les co-facteurs associés, constitue un des défis à résoudre afin de mieux apprécier le rôle de la vitamine D dans les conditions physiologiques normales ou dans les maladies associées. ◊

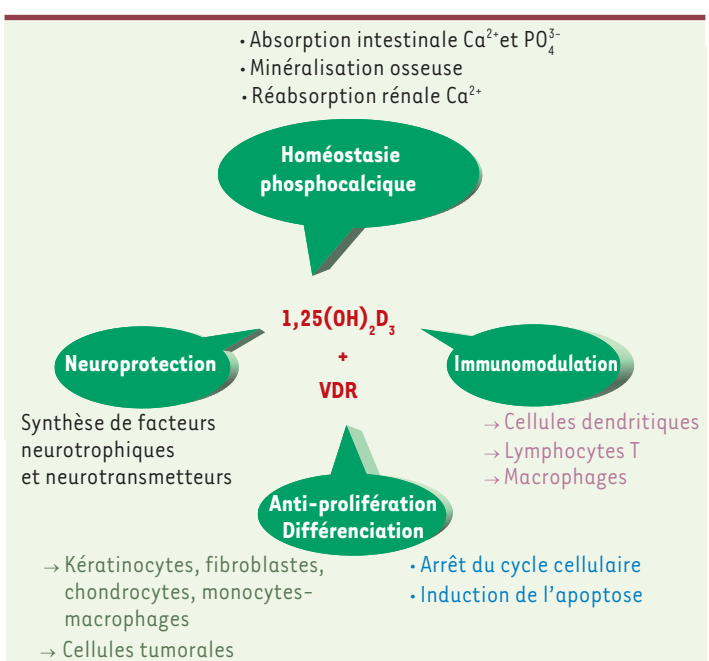


Figure 4. Rôles physiologiques de la vitamine D_3. La forme active de la vitamine D_3, 1,25(OH)2D3 (1,25-dihydroxyvitamine D_3), liée à son récepteur nucléaire VDR est impliquée dans divers processus physiologiques au sein de l'organisme (*pour plus de détails, se référer au texte*).

SUMMARY

Vitamin D: metabolism, regulation and associated diseases

Vitamin D is well known as a hormone involved in mineral metabolism and bone growth. Conversion into the active metabolite 1,25-dihydroxyvitamin D_3 ($1,25(OH)_2D_3$) from the precursor is effected by cytochrome P450 enzymes in the liver (CYP27A1 and CYP2R1) and the kidney (CYP27B1). CYP27A1 has been shown to be transcriptionally regulated by nuclear receptors (PPARα, γ, HNF-4α and SHP) which are ligand-dependent transcription factors. CYP27B1 is tightly regulated by the plasma levels of calcium, phosphate, parathyroid hormone (PTH) and $1,25(OH)_2D_3$ itself. In vitamin D target organs, inactivation of vitamin D is attributed to CYP24A1 which is transcriptionally induced by $1,25(OH)_2D_3$ whose action is mediated by binding to its cognate nuclear receptor, the vitamin D receptor (VDR). Diseases associated to Vitamin D deficiency (rickets in children, and osteomalacia or osteoporosis in adults) and autosomal recessive forms of inherited rickets illustrate the key role of vitamin D in calcium homeostasis and bone metabolism. Recently, discovery of $1,25(OH)_2D_3$ new biological actions that include antiproliferative, prodifferentiating effect on many cell types and immunoregulatory properties creates a growing interest for this vitamin. In this way, a best understanding of various actors implicated in vitamin D metabolism and its regulation is of a major importance to optimise the use of vitamin D in disease prevention. ◊

REFERENCES

1. Brown AJ, Dusso AS, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol* 1999 ; 277 : F157-75.
2. Cheng JB, Levine MA, Bell NH, *et al*. Genetic evidence that the human CYP2R1 is a key vitamin D 25-hydroxylase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004 ; 101 : 7711-5.
3. Souidi M, Dubrac S, Parquet M, Lutton C. Hepatic and extrahepatic sterol 27-hydroxylase: roles in cholesterol and bile acid metabolism and associated diseases. *Gastroenterol Clin Biol* 2003 ; 27 : 100-11.
4. Prosser DE, Jones G. Enzymes involved in the activation and inactivation of vitamin D. *Trends Biochem Sci* 2004 ; 29 : 664-73.
5. Nykjaer A, Dragun D, Walther D, *et al*. endocytic pathway essential for renal uptake and activation of the steroid 25-(OH) vitamin D3. *Cell* 1999 ; 96 : 507-15.
6. Leheste JR, Melsen F, Wellner M, *et al.* Hypocalcemia and osteopathy in mice with kidney-specific megalin gene defect. *FASEB J* 2003 ; 17 : 247-9.
7. Garabédian M. La 1,25dihyroxyvitamine D et son récepteur. *Rev Rhum* 2000 ; 67 (suppl 2) : 39-41.
8. Miller WL, Portale AA. Vitamin D 1 alpha hydroxylase. *Trends Endocrinol Metab* 2000 ; 11 : 315-9.
9. Garcion E, Wion-Barbot N, Montero-Menei CN, *et al*. New clues about vitamin D functions in the nervous system. *Trends Endocrinol Metab* 2002 ; 13 : 100-5.
10. Schuessler M, Astecker N, Herzig G, *et al*. Skin is an autonomous organ in synthesis, two-step activation and degradation of vitamin D_3: CYP27 in epidermis completes the set of essential vitamin D_3-hydroxylases. *Steroids* 2001 ; 66 : 399-408.
11. Post SM, Duez H, Gervois PP, *et al*. Fibrates suppress bile acid synthesis *via* peroxisome proliferator-activated receptor-alpha-mediated downregulation of cholesterol 7alpha-hydroxylase and sterol 27-hydroxylase expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001 ; 21 : 1840-5.
12. Chen W, Chiang JY. Regulation of human sterol 27-hydroxylase gene (CYP27A1) by bile acids and hepatocyte nuclear factor 4alpha (HNF4alpha). *Gene* 2003 ; 313 : 71-82.
13. Quinn CM, Jessup W, Wong J, *et al*. Expression and regulation of sterol 27-hydroxylase (CYP27A1) in human macrophages: a role for RXR and PPARgamma ligands. *Biochem J* 2005 ; 385 : 823-30.
14. Eloranta JJ, Kullak-Ublick GA. Coordinate transcriptional regulation of bile acid homeostasis and drug metabolism. *Arch Biochem Biophys* 2005 ; 433 : 397-412.
15. Armbrecht HJ, Hodam TL, Boltz MA. Hormonal regulation of 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase and 24-hydroxylase gene transcription in opossum kidney cells. *Arch Biochem Biophys* 2003 ; 409 : 298-304.
16. Hewison M, Zehnder D, Bland R, Stewart PM. 1α-Hydroxylase and the action of vitamin D. *Mol Endocrinol* 2000 ; 25 : 141-8.
17. Schiavi SC, Kumar R. The phosphatonin pathway: new insights in phosphate homeostasis. *Kidney Int* 2004 ; 65 : 1-14.
18. Gao XH, Dwivedi PP, Omdahl JL, *et al*. Calcitonin stimulates expression of the rat 25-hydroxyvitamin D3-24-hydroxylase (CYP24) promoter in HEK-293 cells expressing calcitonin receptor: identification of signaling pathways. *J Mol Endocrinol* 2004 ; 32 : 87-98.
19. Chen KS, DeLuca HF. Cloning of the human 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D-3 24-hydroxylase gene promoter and identification of two vitamin D-responsive elements. *Biochem Biophys Acta* 1995 ; 1263 :1-9.
20. Murayama A, Kim M, Yanagisawa J, *et al*. Transrepression by a liganded nuclear receptor via a bHLH activator through co-regulator switching. *EMBO J* 2004 ; 23 : 1598-608.
21. Pascussi JM, Robert A, Nguyen M, *et al*. Possible involvement of pregnane X receptor-enhanced CYP24 expression in drug-induced osteomalacia. *J Clin Invest* 2005 ; 115 : 177-86.
22. Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005 ; 289 : F8-28.
23. Norman AW, Ishizuka S, Okamura WH. Ligands for the vitamin D endocrine system: different shapes function as agonists and antagonists for genomic and rapid response receptors or as a ligand for the plasma vitamin D binding protein. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2001 ; 76 : 49-59.
24. Van Etten E, Mathieu C. Immunoregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D_3: Basic concepts. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005 ; 97 : 93-101.
25. Holick MF. Vitamin D : A millenium perspective. *J Cell Biochem* 2003 ; 88 : 296-307.
26. Holick MF. Noncalcemic actions of 1,25-dihydroxyvitamin D3 and clinical applications. *Bone* 1995 ; 17 (suppl 2) : S107-11.
27. Adorini L. Immunomodulatory effects of vitamin D receptor ligands in autoimmune diseases. *Int Immunopharmacol* 2002 ; 2 : 1017-28.
28. St-Arnaud R, Glorieux FH. 24, 25-Dihydroxyvitamin D: active metabolite or inactive catabolite? *Endocrinology* 1998 ; 139 : 3371-4.
29. Garabédian M, Menn S, Walrant-Debray O, *et al.* Prevention of child and adolescent vitamin D deficiency. II. Validation of a decision-making abacus based on sun exposure and vitamin D intakes. *Arch Pediatr* 2005 ; 12 : 410-9.
30. Maugars Y, Glémarec J, Guillot P, *et al.* Métabolisme phosphocalcique et ostéomalacie. *Rev Rhum* 2000 ; 67 (suppl 2) : 95-8.
31. Breuil V, Euller-Ziegler. Nutrition et vieillissement osseux : l'ostéoporose. *Nutr Clin Metab* 2004 ; 18 : 212-8.
32. Gascon-Barré M. Antiepileptic drugs and bone health. In : Dawson-Hughes B, Holick MF, eds. *Nutrition and bone health*. Totowa-New Jersey, USA : Humana Press, 2004 : 647-66.
33. Pascussi JM, Vilarem MJ. Ostéomalacie consécutive à la prise prolongée de médicaments. Sur la piste de PXR, un récepteur impliqué dans la détoxication. *Med Sci (Paris)* 2005 ; 21 : 582-3.
34. Kato S, Yoshizazawa T, Kitanaka S, *et al.* Molecular genetics of vitamin D- dependent hereditary rickets. *Horm Res* 2002 ; 57 : 73-8.
35. Dumas R. Les rachitismes vitaminorésistants. *Arch Pediatr* 1999 ; 6 : 715-9.
36. Souberbielle JC, Friedlander G, Kahan A, Cormier C. Evaluating vitamin D status. Implications for preventing and managing osteoporosis and other chronic diseases. *Joint Bone Spine* 2006 ; 73 : 249-53.
37. Holick MF. Defects in the synthesis and metabolism of vitamin D. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1995 ; 103 : 219-27.

TIRÉS À PART
E. Tissandié

Article 2 – Les cytochromes P450: métabolisme des xénobiotiques, regulation et rôle en clinique.

Article publié dans « *Annales de Biologie Clinique* ».

Guéguen Y, Mouzat K, Ferrari L, **Tissandié E**, Lobaccaro JMA, Batt AM, Paquet F, Voisin P, Aigueperse J, Gourmelon P et Souidi M.

Ann Biol Clin 2006 ; 64 (6) : 535-48

Les cytochromes P450 : métabolisme des xénobiotiques, régulation et rôle en clinique

Cytochromes P450: xenobiotic metabolism, regulation and clinical importance

Y. Guéguen[1]
K. Mouzat[2]
L. Ferrari[3]
E. Tissandie[1]
J.M.A. Lobaccaro[2]
A.-M. Batt[4†]
F. Paquet[1]
P. Voisin[1]
J. Aigueperse[1]
P. Gourmelon[1]
M. Souidi[1]

[1] Institut de radioprotection et de sûreté nucléaire, Direction de la radioprotection de l'homme, Fontenay-aux-Roses <yann.gueguen@irsn.fr>

[2] Physiologie comparée et Endocrinologie moléculaire, UMR Université Blaise Pascal-CNRS 6547, Aubière

[3] Évaluation et prévention des risques professionnels et environnementaux, Inserm ERI n°11, Université Henri Poincaré - Nancy 1, Faculté de médecine Vandœuvre-les-Nancy

[4] Inserm U525, Centre du médicament, Université Henri Poincaré - Nancy 1, Faculté de pharmacie, Nancy

† Décédée le 29 mars 2006

Résumé. Les cytochromes P450 (CYP) constituent une superfamille de 57 gènes codant pour des enzymes qui métabolisent un grand nombre de médicaments mais également des substances endogènes (stéroïdes, eicosanoïdes, vitamines...). Ces enzymes jouent un rôle majeur dans le métabolisme des xénobiotiques, dont les médicaments, et ont un rôle primordial dans la protection de l'organisme contre les agressions extérieures (polluants, pesticides...). La régulation des CYP est essentiellement transcriptionnelle : les récepteurs nucléaires sont reconnus comme des médiateurs clés de la modulation des enzymes du métabolisme des médicaments. Ils ont pour ligands des substances exogènes mais également endogènes, qui peuvent avoir une action agoniste ou antagoniste sur ces facteurs de transcription. La co-administration de médicaments, ligands agonistes ou antagonistes des récepteurs nucléaires, peut conduire à des toxicités sévères, une perte de l'efficacité thérapeutique ou un déséquilibre du métabolisme d'endobiotiques. Le polymorphisme génétique de ces enzymes joue également un rôle non négligeable dans leur activité métabolique et doit être pris en compte lors de l'administration de médicaments. Ainsi, l'activité des CYP étant dépendante du génotype et de l'environnement, elle est depuis peu utilisée en tant que biomarqueur permettant d'évaluer les conséquences d'une exposition à des molécules environnementales ou la susceptibilité à certaines pathologies.

Mots clés : *cytochrome P450, xénobiotiques, récepteurs nucléaires, détoxication, physiopathologie, régulation*

Abstract. Cytochromes P450 (CYPs) are a superfamily of 57 genes coding for drug metabolizing enzymes and endobiotic metabolizing enzymes (steroids, eicosanoids, vitamins...). This is the main metabolizing enzyme system for foreign compounds, including drugs, which has a primary role in organism protection against potential harmful insults from the environment (pollutants, pesticides...). The CYPs regulation is essentially transcriptional: nuclear receptors are recognized as key mediators for the control of drug metabolizing enzymes. Their ligands are exogenous and also endogenous molecules that can up-regulate or down-regulate these transcription factors. Treatment with drugs or xenobiotics, which are nuclear receptor agonists or antagonists, can lead to severe toxicities, loss of therapeutic effect or endobiotic metabolism disorders. Genetic polymorphisms of these enzymes have an important role in their activity and must be taken into account during drug administration.

Article reçu le 12 avril 2006,
accepté le 30 août 2006

doi: 10.1684/abc.2006.0015

Tirés à part : Y. Guéguen

Then, CYP activity depends on genotype and environment; this is recently used as biomarker to determine human exposure to environmental molecules or to predict the susceptibility to certain pathologies.

Key words: *cytochrome P450, xenobiotics, nuclear receptor, detoxification, physiopathology, regulation*

La membrane cellulaire constitue une barrière efficace protégeant la cellule contre les molécules toxiques et des xénobiotiques hydrosolubles. À l'inverse, les molécules hydrophobes ayant la faculté de franchir aisément la membrane peuvent s'accumuler dans la cellule et atteindre rapidement un seuil de toxicité. Au cours de leur évolution, les organismes ont développé des systèmes limitant l'accumulation de ces composés : il s'agit de transporteurs membranaires permettant une sortie rapide des molécules indésirables et des systèmes de conversion chimique en molécules plus hydrophiles dont l'élimination par les fluides corporels est ainsi facilitée. Les enzymes du métabolisme des xénobiotiques, dont les cytochromes P450 (CYP ou P450), jouent un rôle central dans les phénomènes de biotransformation, du métabolisme et/ou de la détoxication de ces composés étrangers à l'organisme *(figure 1)* [1, 2]. Le métabolisme des xénobiotiques se décompose en 3 phases qui aboutissent au final à l'élimination des substances étrangères dans la bile et l'urine. Les enzymes de la phase I (essentiellement des cytochromes P450), dites de fonctionnalisation, catalysent essentiellement les réactions d'oxydo-réduction et d'hydrolyse ; les enzymes de la phase II (glutathion-S-transférases ou GST, UDP glucuronosyltransférases ou UGT...), dites de conjugaison, catalysent les réactions de transfert, généralement après fonctionnalisation ; les transporteurs de la phase III (*P-glycoprotein* ou Pgp, *multidrug resistance proteins* ou MRP...) transportent au travers des membranes des xénobiotiques, et surtout des dérivés conjugués.

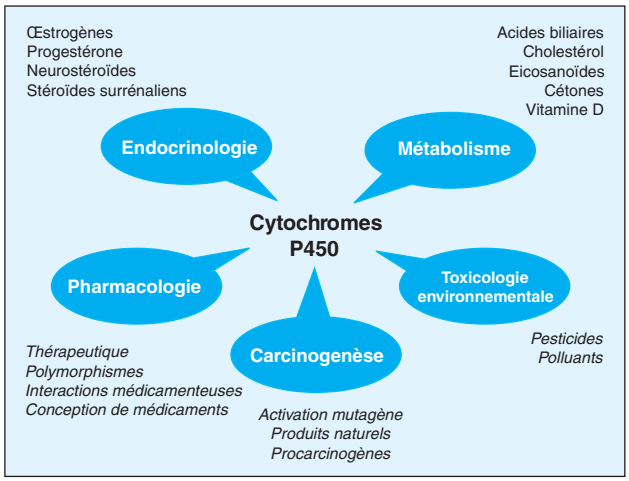


Figure 1. Implications physiologiques et physiopathologiques des cytochromes P450.

La superfamille des cytochromes P450 humains comprend 57 gènes qui codent des enzymes jouant un rôle primordial dans la détoxication des xénobiotiques. Il est maintenant acquis qu'elles sont également impliquées dans le métabolisme de nombreux composés endogènes, tels que l'acide arachidonique et des éicosanoïdes, le cholestérol et les acides biliaires, des stéroïdes et la vitamine D *(figure 1)*.

Une caractéristique d'une partie de cette famille d'enzymes capable de métaboliser des xénobiotiques est leur faible expression basale et leur expression élevée en présence d'inducteurs. La régulation de ces enzymes du métabolisme des xénobiotiques a été largement étudiée depuis plus de 40 ans, à commencer par l'induction par le phénobarbital [3], mais la compréhension des mécanismes moléculaires est récente. Les récepteurs nucléaires sont reconnus comme des médiateurs clés de la régulation des enzymes du métabolisme des médicaments. La régulation des enzymes de la famille des cytochromes P450 étant essentiellement transcriptionnelle, les autres modes de régulation ne sont donc pas évoqués dans cette revue. L'induction ou l'inhibition des CYP et d'autres enzymes du métabolisme des médicaments peut altérer la clairance et donc le taux sérique de ces médicaments ou des xénobiotiques. Ces régulations, en plus des polymorphismes génétiques existants, contribuent aux variations inter- et intra-individuelles de la réponse aux médicaments. De nombreuses pathologies sont également associées au polymorphisme génétique des cytochromes P450. La dernière partie de cette revue sera donc consacrée à l'importance en clinique de ces polymorphismes.

Généralités sur les cytochromes P450

Définition

Les CYP constituent une famille d'hémoprotéines initialement identifiées comme des pigments dans des microsomes de foie de rat [4]. En effet, le nom de cytochrome P450 provient de la propriété de ces pigments d'émettre un spectre d'absorbance à 450 nm, spécifique de ces hémoprotéines [5].

Les propriétés catalytiques d'oxydation et de réduction varient en fonction de la nature de la partie protéique du CYP (apoprotéine). Les CYP permettent un grand nombre de réactions, dont la plus importante est l'hydroxylation. Afin de les rendre fonctionnels, les CYP ont également besoin d'une source d'électrons. Ces électrons sont apportés par une autre protéine : la NADP cytochrome P450 réductase si le cytochrome P450 est situé dans le réticulum endoplasmique, la ferredoxine si le cytochrome P450 est situé dans les mitochondries. Le NADPH est la source majeure d'électrons dans ce système *(figure 2)* [6].

Les propriétés connues des CYP de mammifères peuvent être résumées comme suit :

– les CYP sont formés d'environ 500 acides aminés. Une cystéine localisée près de la région carboxy-terminale de la protéine permet la liaison thiol-ligand, essentielle pour le fer héminique. La région N-terminale est riche en AA hydrophobes et permet la fixation de la protéine aux membranes ;

– ces enzymes sont appelées mono-oxygénases, car elles incorporent un atome d'oxygène à partir d'oxygène moléculaire. Elles transforment une grande variété de composés chimiques. Certains CYP catalysent le métabolisme d'un nombre limité de structures chimiques (tels que les stéroïdes ou les acides gras), alors que d'autres CYP présentent une spécificité de substrats plus large ;

– dans les tissus tels que le foie, l'intestin et les surrénales, la concentration de CYP excède largement la concentration des autres hémoprotéines. En effet, la concentration des CYP peut atteindre 50 µM dans le foie de rat, représentant ainsi plus de 1 % des protéines du foie ; dans le réticulum endoplasmique des hépatocytes les CYP peuvent former plus de 20 % des protéines de cette fraction membranaire ;

– les CYP ont habituellement une expression ubiquitaire, mais certains tissus n'expriment de manière constitutive que certaines isoformes ;

– l'expression de la plupart des CYP est régulée par des facteurs de transcription qui sont activés par différents composés chimiques. La capacité d'un composé à servir d'inducteur est généralement liée à une famille de CYP.

Classification et nomenclature

La purification et le séquençage de nombreux CYP ont été réalisés dans différents laboratoires. Il existe plus de 3 000 séquences de gènes de CYP connus appartenant à toutes les espèces. Chez l'homme, 57 gènes et 47 pseudogènes ont été séquencés (http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html).

Dans le système des mono-oxygénases, la variété des propriétés catalytiques trouve son origine dans la diversité de structure de la partie apoprotéique du cytochrome P450. Selon le degré d'homologie entre les séquences primaires des acides aminés constitutifs, les critères phylogénétiques et l'organisation génétique, les cytochromes P450 ont été ainsi répartis en familles et sous-familles [7].

La nomenclature actuelle des cytochrome P450 consiste à nommer un gène ou un ADNc par le symbole *CYP*, suivi d'un chiffre arabe désignant la famille, d'une lettre majuscule désignant la sous-famille, puis d'un chiffre arabe pour chaque gène [8]. Pour désigner l'ARNm ou la protéine, la même nomenclature est employée sans l'attribut italique. En règle générale, les CYP appartenant à une même famille possèdent plus de 40 % d'homologie de séquence et à l'intérieur d'une même sous-famille, l'identité peut être supérieure à 55 %. Les gènes appartenant à une même sous-famille sont groupés sur un même chromosome en *clusters*.

Structure tridimensionnelle et localisation membranaire

L'alignement de toutes les séquences d'acides aminés des CYP fait apparaître une très faible conservation et seuls trois acides aminés sont parfaitement conservés. Néanmoins, cette variabilité ne prélude pas à une forte conservation de leur topographie générale et de leur structure repliée [9]. La partie la plus conservée est logiquement retrouvée dans le cœur de la protéine et reflète le mécanisme commun de transfert d'électrons et de protons et d'activation d'oxygène. La région la plus variable correspond à la partie N-terminale impliquée dans l'adressage et

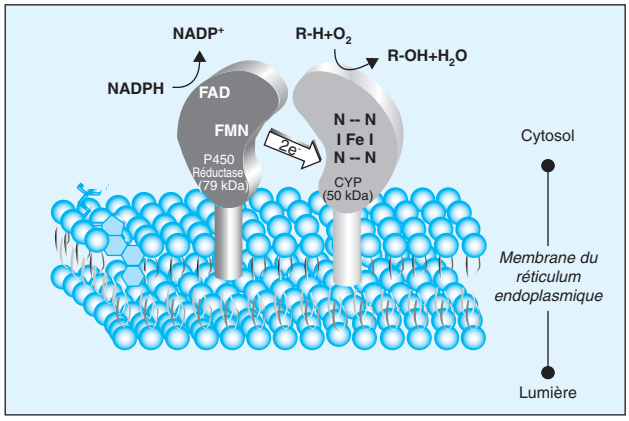


Figure 2. Localisation membranaire de cytochromes P450 dans le réticulum endoplasmique. La transformation d'un composé chimique par les enzymes à cytochromes P450 a lieu sur la face externe du réticulum endoplasmique où est ancrée l'enzyme. Le site actif du cytochrome P450 contient un atome de fer (Fe) fixé par des liaisons de coordinances. Deux électrons, provenant d'une molécule de NADPH, sont transférés à l'hémoprotéine par une flavoprotéine (FAD-FMN) en présence d'une molécule organique (R-H) et d'un atome d'oxygène. Le composé organique est oxydé et un atome d'oxygène moléculaire est incorporé au produit chimique (R-OH). R : médicaments, acides gras, stéroïdes, polluants.

l'ancrage à la membrane, et à la séquence de liaison et de reconnaissance du substrat [10]. Contrairement aux CYP bactériens, les CYP eucaryotes sont associés à la membrane externe du réticulum endoplasmique ou se trouvent dans les mitochondries (membrane interne, externe ou matrice).

Les récents progrès réalisés dans la détermination des structures tridimensionnelles cristallographiques des CYP impliqués dans le métabolisme des médicaments et la visualisation de la manière dont les molécules se fixent aux sites actifs de cette classe d'enzymes, devraient faciliter le développement de nouveaux médicaments. En effet, l'industrie pharmaceutique attache une attention particulière à la structure tridimensionnelle des cytochromes P450 permettant de mieux comprendre et de mieux prédire les interactions entre la molécule cible et les CYP [11, 12].

Rôles physiologiques des cytochromes P450

Les CYP des familles 1, 2 et 3 sont généralement impliqués dans la phase I du métabolisme des médicaments et d'autres composés étrangers à l'organisme, alors que les autres possèdent des fonctions endogènes. Dans le foie, les proportions des différents CYP sont connues : le CYP3A4 (20 à 50 %), le CYP2C8/9 (10 à 30 %), le CYP2D6 (2 à 6 %), le CYP2C19 (1 à 10 %), le CYP1A2 (1 à 13 %), le CYP2E1 (7 %) ainsi que les CYP2A6, et 4A [2, 13]. Ils représentent plus de 90 % des enzymes impliquées dans le métabolisme oxydatif des médicaments. Les mono-oxygénases à cytochrome P450 sont également essentielles dans les phénomènes de biotransformation de substances physiologiques (stéroïdes, acides biliaires, vitamine D, acides gras, prostanglandines, leucotriènes, rétinoïdes, amines biogènes...) *(tableau 1)*.

Dans cette revue, nous développerons essentiellement les CYP impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques, puis nous aborderons succinctement quelques métabolismes de composés endogènes catalysés par les CYP.

Métabolisme des xénobiotiques (médicaments et substances toxiques)

Parmi les 57 CYP humains, 15 sont impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques appartenant essentiellement aux familles 1, 2 et 3. Bien que quelques substrats endogènes aient été identifiés, la grande majorité des molécules transformées sont des xénobiotiques. En effet, plus de 90 % du métabolisme des médicaments passe par l'activité des CYP et plus de 2 000 substrats ont été identifiés à ce jour [14].

Famille CYP1

Cette famille est composée de trois gènes (CYP1A1, 1A2, 1B1) régulés au niveau transcriptionnel par la voie AhR-ARNT (*aryl hydrocarbon receptor-aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*). Cette régulation sera discutée plus en détail par la suite.

Ces trois enzymes détoxifient ou activent de nombreux procarcinogènes environnementaux, des toxines et quelques médicaments [15-17]. L'activité du CYP1A est induite par les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), tels que ceux retrouvés dans les produits d'incinération de composés industriels, la fumée de cigarette, les viandes grillées, mais également certains végétaux crucifères (brocoli, choux de Bruxelles). L'expression du CYP1A1 et du CYP1B1 est principalement extrahépatique et est inductible dans pratiquement tous les tissus étudiés, dont les poumons, la glande mammaire et le placenta. À l'inverse, CYP1A2 est exprimé essentiellement au niveau du foie et représente environ 13 % des CYP hépatiques. Les CYP1A1, CYP1B1 et probablement CYP1A2 métabolisent des composés endogènes, tels que les prostaglandines, les œstrogènes et la mélatonine [17].

Famille CYP2

La famille CYP2 est la plus grande famille de CYP chez l'homme. À la différence de la famille CYP1, les membres de cette famille ne partagent pas le même système de régulation. Les spécificités de substrats et de tissus sont également très différentes. Nous nous concentrerons dans ce chapitre sur les CYP2C et CYP2D qui sont quantitativement les plus importants de cette famille dans le foie et qui jouent un rôle majeur dans le métabolisme des médicaments.

Famille CYP2C

Elle est composée de 4 gènes : CYP2C8, 2C9, 2C18 et 2C19. L'isoenzyme CYP2C9 est la plus abondante, suivi par 2C8 et 2C19. En plus de transformer de nombreux composés endogènes comme l'acide arachidonique, ce système métabolise environ 25 % des médicaments utilisés en clinique [13].

Les médicaments métabolisés par le CYP2C sont fréquemment prescrits tels que le losartan, la fluvastatine, certains anti-inflammatoires non stéroïdiens, des antidépresseurs ainsi que des produits à index thérapeutique étroit dont la warfarine et la phénytoïne. La rifampicine et les barbituriques sont des inducteurs du CYP2C. Le polymorphisme génétique de cette famille a une importance clinique non négligeable, se traduisant notamment par une vitesse de métabolisme très variable selon les patients [18, 19].

Famille CYP2D

Chez l'homme, le CYP2D6 est le seul gène actif de la sous-famille CYP2D qui comprend trois gènes (2D6, 2D7

et 2D8). Certains polymorphismes de CYP2D6 entraînant une altération de son expression ou de son activité enzymatique ont été associés à une déficience du métabolisme des médicaments [20]. À l'inverse, les formes avec plusieurs copies du gène, identifiées chez certains individus, aboutit à un métabolisme très rapide des médicaments [21]. En conséquence, le métabolisme de plusieurs médicaments fréquemment utilisés est affecté, dont celui des analgésiques, du dextrométorphane, des antiarythmiques, des antidépresseurs, des antihistaminiques, des inhibiteurs de l'acétylcholine estérase et des hallucinogènes comme la kétamine [22]. Cette enzyme intervient également dans le métabolisme de composés endogènes, notamment certains neurotransmetteurs [23, 24]. L'expression de CYP2D pourrait également jouer un rôle dans la détoxication de polluants chimiques environnementaux tels que les pesticides.

Famille CYP3

La famille CYP3 comprend seulement une sous-famille, le CYP3A composé de 4 gènes 3A4, 3A5, 3A7 et 3A43 [8] dont l'expression tissulaire diffère : CYP3A4 est exprimé principalement dans le foie, CYP3A5 dans les tissus extra-hépatiques, et CYP3A7 dans le foie fœtal.

CYP3A4 a un rôle fondamental puisqu'on estime que plus de 50 % des médicaments sont métabolisés par cette enzyme (antibiotiques, anesthésiques, antihistaminiques, corticostéroïdes, statines, inhibiteurs de la protéase du VIH, certaines benzodiazépines, immunosuppresseurs...) (http://medicine.iupui.edu/flockhart/table.htm). CYP3A4 peut ainsi être impliqué dans de nombreuses interactions médicamenteuses importantes en clinique. Des stéroïdes naturels tels que la testostérone et la progestérone [25, 26] sont également métabolisés par cette enzyme. Un important système de régulation contrôle l'expression de cette enzyme, notamment par l'activation de facteurs de transcription par des ligands spécifiques [27]. Les propriétés pharmacologiques de ce système de régulation expliquent la capacité de certains médicaments à protéger l'organisme des effets toxiques d'autres composés. Selon qu'il se produit une induction ou une inhibition de cette enzyme, l'efficacité thérapeutique d'un médicament ou de sa forme active peut également être modulée. Par conséquent, l'administration concomitante par voie orale d'un inhibiteur du CYP3A4 (jus de pamplemousse) et d'un médicament substrat de cette même isoenzyme (statines) peut entraîner une augmentation très importante de la concentration plasmatique du médicament et conduire ainsi à une toxicité accrue [28].

Métabolisme des endobiotiques

Les CYP sont impliqués dans la détoxication de xénobiotiques mais également dans celui de molécules endogènes (ou endobiotiques). Ainsi, bien que cette revue soit centrée sur le métabolisme des xénobiotiques, il paraît important à ce stade de faire un bref rappel des voies catalysant les endobiotiques puisque de nombreuses interrelations entre le métabolisme des endobiotiques et celui des xénobiotiques existent. Ce sont essentiellement les CYP des familles 4 à 51 qui présentent des fonctions de biotransformation de molécules endogènes telles que la biosynthèse des hormones stéroïdiennes, des stérols, des prostaglandines, des acides gras et de la vitamine D3 [2, 17], mais les familles 1 à 3 participent également au catabolisme de ces substances endogènes *(tableau 1)*.

Tableau 1. Fonctions métaboliques des cytochromes P450.

Cytochrome P450	Fonctions métaboliques
CYP1	Métabolisme des xénobiotiques et des stéroïdes
CYP2	Métabolisme des xénobiotiques et des stéroïdes
CYP3	Métabolisme des xénobiotiques et des stéroïdes
CYP4	Métabolisme des acides gras, eicosanoïdes, acide arachidonique et médicaments
CYP5	Thromboxane A2 synthase
CYP7	Synthèse des acides biliaires
CYP8	Synthèse des acides biliaires, prostacycline synthase
CYP11	Stéroïdogenèse
CYP17	Stéroïde 17-alpha hydroxylase
CYP19	Aromatase (synthèse des œstrogènes)
CYP21	Stéroïdogenèse, stéroïde 21-hydroxylase
CYP24	Dégradation de la vitamine D, vitamine D-24 hydroxylase
CYP26	Hydroxylation de l'acide rétinoïque
CYP27	Synthèse des acides biliaires, hydroxylations de la vitamine D3
CYP39	7α-hydroxylation du 24S-hydroxycholestérol
CYP46	Cholestérol 24S-hydroxylase
CYP51	Lanostérol 14-alpha déméthylase (biosynthèse du cholestérol)

Six cytochromes P450 participent à la stéroïdogenèse : les CYP11A1, 11B1 et 11B2 sont des enzymes mitochondriales alors que les CYP17A1, 19A1 et 21A2 sont localisées dans le réticulum endoplasmique. CYP17A1 est nécessaire à la synthèse du cortisol, de la testostérone et d'œstrogènes ; CYP19A1 transforme quant à lui les androgènes en œstrogènes. Le CYP21 catalyse une étape essentielle de la synthèse des glucocorticoïdes et des minéralocorticoïdes à partir de précurseurs stéroïdes. Les CYP qui métabolisent les médicaments peuvent également jouer un rôle dans le métabolisme de composés endogènes, habituellement celui des stéroïdes tels que l'œstradiol et la testostérone [29]. Ainsi, certaines enzymes dont CYP3A seraient capables de contrôler les concentrations des hormones sexuelles (œstrogènes et androgènes).

Un bon exemple de cette dualité de fonction (endogène et exogène) est observé pour les CYP qui métabolisent

l'acide arachidonique. Au moins 14 CYP appartenant aux familles CYP1, 2, 3, 4, 5A et 8A participent directement ou secondairement à ce métabolisme. Les prostaglandines D, E, F, éicosanoïdes (EET, HETE), leukotriènes et tromboxane A_2 ainsi générés jouent un rôle dans de nombreux processus biologiques : vasoconstriction et vasodilatation, réponse allergique, agrégation plaquettaire, transport ionique, hyperthermie... [30-32].

Le métabolisme du cholestérol et la biosynthèse des acides biliaires sont également fortement dépendants d'enzymes à cytochrome P450. Le CYP51A1 a un rôle clé dans la synthèse du cholestérol et est l'un des cytochromes P450 les mieux conservés au cours de l'évolution [33]. La synthèse des acides biliaires à partir du cholestérol est la principale voie catabolique conduisant à l'élimination du cholestérol de l'organisme. Cette transformation métabolique est catalysée par au moins sept cytochromes P450 différents, dont des membres des familles CYP3, CYP7, CYP8, CYP27, CYP39 et CYP46 [34-36].

Ces quelques données soulignent ainsi le rôle des CYP dans la modulation des concentrations plasmatiques de médicaments. De plus, l'implication des mêmes systèmes de détoxication dans la transformation de molécules exogènes et endogènes peut se traduire par des interférences entre le métabolisme endogène et le métabolisme des médicaments ou xénobiotiques.

Régulation transcriptionnelle des gènes codant les cytochromes P450

La régulation des enzymes impliquées dans le catabolisme des médicaments est un acteur important du métabolisme de ces molécules et de leur efficacité thérapeutiques. Les gènes codant ces enzymes sont inductibles par de nombreux xénobiotiques ou par des ligands endogènes. Il est maintenant clairement établi que la plupart de ces molécules, essentiellement exogènes, vont moduler l'activité transcriptionnelle de certains récepteurs nucléaires ayant pour cibles les cytochromes P450 impliqués dans le métabolisme des médicaments. Il est important de noter que ces mêmes récepteurs nucléaires peuvent également réguler des transporteurs membranaires dont les activités vont réduire l'efficacité thérapeutique des médicaments. Ce point ne sera pas développé dans ce chapitre. Ces récepteurs appartiennent à une grande famille de facteurs de transcription activés par des ligands. Ceux-ci sont représentés par une grande variété de molécules lipophiles telles que les stéroïdes, les acides gras, les eicosanoïdes, les acides biliaires et les oxystérols. Cependant, certains récepteurs, dont aucun ligand endogène n'a encore été identifié, peuvent être activés par des médicaments et d'autres xénobiotiques. Parfois, des polluants tels que la dioxine ou des pesticides, peuvent être des ligands de ces récepteurs. Dans la majorité des cas, la présence d'un ligand endogène ou exogène va moduler la transcription des gènes cibles selon une séquence mécanistique maintenant bien établie (pour une revue lire [35]). Schématiquement, en absence de ligand les facteurs de transcription sont bloqués par des protéines nucléaires (co-represseurs) ou cytoplasmiques (chaperonnes). L'arrivée d'une molécule activatrice (ligand ou autre) va entraîner le départ des protéines « bloquantes » et la libération des capacités transcriptionnelles du facteur de transcription. L'analyse des liens qui existent entre les récepteurs nucléaires et les différents agonistes exogènes (ou toxicogénomique [37] représente un champ d'étude en pleine expansion [38, 29] ; il sera ainsi possible de comprendre les effets toxiques de molécules agonistes, de classer de nouvelles molécules en fonction de leurs effets biologiques, et d'identifier les facteurs environnementaux qui peuvent moduler l'innocuité et l'efficacité de médicaments existants ou futurs.

Si de nombreux récepteurs nucléaires ont été associés à la régulation transcriptionnelle des cytochromes P450 catabolisant ou détoxifiant les xénobiotiques [29], nous focaliserons ce chapitre sur les récepteurs nucléaires des prégnanes (PXR), des acides gras poly-insaturés (PPAR), de l'androstérone (CAR) et celui moins conventionnel de la dioxine (AhR) qui modulent les gènes codant les enzymes de la phase I et II du métabolisme. Dans la plupart des cas, c'est à partir de l'utilisation de souris dont les gènes endogènes ont été invalidés, ainsi que celles de souris « humanisées », c'est-à-dire dont le gène a été remplacé par la forme humaine, qu'ont été identifiées les cibles moléculaires de ces récepteurs nucléaires et les agonistes endogènes ou exogènes (xénobiotiques). Les récepteurs nucléaires LXR et FXR également régulateurs de CYP et de transporteurs membranaires régulant la détoxication des acides biliaires ne seront pas évoqués.

PXR

Le récepteur nucléaire orphelin PXR (*pregnane X receptor*), aussi appelé récepteur des stéroïdes et des xénobiotiques (SXR) ou récepteur activé par les prégnanes, a été identifié par différentes équipes indépendamment, à la fois chez la souris et dans l'espèce humaine (pour une revue lire [39]). Un orthologue a été identifié par la suite chez le rat, le lapin, le chien et le porc. À la différence des autres récepteurs nucléaires, la comparaison de la séquence en acides aminés du domaine de liaison du ligand montre de grandes divergences entre tous les orthologues de PXR. Ces spécificités expliquent les différences observées dans l'induction des gènes codant les CYP par les différents médicaments. Ce point crucial démontre l'intérêt de disposer de modèles animaux se rapprochant le plus possible

du modèle humain pour étudier les effets de xénobiotiques dans l'induction du métabolisme ou de la détoxication des médicaments et ce, pour en augmenter l'efficacité thérapeutique. Ce récepteur est exprimé abondamment dans le foie, l'intestin grêle, le côlon et la glande mammaire. Il est intéressant de noter que ces mêmes tissus sont les sites majeurs d'expression des gènes codant les cytochromes CYP3A.

PXR est un récepteur exclusivement nucléaire qui s'hétérodimérise avec le récepteur RXR de l'acide rétinoïque 9-*cis*. À ce jour, l'inducteur le plus puissant du PXR humain est l'hyperforine, molécule isolée du millepertuis (*Hypericum perforatum*), couramment utilisée en phytothérapie dans le traitement de certains états dépressifs. On comprend donc l'intérêt considérable d'élucider les mécanismes moléculaires régulant l'induction des enzymes de détoxication afin de prévenir les effets indésirables liés à cette phytothérapie [39, 40].

PXR est le régulateur transcriptionnel de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme et le transport des médicaments *(figure 3)*. Parmi les gènes cibles chez l'homme, on retrouve ceux codant les enzymes de la phase I telles les mono-oxygénases CYP2B6, CYP2C8 et C9, CYP3A4 et 7. CYP3A est responsable du métabolisme oxydatif de la plupart des médicaments ainsi que de celui des xénobiotiques d'origine alimentaire et environnementale. En plus des enzymes oxydatives de la phase I, PXR peut également réguler la transcription des enzymes de conjugaison de la phase II comme les glutathion S transférases, les sulfotransférases et les UDP-glucuronosyltransférases. Enfin, PXR peut activer le gène MDR1 impliqué dans la sortie cellulaire des molécules exogènes [41].

PXR est donc un acteur clé du système adaptatif de défense contre les xénobiotiques. Le récepteur est activé par de nombreuses molécules endogènes ou exogènes (stéroïdes, antibiotiques, antifongiques, anticancéreux et l'antidépresseur naturel extrait de millepertuis) (*tableau 2* [42]). L'analyse cristallographique de la poche de fixation du ligand a mis en évidence une cavité importante permettant l'interaction du récepteur avec de nombreuses molécules hydrophobes. PXR peut donc être considéré comme un *senseur* de toxines hydrophobes [39, 43].

CAR

D'un point de vue phylogénique, CAR (*constitutive androstane receptor*) est très proche de PXR. Exprimé essentiellement dans le foie, et dans une moindre mesure dans l'intestin, les reins, les poumons, le cœur et les mus-

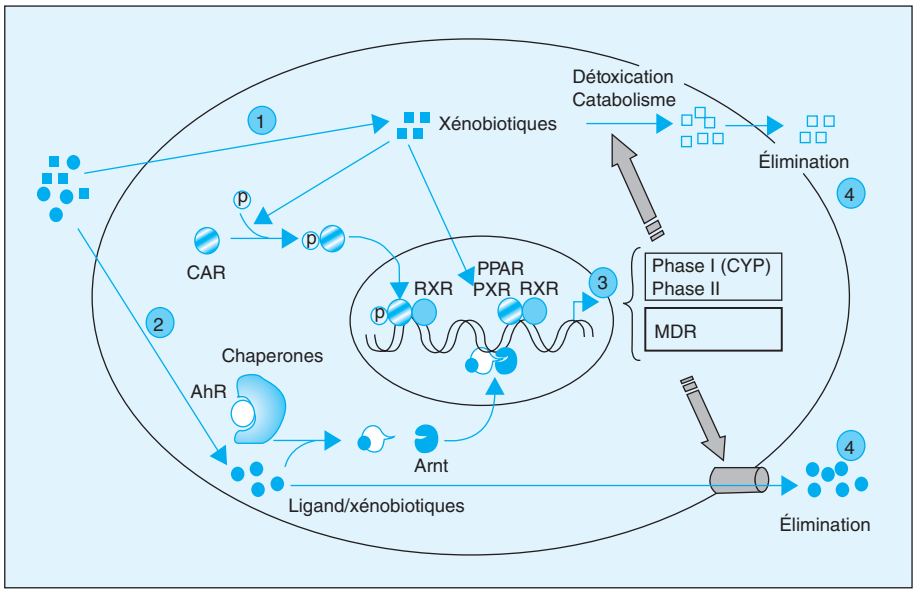


Figure 3. Régulation de la détoxication et du catabolisme des xénobiotiques par les récepteurs nucléaires PXR, PPAR, CAR et le facteur de transcription AhR. Lorsque des xénobiotiques pénètrent dans une cellule, plusieurs mécanismes peuvent être mis en jeu pour limiter l'accumulation de produits toxiques : 1) l'activation de la capacité transcriptionnelle de récepteurs nucléaires peut être réalisée directement par liaison dans la poche de liaison hydrophobe du ligand (cas de PPAR ou PXR) ou par phosphorylation de la protéine (cas du récepteur CAR par les phénobarbitates) ; 2) certains xénobiotiques se comportent comme des ligands de la protéine AhR : la liaison entraîne la séparation des protéines chaperonnes qui bloquent AhR dans le cytoplasme, la dimérisation avec Arnt et leur fixation sur les promoteurs des gènes cibles. Dans les deux cas, l'augmentation de l'activité transcriptionnelle des protéines provoque une réponse accrue de la cellule, et (3) la synthèse de deux types de protéines : les enzymes de la phase I et de la phase II impliqués dans la détoxication ou le catabolisme des xénobiotiques ou des protéines de transport de type MDR (*multi drug resistance proteins*) ; *in fine* (4), les xénobiotiques sont éliminés de la cellule. Pour plus de détails se référer au texte.

Tableau 2. Molécules agonistes des récepteurs nucléaires PXR, CAR, PPARα et PPARγ, et du facteur de transcription AhR impliqués dans les processus de détoxication et d'élimination des xénobiotiques.

Facteurs de transcription	Agonistes potentiels	Exemples d'agonistes	Gènes cibles chez l'homme
PXR	Extraits de plantes	Hyperforine (millepertuis)	CYP2B6
	Statines	Lovastatine	CYP2C8
	Antibiotiques	Rifampicine	CYP2C89
	Antidiabétiques (TZD)	Troglitazone	CYP3A4
	Barbituriques	Phénobarbital	CYP3A7
	Acides biliaires	Acide ursodéoxycholique	GST
	Stéroïdes de synthèse	RU486, dexaméthasone	ST
	Stéroïdes naturels	Prégnénolone	UGT1A1
	Antihormones	Acétate de cyprotérone	MDR1
CAR	Analgésiques	Acétaminophène (paracétamol)	CYP2B6
	Barbituriques	Phénobarbital	CYP2C9
	Opiacés	Cocaïne	CYP2C19
PPARα	Hypolipidémiants (lactones)	Chlofibrate, fénofibrate	CYP1A
			CYP2A
			CYP2C
			CYP2E
			CYP4A
			UGT1A4
			UGT2B4
PPARγ	Antidiabétiques (TZD)	Rosiglitazone	CYP4A
AhR	Hydrocarbures polycycliques aromatiques	Dioxine	CYP1A1
	Benzo(a)pyrène	Fumée de cigarette	CYP1A2
	Antiulcéreux (benzimidazole)	Oméprazole	CYP1B1

CYP : cytochrome P450 ; GST : glutathione S transférase ; ST : sulfotransférase ; UGT : UDP-glucuronosyltransférase ; MDR1 : *multi drug resistance protein 1* ; TZD : thiazolidinediones. D'après [42].

cles, CAR interagit avec deux métabolites endogènes de la testostérone : l'androstanol et l'androsténol [44, 45]. La fixation de ces molécules dans la poche de fixation du ligand se traduit contre toute attente par une inhibition des capacités transcriptionnelles de CAR, faisant de ce récepteur le premier exemple d'un facteur de transcription régulé négativement par des ligands endogènes. Au-delà de ce mécanisme, le phénobarbital régule l'activité transcriptionnelle de CAR en augmentant son déplacement depuis le cytoplasme vers le noyau *(figure 3)*. L'utilisation de l'acide okadaïque, un inhibiteur de phosphatase de type 2A, a démontré que le phénobarbital augmentait la phosphorylation de CAR. Dans l'espèce humaine, l'activation de CAR est associée à une induction des gènes codant des CYP tels que CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19 *(tableau 2)*.

Au total, il existe clairement une interaction entre les voies de régulation activées par PXR et CAR [39]. Même si l'analyse des éléments de réponse localisés dans le promoteur des gènes suggère que les deux voies de régulation sont distinctes, il existe des arguments physiologiques et physiopathologiques montrant que CAR peut être considéré comme un senseur de xénobiotiques, et ce même si son spectre d'action est loin d'être aussi large que celui de PXR, sans doute en raison d'une poche de fixation du ligand plus étroite que celle de PXR.

PPAR

Les récepteurs PPAR (*peroxysome proliferative activated receptor*) comportent trois isotypes (alpha, bêta/delta et gamma). De façon générale, ces récepteurs sont des régulateurs clés de l'homéostasie glucidique, du métabolisme des lipides, de la prolifération et de la différenciation cellulaire (pour une revue sur les PPAR voir [46]). De nombreux effets toxiques des ligands de PPARγ ont été décrits, mais ce sont ceux de PPARα qui ont été le plus étudiés à ce jour. À côté des acides gras poly-insaturés qui sont les ligands endogènes des PPAR, les fibrates, agents couramment utilisés comme hypolipidémiants, sont aussi des ligands de PPARα retrouvés en grande quantité dans le foie *(tableau 2)*. D'autres agonistes xénobiotiques ont été associés chez les rongeurs à une prolifération de peroxisomes (d'où le nom donné aux récepteurs), à une induction de la prolifération cellulaire et à la suppression de l'apoptose, avec parfois une hépatomégalie et une carcinogenèse [47]. Ces mécanismes abondamment étudiés chez le hamster ont été peu abordés dans l'espèce humaine. Du point de vue de la détoxication, PPAR active aussi bien la transcription de gènes de phase I (CYP1A, CYP2A, CYP2C et CYP2E) que de la phase II de conjugaison comme UGT1A4, et surtout UGT2B4, impliqué

dans la glucuronidation de l'acide hyodéoxycholique, dérivé beaucoup moins toxique que l'acide biliaire lithocholique [48].

RXR

Le récepteur de l'acide rétinoïque 9-*cis* n'est pas, *per se*, impliqué dans les mécanismes d'induction des CYP par les médicaments. Les données concernant ce récepteur ayant déjà fait l'objet d'une revue [35] ne seront pas détaillées dans cette revue. Étant un partenaire de fixation obligatoire des récepteurs PXR, CAR et PPAR, il semble opportun de signaler que RXR peut modifier la réponse de ces derniers en fonction de la présence de son ligand ou de toute autre molécule agoniste.

AhR

AhR (*aryl hydrocarbon receptor*) est structurellement distinct de la super-famille des récepteurs nucléaires. Il s'agit d'un facteur de transcription de la famille Per-Arnt-Sim présentant des domaines d'interaction hélice-boucle-hélice. Détecté chez presque tous les vertébrés, AhR est présent dans la glande mammaire, le foie, le système nerveux central, le système cardiovasculaire, et l'utérus [49]. En absence de ligand, AhR est séquestré dans le cytoplasme dans un complexe de molécules chaperonnes *(figure 3)*. La liaison du ligand entraîne la translocation nucléaire de AhR et s'associe avec son partenaire Arnt (*AhR-nuclear translocator*). Le dimère Arnt-AhR avec son ligand peut alors se fixer en amont des gènes cibles au niveau des promoteurs pour moduler leur activité transcriptionnelle. Parmi la centaine de gènes cibles identifiés, CYP1A1 et 1B1 occupent une place de choix, car ils sont impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques.

AhR fixe une dioxine, le 2,3,7,8 TCDD (tétrachlorodibenzo-p-dioxin), ainsi que d'autres molécules d'hydrocarbures polycycliques aromatiques fortement hydrophobes, telles que les furanes. Des molécules endogènes ont une faible affinité pour AhR comme la biliverdine, mais également certains rétinoïdes de synthèse et certains pesticides. L'activité transcriptionnelle de AhR peut être inhibée de façon tout à fait intéressante par un dérivé phénolique présent dans le raisin et le vin, le resvératrol, et un oxystérol, le 7-cétocholestérol [50].

Au total, il est maintenant clairement établi que les récepteurs nucléaires peuvent modifier l'induction des CYP impliqués dans les processus de catabolisme/détoxication des médicaments et donc perturber la cinétique d'action des molécules et leur demi-vie. De plus, l'administration concomitante de molécules thérapeutiques et des produits *a priori* inoffensifs, comme le millepertuis ou certains jus de fruits, peut conduire à une inefficacité des médicaments, voire à des effets indésirables. De plus, la démonstration de l'efficacité d'un médicament doit de plus en plus tenir compte de l'induction des enzymes de la phase I et des modèles utilisés, puisque certains récepteurs nucléaires comme PXR se comportent différemment selon les espèces animales. Au total, la découverte des récepteurs nucléaires comme senseurs des xénobiotiques intervenant dans la régulation des enzymes impliquées dans le métabolisme des médicaments pose la question de l'émergence de ces mêmes récepteurs comme cibles thérapeutiques. Ainsi, l'inhibition de CAR pourrait peut-être prévenir l'accumulation des métabolites hépatotoxiques du paracétamol. À l'inverse, l'induction de PXR pourrait constituer une voie de traitement des patients atteints de cholestase présentant un fort niveau d'acide biliaire. C'est d'ailleurs sur ce principe que repose l'utilisation de l'acide ursodéoxycholique dans le traitement de cette pathologie. Les différents récepteurs nucléaires étant également exprimés dans de nombreux tissus et impliqués dans l'homéostasie de nombreux métabolismes, il appartiendra d'étudier les effets des ligands agonistes sur des animaux « humanisés » avant d'envisager l'utilisation de ces molécules en thérapeutique humaine.

Importance des cytochromes P450 en clinique

Le métabolisme des médicaments est une étape cruciale dans leur détoxication et leur élimination. Seuls quelques CYP sont fortement impliqués dans les voies de transformation et d'élimination des principes actifs chez l'homme. Il s'agit des CYP 1A2, 2A6, 2B6, 2C9/19, 2D6, 2E1 et 3A4.

Les différents polymorphismes

Les cytochromes P450 cités ci-dessus sont parmi les enzymes les plus étudiées sur le plan génétique car il existe une forte variabilité individuelle des activités basales et induites, le polymorphisme étant défini comme une variabilité génétique présente dans plus de 1 % de la population. Dans certains cas, ces variations génétiques (génotype) peuvent être associées à des modifications de l'activité enzymatique (phénotype).

Polymorphisme d'activité

Dans ce cas, l'expression du gène et la quantité de protéines sont inchangées, seule l'activité enzymatique est modifiée. L'effet peut être une augmentation de l'activité (qualifié de « métaboliseur » rapide) ou une diminution de celle-ci (qualifié de « métaboliseur » lent). Le paradigme est constitué par CYP2D6, qui est non seulement le plus étudié, mais également celui pour lequel les différents cas de figure sont rapportés. Ainsi ces modifications d'activité vont altérer la biodisponibilité des médicaments en aug-

Tableau 3. Pathologies d'origine génétique pour lesquelles un polymorphisme (CYP1B1, CYP2A6, CYP2D6, CYP7A1, CYP27A1) ou une mutation (CYP11B, CYP17 et CYP21) de P450 est impliqué, d'après [51-56].

Gène	Pathologie
CYP1B1	Glaucome
CYP2A6	Dépendance à la nicotine
CYP2D6	Parkinson
CYP7A1	Hypercholestérolémie
CYP11B	Déficience en aldostérone
CYP17, CYP21	Hyperplasie surrénalienne
CYP27A1	Xanthomatose cérébro-tendineux

Tableau 4. Fréquence allèlique des polymorphismes affectant le métabolisme des médicaments dans la population caucasienne, d'après [58].

Gène	Prévalence (%)
CYP 1A1/2	10
CYP 2A6	5
CYP 2C9	3
CYP 2C19	5-20
CYP 2D6	5-7
CYP 2E1	> 1

Tableau 5. Fréquence allèlique de polymorphismes de CYP2D6 conduisant à une activité métabolique lente selon les populations, d'après [21, 58].

Population	Fréquence de « métaboliseurs lents » (%)
Caucasiens	5-10
Japonais	0,7
Chinois	0,7
Moyen-Orientaux	2
Afro-Américains	6,1

mentant ou diminuant leurs métabolismes dépendant des CYP. Les polymorphismes décrits pour les différents CYP sont présentés sur le site : http://www.imm.ki.se/CYPalleles.

Polymorphisme de régulation

L'action des facteurs de transcription sur la régulation transcriptionnelle des gènes étant dépendante de la séquence de l'ADN dans les promoteurs, on peut concevoir que des mutations et/ou polymorphismes géniques de ces régions puissent entraîner des modifications de leur régulation. En retour, le niveau de protéines peut être affecté. Ainsi, un polymorphisme particulier du gène CYP1A2 qui modifie la réponse aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) a été associé à une susceptibilité accrue de développer un cancer du poumon [2].

Pathologies associées à un polymorphisme génétique de cytochrome P450

Plusieurs pathologies sont associées à des modifications de séquences de CYP (*tableau 3*) [51-56]. Si le lien entre certaines mutations de CYP2D6 et la maladie de Parkinson est encore discuté à l'heure actuelle, la relation entre certains polymorphismes de CYP2A6 et la dépendance à la nicotine est clairement établie [57]. De plus, même s'il s'agit d'une pathologie endocrinienne, il faut souligner l'importance des nombreuses mutations du gène CYP21B, codant une des enzymes de la stéroïdogenèse, associées à l'hyperplasie congénitale des surrénales, une des cinq pathologies dont le dépistage est réalisé à la naissance (prévalence de 1/5 000). Dans la plupart des cas, il s'agit de la conversion génique du gène CYP21B en pseudogène CYP21A. (Voir http://www.imm.ki.se/CYPalleles).

Polymorphismes affectant le métabolisme des médicaments

Les gènes présentant un polymorphisme affectant d'une façon ou d'une autre le métabolisme des médicaments sont présentés dans le *tableau 4* [58] avec la fréquence allélique dans la population caucasienne. Pour les gènes CYP2A6 et 2D6, des duplications complètes ont été décrites, conduisant à un métabolisme accéléré des substrats et donc à une moindre efficacité thérapeutique par augmentation de la quantité de protéine. Dans le cas particulier de CYP2D6 (plus de 90 allèles décrits : http://www.imm.ki.se/CYPalleles), un individu a exprimé jusqu'à treize copies du même gène. Le *tableau 5* [21, 58] présente les fréquences alléliques des « métaboliseurs lents » de CYP2D6 dans différentes populations. Ainsi, la forte variabilité de CYP2D6 dans les différentes populations a conduit les industriels à développer des molécules échappant au métabolisme par cette enzyme [21, 58]. Il reste cependant de nombreux médicaments métabolisés par CYP2D6. Il s'agit en particulier de bêta-bloquants, d'antiarythmiques, d'antidépresseurs tricycliques, d'antipsychotiques ainsi que de certains inhibiteurs spécifiques de la recapture de la sérotonine [19].

Pour CYP2C9, les variants « métaboliseurs lents » concernent jusqu'à 13 % de la population [18]. Les médicaments visés sont essentiellement la phénytoïne et la warfarine [19]. En ce qui concerne CYP2C19, les variations génétiques affectant l'efficacité de l'enzyme représentent jusqu'à 32 % de la population [18]. Plusieurs médicaments sont concernés dont les inhibiteurs de la pompe à proton [19].

Pour CYP3A, le retentissement clinique a été longtemps controversé. Des études récentes montrent cependant clairement un lien entre certains polymorphismes de CYP3A5 et une variation de la pharmacocinétique de certains médicaments. Les médicaments dont le métabolisme est affecté par les polymorphismes de CYP3A5 sont le midazolam

[59], le sirolimus [60, 61], le tacrolimus [62], la ciclosporine [63], la simvastatine et l'atorvastatine [64]. Il a également été montré un impact du polymorphisme de CYP3A4 sur le métabolisme de la nifédipine [65], du tacrolimus [62] ou de la yohimbine [66]. Un travail récent indique que CYP3A7 présente un polymorphisme fonctionnel, présent essentiellement pendant la vie fœtale. Ce nouvel allèle est réparti différemment selon les populations et présente également une répartition tissulaire différente de l'expression constitutive de CYP3A7. Il est vraisemblable que de futurs travaux décriront les variations de cinétique de médicaments induites par cet haplotype [67].

Interactions médicamenteuses

La biodisponibilité des médicaments peut également être affectée par des interactions médicamenteuses entraînant une toxicité ou l'inefficacité thérapeutique.

Inhibition de l'activité enzymatique

Le premier mode d'interaction est l'interférence provoquée par une seconde molécule agissant sur le même site catalytique, provoquant ainsi une inhibition compétitive, avec la possibilité ou non de détruire définitivement l'activité métabolique. Dans la mesure où la majorité des médicaments est prise en charge par CYP3A4, la cinétique métabolique de cette enzyme est l'une des plus étudiées. Lors d'essais cliniques, si la molécule d'intérêt est la cible de CYP3A4, des essais d'interférence médicamenteuse sont alors réalisés. Les molécules les plus affectées sont généralement celles présentant des marges thérapeutiques étroites telles que la cyclosporine A. Largement décrites pour des molécules thérapeutiques, dont les macrolides, ces inhibitions peuvent également survenir avec des produits de consommation courante, comme les jus de fruits. Le cas du jus de pamplemousse a été mis en exergue au début des années 1990 car sa consommation régulière conduisait à une inhibition du métabolisme de certains médicaments *via* l'inhibition de CYP3A. Dans certains cas cette propriété d'inhibition des CYP peut être bénéfique : le ritonavir, un inhibiteur de CYP3A, permet de réduire les posologies des autres antirétroviraux utilisés dans le traitement du sida [19].

Induction de l'activité enzymatique

L'augmentation de l'activité enzymatique peut avoir des effets nocifs ou bénéfiques. En règle générale l'induction d'une voie métabolique va limiter l'efficacité d'un médicament [19]. Il est donc conseillé de vérifier l'éventuel potentiel inducteur de la prescription, afin de ne pas perturber un traitement déjà équilibré. L'induction de CYP3A4 par le millepertuis (dont le mécanisme précis a été décrit plus haut) a conduit à une limitation de son usage thérapeutique [68]. À l'inverse, l'induction du métabolisme du cyclophosphamide augmente la production du métabolite pharmacologiquement actif, cette particularité pouvant être exploitée dans certains protocoles thérapeutiques [69].

CYP2C9/19, CYP2B6 et CYP3A sont régulés par les facteurs de transcription du fait de la présence de séquences consensus dans les promoteurs des gènes. Ainsi, l'utilisation de molécules inductrices doit-elle être réalisée avec prudence afin de ne pas perturber les traitements en cours. Les principaux agents inducteurs sont la rifampicine, certains anticonvulsivants (carbamazépine, phénytoïne, phénobarbital), les glucocorticoïdes, le modafinil, les glitazones ainsi que certains anti-rétroviraux (efavirenz, nevirapine). (http://medicine.iupui.edu/flockhart/table.htm).

Lorsque l'activation du métabolisme conduit à une augmentation de la concentration des métabolites toxiques, dans la plupart des cas ceux-ci sont éliminés. La limitation de cette détoxication réside dans la saturation des systèmes d'élimination entraînant ainsi une augmentation des accidents thérapeutiques. L'exemple le plus caricatural est celui de l'alcool qui, en induisant CYP2E1, augmente la toxicité hépatique du paracétamol chez l'alcoolique [70].

Les cytochromes P450 en tant que biomarqueurs

Exposition à des polluants

L'activité des CYP dépend donc du génotype de l'individu mais également des interférences potentielles avec l'environnement. Il est maintenant clairement admis que des polluants environnementaux, comme la fumée de cigarette, peuvent modifier l'activité enzymatique des CYP impliqués dans les processus de détoxication des xénobiotiques. Le métabolisme de la caféine est accéléré chez les fumeurs [71]. Cette caractéristique a été utilisée dans le suivi des fumeurs souhaitant un sevrage [72]. L'étude de la vitesse de métabolisation de la caféine peut également être exploitée pour analyser la concentration plasmatique en PolyChloroBiphényls (PCB) [73]. De même, l'évaluation de l'activité de CYP1A peut être utilisée afin de déterminer l'exposition aux hydrocarbures aromatiques polycycliques et aux PCB [74]. Aux exceptions près citées ci-dessus, l'étude des activités des CYP reste néanmoins limitée à des études chez l'animal, puisque les CYP sont des enzymes tissulaires. Cela implique que chez l'homme on ne peut accéder le plus souvent qu'au dosage des métabolites.

Facteurs de susceptibilité

Dans le domaine des pathologies chroniques, l'activité des CYP est souvent considérée comme un facteur de susceptibilité de développer certaines pathologies, notamment par la production de métabolites potentiellement mutagènes. Ainsi, CYP2E1 a été associé à la sensibilité accrue aux nitrosamines et à certains cancers secondaires comme celui de la vessie [2, 75]. CYP1A est lui associé au cancer du poumon [2, 75].

Conclusion

Bien que les CYP soient des enzymes connues depuis de nombreuses années, leur implication dans le métabolisme des médicaments et leur rôle dans la physiopathologie de certaines affections justifient à eux seuls l'intérêt grandissant pour ces protéines. L'analyse de leurs rôles dans les différents processus biologiques souligne la complexité de leur action et la gamme étendue de leurs cibles moléculaires. Le développement de médicaments ayant un spectre thérapeutique plus large mais une spécificité rendue métabolique plus étroite par les CYP représentera un des challenges pour les industriels, tout en prenant en compte les interactions potentielles avec les molécules endogènes et les polluants environnementaux. De plus, la découverte récente des récepteurs nucléaires régulant l'expression de ces enzymes ouvre de nouvelles voies de recherche sur la modulation du métabolisme des xénobiotiques, et par là même, l'efficacité des traitements proposés. Il est maintenant clairement établi que ces récepteurs nucléaires établissent des interrelations entre eux et avec d'autres voies de signalisation. En conséquence, les xénobiotiques, qui sont des ligands de ces récepteurs nucléaires, peuvent moduler l'homéostasie de nombreux endobiotiques (hormones, vitamine D, cholestérol...). À moyen terme, la compréhension de ces interrelations permettra de mieux appréhender les conséquences physiopathologiques de stimuli affectant le métabolisme des médicaments et leurs éventuels effets indésirables. À plus long terme, le développement de molécules modifiant l'activité de ces récepteurs nucléaires permettra sans doute d'optimiser l'efficacité thérapeutique des médicaments.

Remerciements. Les auteurs dédient cet article au professeur Anne-Marie Batt décédée le 29 mars 2006. Les auteurs remercient vivement le Docteur Jean-René Jourdain pour la lecture critique du manuscrit et Stéphane Grison pour la réalisation des figures. Une partie des activités de recherche de K. Mouzat et J.M.A. Lobaccaro est soutenue par une subvention des fondations FRM-BNP Paribas.

Références

1. Nelson DR. Cytochrome P450 and the individuality of species. *Arch Biochem Biophys* 1999 ; 369 : 1-10.

2. Hasler JA. Pharmacogenetics of cytochromes P450. *Mol Aspects Med* 1999 ; 20 : 25-137.

3. Remmer H, Merker HJ. Drug-induced changes in the liver endoplasmic reticulum : association with drug-metabolizing enzymes. *Science* 1963 ; 142 : 1657-8.

4. Klingenberg M. Pigments of rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* 1958 ; 75 : 376-86.

5. Omura T, Sato R. A new cytochrome in liver microsomes. *J Biol Chem* 1962 ; 237 : 1375-6.

6. Porter TD, Coon MJ. Cytochrome P450. Multiplicity of isoforms, substrates, and catalytic and regulatory mechanisms. *J Biol Chem* 1991 ; 266 : 13469-72.

7. Nebert DW, Adesnik M, Coon MJ, *et al.* The P450 gene superfamily : recommended nomenclature. *DNA* 1987 ; 6 : 1-11.

8. Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, *et al.* P450 superfamily : update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 1996 ; 6 : 1-42.

9. Graham SE, Peterson JA. How similar are P450s and what can their differences teach us ? *Arch Biochem Biophys* 1999 ; 369 : 24-9.

10. Werck-Reichhart D, Feyereisen R. Cytochromes P450 : a success story. *Genome Biol* 2000 ; 1 : S3003.

11. Williams PA, Cosme J, Vinkovic DM, *et al.* Crystal structures of human cytochrome P450 3A4 bound to metyrapone and progesterone. *Science* 2004 ; 305 : 683-6.

12. Yano JK, Wester MR, Schoch GA, Griffin KJ, Stout CD, Johnson EF. The structure of human microsomal cytochrome P450 3A4 determined by X-ray crystallography to 2.05-A resolution. *J Biol Chem* 2004 ; 279 : 38091-4.

13. Lewis DF. 57 varieties : the human cytochromes P450. *Pharmacogenomics* 2004 ; 5 : 305-18.

14. Rendic S. Summary of information on human CYP enzymes : human P450 metabolism data. *Drug Metab Rev* 2002 ; 34 : 83-448.

15. Hecht SS. Biochemistry, biology, and carcinogenicity of tobacco-specific N-nitrosamines. *Chem Res Toxicol* 1998 ; 11 : 559-603.

16. Shimada T, Fujii-Kuriyama Y. Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and 1B1. *Cancer Sci* 2004 ; 95 : 1-6.

17. Nebert DW, Russell DW. Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet* 2002 ; 360 : 1155-62.

18. Ingelman-Sundberg M, Oscarson M, McLellan RA. Polymorphic human cytochrome P450 enzymes : an opportunity for individualized drug treatment. *Trends Pharmacol Sci* 1999 ; 20 : 342-9.

19. Wilkinson GR. Drug metabolism and variability among patients in drug response. *N Engl J Med* 2005 ; 352 : 2211-21.

20. Gonzalez FJ, Skoda RC, Kimura S, *et al.* Characterization of the common genetic defect in humans deficient in debrisoquine metabolism. *Nature* 1988 ; 331 : 442-6.

21. Ingelman-Sundberg M. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) : clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *Pharmacogenomics J* 2005 ; 5 : 6-13.

22. Rendic S, Di Carlo FJ. Human cytochrome P450 enzymes : a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors. *Drug Metab Rev* 1997 ; 29 : 413-580.

23. Hiroi T, Imaoka S, Funae Y. Dopamine formation from tyramine by CYP2D6. *Biochem Biophys Res Commun* 1998 ; 249 : 838-43.

24. Funae Y, Kishimoto W, Cho T, Niwa T, Hiroi T. CYP2D in the brain. *Drug Metab Pharmacokinet* 2003 ; 18 : 337-49.

25. Pelkonen O, Maenpaa J, Taavitsainen P, Rautio A, Raunio H. Inhibition and induction of human cytochrome P450 (CYP) enzymes. *Xenobiotica* 1998 ; 28 : 1203-53.

26. Guengerich FP. Cytochrome P-450 3A4 : regulation and role in drug metabolism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999 ; 39 : 1-17.

27. Goodwin B, Redinbo MR, Kliewer SA. Regulation of cyp3a gene transcription by the pregnane x receptor. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2002 ; 42 : 1-23.

28. Dresser GK, Spence JD, Bailey DG. Pharmacokinetic-pharmacodynamic consequences and clinical relevance of cytochrome P450 3A4 inhibition. *Clin Pharmacokinet* 2000 ; 38 : 41-57.

29. Handschin C, Meyer UA. Induction of drug metabolism : the role of nuclear receptors. *Pharmacol Rev* 2003 ; 55 : 649-73.

30. Fleming I. Cytochrome p450 and vascular homeostasis. *Circ Res* 2001 ; 89 : 753-62.

31. Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes : advances in eicosanoid biology. *Science* 2001 ; 294 : 1871-5.

32. Muller B. Pharmacology of thromboxane A2, prostacyclin and other eicosanoids in the cardiovascular system. *Therapie* 1991 ; 46 : 217-21.

33. Lepesheva GI, Waterman MR. CYP51--the omnipotent P450. *Mol Cell Endocrinol* 2004 ; 215 : 165-70.

34. Souidi M, Dubrac S, Parquet M, Lutton C. Hepatic and extrahepatic sterol 27-hydroxylase : roles in cholesterol and bile acid metabolism and associated diseases. *Gastroenterol Clin Biol* 2003 ; 27 : 100-11.

35. Souidi M, Dubrac S, Parquet M, *et al.* Oxysterols : metabolism, biological role and associated diseases. *Gastroenterol Clin Biol* 2004 ; 28 : 279-93.

36. Souidi M, Parquet M, Dubrac S, Lutton C. New bile acid biosynthesis pathways. *Gastroenterol Clin Biol* 2001 ; 25 : 81-92.

37. Ulrich RG. The toxicogenomics of nuclear receptor agonists. *Curr Opin Chem Biol* 2003 ; 7 : 505-10.

38. Meyer UA, Gut J. Genomics and the prediction of xenobiotic toxicity. *Toxicology* 2002 ; 181-182 : 463-6.

39. Kliewer SA, Goodwin B, Willson TM. The nuclear pregnane X receptor : a key regulator of xenobiotic metabolism. *Endocr Rev* 2002 ; 23 : 687-702.

40. Moore LB, Goodwin B, Jones SA, *et al.* St. John's wort induces hepatic drug metabolism through activation of the pregnane X receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000 ; 97 : 7500-2.

41. Sonoda J, Rosenfeld JM, Xu L, Evans RM, Xie W. A nuclear receptor-mediated xenobiotic response and its implication in drug metabolism and host protection. *Curr Drug Metab* 2003 ; 4 : 59-72.

42. Handschin C, Podvinec M, Meyer UA. *In silico* approaches, and *in vitro* and *in vivo* experiments to predict induction of drug metabolism. *Drug News Perspect* 2003 ; 16 : 423-34.

43. Maglich JM, Stoltz CM, Goodwin B, Hawkins-Brown D, Moore JT, Kliewer SA. Nuclear pregnane x receptor and constitutive androstane receptor regulate overlapping but distinct sets of genes involved in xenobiotic detoxification. *Mol Pharmacol* 2002 ; 62 : 638-46.

44. Forman BM, Tzameli I, Choi HS, *et al.* Androstane metabolites bind to and deactivate the nuclear receptor CAR-beta. *Nature* 1998 ; 395 : 612-5.

45. Dufort I, Soucy P, Lacoste L, Luu-The V. Comparative biosynthetic pathway of androstenol and androgens. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2001 ; 77 : 223-7.

46. Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors : nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* 1999 ; 20 : 649-88.

47. Bosgra S, Mennes W, Seinen W. Proceedings in uncovering the mechanism behind peroxisome proliferator-induced hepatocarcinogenesis. *Toxicology* 2005 ; 206 : 309-23.

48. Barbier O, Duran-Sandoval D, Pineda-Torra I, Kosykh V, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha induces hepatic expression of the human bile acid glucuronidating UDP-glucuronosyltransferase 2B4 enzyme. *J Biol Chem* 2003 ; 278 : 32852-60.

49. Mimura J, Fujii-Kuriyama Y. Functional role of AhR in the expression of toxic effects of TCDD. *Biochim Biophys Acta* 2003 ; 1619 : 263-8.

50. Savouret JF, Antenos M, Quesne M, Xu J, Milgrom E, Casper RF. 7-ketocholesterol is an endogenous modulator for the arylhydrocarbon receptor. *J Biol Chem* 2001 ; 276 : 3054-9.

51. White PC. Aldosterone synthase deficiency and related disorders. *Mol Cell Endocrinol* 2004 ; 217 : 81-7.

52. Foltynie T, Sawcer S, Brayne C, Barker RA. The genetic basis of Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002 ; 73 : 363-70.

53. Tyndale RF. Genetics of alcohol and tobacco use in humans. *Ann Med* 2003 ; 35 : 94-121.

54. Hubacek JA, Pitha J, Skodova Z, *et al.* Polymorphisms in CYP-7A1, not APOE, influence the change in plasma lipids in response to population dietary change in an 8 year follow-up ; results from the Czech Monica study. *Clin Biochem* 2003 ; 36 : 263-7.

55. Sarfarazi M, Stoilov I. Molecular genetics of primary congenital glaucoma. *Eye* 2000 ; 14 (Pt 3B) : 422-8.

56. Javitt NB. 25R,26-hydroxycholesterol revisited : synthesis, metabolism, and biologic roles. *J Lipid Res* 2002 ; 43 : 665-70.

57. Malaiyandi V, Sellers EM, Tyndale RF. Implications of CYP2A6 genetic variation for smoking behaviors and nicotine dependence. *Clin Pharmacol Ther* 2005 ; 77 : 145-58.

58. Ingelman-Sundberg M. Pharmacogenetics of cytochrome P450 and its applications in drug therapy : the past, present and future. *Trends Pharmacol Sci* 2004 ; 25 : 193-200.

59. He P, Court MH, Greenblatt DJ, Von Moltke LL. Genotype-phenotype associations of cytochrome P450 3A4 and 3A5 polymorphism with midazolam clearance *in vivo*. *Clin Pharmacol Ther* 2005 ; 77 : 373-87.

60. Zheng HX, Zeevi A, McCurry K, *et al.* The impact of pharmacogenomic factors on acute persistent rejection in adult lung transplant patients. *Transpl Immunol* 2005 ; 14 : 37-42.

61. Anglicheau D, Le Corre D, Lechaton S, *et al.* Consequences of genetic polymorphisms for sirolimus requirements after renal transplant in patients on primary sirolimus therapy. *Am J Transplant* 2005 ; 5 : 595-603.

62. Hesselink DA, van Schaik RH, van der Heiden IP, *et al.* Genetic polymorphisms of the CYP3A4, CYP3A5, and MDR-1 genes and pharmacokinetics of the calcineurin inhibitors cyclosporine and tacrolimus. *Clin Pharmacol Ther* 2003 ; 74 : 245-54.

63. Dai Y, Iwanaga K, Lin YS, *et al.* *In vitro* metabolism of cyclosporine A by human kidney CYP3A5. *Biochem Pharmacol* 2004 ; 68 : 1889-902.

64. Kivisto KT, Niemi M, Schaeffeler E, *et al.* Lipid-lowering response to statins is affected by CYP3A5 polymorphism. *Pharmacogenetics* 2004 ; 14 : 523-5.

65. Lee SJ, Bell DA, Coulter SJ, Ghanayem B, Goldstein JA, Recombinant CYP. 3A4*17 is defective in metabolizing the hypertensive drug nifedipine, and the CYP3A4*17 allele may occur on the same chromosome as CYP3A5*3, representing a new putative defective CYP3A haplotype. *J Pharmacol Exp Ther* 2005 ; 313 : 302-9.

66. Le Corre P, Parmer RJ, Kailasam MT, *et al.* Human sympathetic activation by alpha2-adrenergic blockade with yohimbine : bimodal, epistatic influence of cytochrome P450-mediated drug metabolism. *Clin Pharmacol Ther* 2004 ; 76 : 139-53.

67. Rodriguez-Antona C, Axelson M, Otter C, Rane A, Ingelman-Sundberg M. A novel polymorphic cytochrome P450 formed by splicing of CYP3A7 and the pseudogene CYP3AP1. *J Biol Chem* 2005 ; 280 : 28324-31.

68. Mannel M. Drug interactions with St John's wort : mechanisms and clinical implications. *Drug Saf* 2004 ; 27 : 773-97.

69. Rooney PH, Telfer C, McFadyen MC, Melvin WT, Murray GI. The role of cytochrome P450 in cytotoxic bioactivation : future therapeutic directions. *Curr Cancer Drug Targets* 2004 ; 4 : 257-65.

70. Park BK, Kitteringham NR, Maggs JL, Pirmohamed M, Williams DP. The role of metabolic activation in drug-induced hepatotoxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005 ; 45 : 177-202.

71. Zevin S, Benowitz NL. Drug interactions with tobacco smoking. An update. *Clin Pharmacokinet* 1999 ; 36 : 425-38.

72. Faber MS, Fuhr U. Time response of cytochrome P450 1A2 activity on cessation of heavy smoking. *Clin Pharmacol Ther* 2004 ; 76 : 178-84.

73. Fitzgerald EF, Hwang SA, Lambert G, Gomez M, Tarbell A. PCB exposure and *in vivo* CYP1A2 activity among Native Americans. *Environ Health Perspect* 2005 ; 113 : 272-7.

74. Fent K. Ecotoxicological problems associated with contaminated sites. *Toxicol Lett* 2003 ; 140-141 : 353-65.

75. Guengerich FP. Cytochrome P450 : what have we learned and what are the future issues ? *Drug Metab Rev* 2004 ; 36 : 159-97.

Articles originaux

Article 3 – Chronic contamination with 137Cesium in rat : effect on liver cholesterol metabolism.

Article publié dans « *International Journal of Toxicology* ».

Souidi M, **Tissandié E**, Grandcolas L, Grison S, Paquet F, Voisin P, Aigueperse J, Gourmelon P and Guéguen Y.

International Journal of Toxicology, 25:493–497, 2006
Copyright © American College of Toxicology
ISSN: 1091-5818 print / 1092-874X online
DOI: 10.1080/10915810600961317

Chronic Contamination with ^{137}Cesium in Rat: Effect on Liver Cholesterol Metabolism

M. Souidi, E. Tissandie, L. Grandcolas, S. Grison, F. Paquet, P. Voisin, J. Aigueperse, P. Gourmelon, and Y. Guéguen
Institute for Radiological Protection and Nuclear Safety (IRSN), Radiological Protection and Human Health Division (DRPH), Radiobiology and Epidemiology Department (SRBE), Laboratory of Experimental Toxicology, Fontenay-aux-Roses Cedex, France

After the Chernobyl nuclear accident, epidemiological studies on human populations living in ^{137}Cs-contaminated areas revealed the increase frequencies of thyroid cancer and evoked the apparition of cardiovascular diseases, hormonal effect, liver alteration, and lipid disorder. Actually, it raises a problem of public safety for the populations living on these territories that are exposed to low levels of ^{137}Cs during a long period through food. Then it is necessary to study potential effect of this chronic contamination. To mimic this situation, the authors investigate the potential biological effects of chronic exposure to ^{137}Cs at a postaccidental dose (150 Bq/rat/day) on hepatic metabolism of cholesterol in rat. Plasma lipid level, gene expression and activity were analyzed. It was observed that in ^{137}Cs-exposed rats, gene expression of low-density lipoprotein receptor (LDLr), apolipoprotein B (apoB), and liver X receptor α (LXRα) are increased (95%, $p < .05$; 34%, $p < .05$; 20%, $p < 0.05$, respectively), whereas transporter adenosine triphosphate–binding cassette transporter G5 (ABCG5) is decreased (42%, $p < .05$). In addition, cytochrome P450 27A1 (CYP27A1) activity is increased (34%, $p < .05$) in contaminated rat liver. In conclusion, the results suggest that ^{137}Cs contamination at low-level induces molecular modifications of the liver cholesterol metabolism without leading to a dysregulation of its homeostasis. These results suggest that chronic long term exposure at low-level of ^{137}Cs may evolve to lipid disorder.

Keywords Cesium, Chernobyl, Cholesterol, Liver, Rat

After the Chernobyl nuclear reactor accident (April 26, 1986), some studies have shown an increased frequency of thyroid diseases (Likhtarov et al. 2005) for people living on the contaminated territories. Several other human pathologies such as cardiovascular diseases (Bandazhevskaya et al. 2004) and alteration of the central nervous system (Ivanov et al. 2000), digestive tract (Dehtiar'ova and Kozlova 2001), liver (Shkala 1998), and gonad (Cheburakov, Cheburakov, and Belozerov 2004) have been evoked on these human populations. In all these works, the radionuclide involved in long term is mainly cesium 137 (^{137}Cs).[1] Studies of ^{137}Cs-exposed animals showed alterations of the hematopoietic system (Norris, Poole, and Rehfeld 1966), appearance of thyroid cancer, or bone cancer (Fritz 1972). The Chernobyl accident is a unique situation that raises a problem of public safety for the populations living in the contaminated areas that are exposed to low levels of ^{137}Cs during a long period. The knowledge on ^{137}Cs effect concern only cancer effect as all ionizing radiation because of the high dose used. Actually, chronic contamination with low level of ^{137}Cs are poorly documented and to our knowledge, animal studies have not been investigated.

In our institute (IRSN), Envirhom program specifically analyses biological effect of radionuclides such as uranium and ^{137}Cs. This program started with the analysis of acute and chronic effect of uranium contamination on central nervous system (Lestaevel et al. 2005; Bussy et al. 2006), physiological systems such as hepatic and renal metabolism of xenobiotics (Souidi et al. 2005), cholesterol (Gueguen et al. 2006), and vitamin D (Tissandie et al. 2006b). To proceed with this program and for the 20th anniversary of Chernobyl accident, we are interested in ^{137}Cs chronic contamination effect on vitamin D and cholesterol metabolism. Recently, vitamin D metabolism have shown

Received 26 April 2006; accepted 14 July 2006.
The authors thank T. Loiseau and C. Baudelin for their assistance during animal's exposure and experimentation. This study was part of the ENVIRHOM research program supported by the Institute for Radioprotection and Nuclear Safety (IRSN).
Address correspondence to M. Souidi, IRSN/DRPH/SRBE, B.P. n°17, F-92262 Fontenay-aux-Roses Cedex, France. E-mail: maamar.souidi@irsn.fr

[1]Abbreviations: ^{137}Cs: cesium; LDL: low-density lipoprotein; HDL: high-density lipoprotein; ALT: alanine aminotransferase; AST: aspartate aminotransferase; GGT: γ-glutamyltranspeptidase; AP: alkaline phosphatase; CYP7A1: cholesterol 7α-hydroxylase; CYP27A1: sterol 27-hydroxylase. HMGCoA (R, S): 3β-hydroxy-3β-methylglutaryl coenzyme A; LDLr: low-density lipoprotein receptor; SR-BI: scavenger receptor class B type I; ABC (A1, G5): adenosine triphosphate–binding cassette transporter; Apo (AI, B, E): apolipoprotein. FXR: farnesoid X receptor; LXRα: liver X receptor α; PPARα: peroxisome proliferator-activated receptor α; RXR: retinoid X receptor.

to be affected after 3 months of contamination by ^{137}Cs in the rat (Tissandie et al. 2006a). In the same way, and to continue the investigation in this field, we studied in this work the liver cholesterol metabolism. Indeed, altered plasma cholesterol and triglycerides levels have been observed in people exposed to radiation during the Chernobyl accident (Chaialo et al. 1991). It is actually accepted that liver cholesterol metabolism is primordial for its plasmatic homeostasis (Ory 2004) and its disruption causes liver and cardiovascular diseases such as atherosclerosis and dyslipidemia (Libby, Aikawa, and Schonbeck 2000). Thus, some parameters involved in liver cholesterol metabolism such as enzymes (CYP7A1, CYP27A1, HMGCoAR, and HMG-CoAS), lipoprotein receptors (LDLr and SR-BI), sterol transporters (ABCA1 and ABCG5), apolipoproteins (ApoA1, ApoB, and ApoE), and nuclear receptors involved in liver cholesterol metabolism regulation (FXR, LXRα, PPARα, and RXR) were analyzed.

The objectives of this work were thus to investigate the potential biological effects of chronic exposure to ^{137}Cs at a postaccidental dose (150 Bq/rat/day) (Handl et al. 2003) on hepatic metabolism of cholesterol in rat. For the first time, we studied, on an animal model the plasma and liver cholesterol parameters, hepatic gene expression of lipoprotein receptors, sterol transporters, apolipoproteins, enzymes, and nuclear receptors.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Sprague-Dawley male rats (Charles River, France), weighing 250 g each, were divided into two groups of 10 rats each: a control group and an experimental group. All experimental procedures were approved by the Animal Care Committee of the Institute of Radioprotection and Nuclear Safety and complied with French regulations for animal experimentation (Ministry of Agriculture Act number 87-848, October 19, 1987, modified May 29, 2001).

Contamination

The rats in the experimental group were exposed to ^{137}Cs in their drinking water for 3 months, at a dose of 6500 Bq/L (150 Bq/rat/day) (CERCA, Pierrelatte, France).

Clinical and Biochemical Parameters Assays

We used an automated Konelab 20 to measure plasma ALT, AST, GGT, AP, bilirubin, albumine, total protein, total cholesterol, LDL-C, HDL-C, phospholipids, and triglycerides (biological chemistry reagents, Thermo Electron Corporation, France) in the control and ^{137}Cs-exposed rats.

Cholesterol concentration in liver samples were measured using technique previously described (Boehler et al. 1999).

Preparation of Liver Microsomes and Mitochondria

Liver microsomes and mitochondria were prepared from fresh samples (about 1 g) according to (Souidi et al. 1999).

Determination of CYP7A1 and CYP27A1 Enzyme Activities in the Liver

The radio isotopic assays for microsomal CYP7A1 and mitochondrial CYP27A1 (Souidi et al. 1999) activities in the liver have been described in detail previously.

Real-Time Quantitative Reverse Transcriptase–Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Real-time PCR was used to analyze the mRNA expression of the CYP7A1, CYP27A1, HMGCoAR, HMGCoAS, LDLr, SR-BI, ABCA1, ABCG5, ApoA1, ApoB, ApoE, RXR, FXR, LXRα, and PPARα.

Total RNA was prepared with the RNeasy total RNA isolation Kit (Qiagen, France) according to the manufacturer's instructions. The cDNA was produced from 1 μg of total RNA by reverse transcription with BD Sprint PowerScipt PrePrimed 96 Plate (BD Biosciences Clontech, France). PCR amplification used Syber PCR master mix (PE Applied). Optimized PCR used the Abi Prism 7000 Sequence detection system (Applied Biosystems). Samples values were normalized to hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) values and fold-changes calculated to the control group.

Statistical Analysis

Results are reported as means $\pm$ *SE*. Statistical analyses were performed with Student's *t* test. Differences were considered significant when $p < .05$.

RESULTS

Table 1 shows the physical and plasma biochemical data for rats contaminated with ^{137}Cs for 3 months (150 Bq/rat/day) and control rats. The experimental contamination of this study did not affect food intake, weight gain, or the animals' general health status. Concentrations of biochemical markers associated with liver function (ALT, AST) were unaffected. Plasma concentration of cholesterol, phospholipids, and triglycerides were similar between the control and ^{137}Cs-exposed animals. In the liver, cholesterol ester and free cholesterol were unaffected in ^{137}Cs-exposed animals compared to control.

The effects of this 3-month contamination on the liver gene expression of enzymes (CYP7A1, CYP27A1, HMG-CoAR, HMGCoAS), nuclear receptors (FXR, LXRα, PPARα, RXR), lipoprotein receptors (LDLr, SR-BI), sterol transporters (ABCA1, ABCG5), and apolipoproteins (ApoA1, ApoB, ApoE) in rats are reported in Figure 1. The mRNA level of the reference gene (HPRT) was unchanged in the liver after 3 months of contamination with ^{137}Cs. LDLr mRNA level increased in

TABLE 1
Physical and biochemical parameters (plasma, liver) in control group ($n = 10$) and ^{137}Cs-exposed group ($n = 10$)

Parameters	Control	^{137}Cs-exposed
Final body weight (g)	575 ± 14	575 ± 13
Liver (g)	21.1 ± 0.6	20.8 ± 0.7
Plasma		
Cholesterol (mmol/L)	2.21 ± 0.14	2.17 ± 0.06
LDL-C (mmol/L)	0.34 ± 0.04	0.31 ± 0.01
HDL-C (mmol/L)	1.40 ± 0.09	1.48 ± 0.04
Phospholipids (g/L)	1.85 ± 0.12	1.66 ± 0.13
Triglycerides (mmol/L)	1.60 ± 0.10	1.56 ± 0.11
ALT (U/L)	35.57 ± 2.77	34.24 ± 3.25
AST (U/L)	71.43 ± 4.72	68.48 ± 5.27
Bilirubin (μmol/L)	3.32 ± 0.19	3.60 ± 0.29
GGT (U/L)	4.38 ± 0.36	4.02 ± 0.18
AP (U/L)	155.82 ± 13.04	156.07 ± 12.3
Albumin (g/L)	30.80 ± 0.31	31.42 ± 0.38
Total protein (g/L)	64.96 ± 0.92	65.04 ± 0.95
Liver		
Cholesterol ester (mg/g)	1.47 ± 0.15	1.19 ± 0.12
Free cholesterol (mg/g)	5.48 ± 0.12	5.36 ± 0.14

Note. The values are given as mean ± *SE*.

^{137}Cs exposed rats (95%, $p < .05$). Similarly, the ApoB mRNA level increased (34%, $p < .05$) but ABCG5 mRNA expression decreased (42%, $p < .05$). We evaluated the effects of ^{137}Cs contamination on the gene expression of the nuclear receptors LXRα, PPARα, and RXR. As Figure 1 shows, LXRα mRNA level increased in the liver (20%, $p < .05$) compared with controls. ^{137}Cs contamination did not change gene expression of PPARα and RXR.

Hepatic CYP7A1 and CYP27A1 enzymatic activities were evaluated in the control and contaminated rats (Figure 2). The CYP27A1 activity increased by 34% ($p < .05$) compared to controls. CYP7A1 activity was not modified by ^{137}Cs contamination.

DISCUSSION

After the Chernobyl nuclear accident and scattering of radionuclides like ^{137}Cs in the environment, many people were exposed until today due to the physical long half-life of ^{137}Cs (30 years). Epidemiological studies on human populations living on ^{137}Cs-contaminated areas revealed the increased frequency of several diseases particularly for highly exposed people: thyroid cancer (Cherenko et al. 2004) cardiovascular symptom in children (Bandazhevskaya et al. 2004), and hormonal effect (Goncharov et al. 1998). The rare studies done on animals essentially showed effect of ^{137}Cs on haematopoietic system (Norris, Poole, and Rehfeld 1966) and some cancers (Nikula et al. 1996). Indeed, it raises a problem of public safety for the populations living on these territories that are exposed to low levels of ^{137}Cs during a long period through food. Then it is necessary to study potential effect of this chronic contamination. To examine the effect of ^{137}Cs chronic contamination with environmental concentration (contaminated territories), recently, in our laboratory, in vivo effect of radionuclides were studied on various physiological systems. In this, central nervous modifications at electrophysiological level (Lestaevel et al. 2006) and vitamin D metabolism disturbance were observed after chronic exposure to ^{137}Cs (Tissandie et al. 2006b). In the same way, the effect of ^{137}Cs chronic contamination on liver cholesterol metabolism was studied. In some studies altered plasma cholesterol and triglycerides levels have been observed in people exposed to radiation during the Chernobyl accident (Chaialo et al. 1991). Theses results suggested that liver cholesterol metabolism was a target of ^{137}Cs. In order to mimic Chernobyl environmental exposure, we have studied ^{137}Cs effect on rat contaminated through drinking water (6500 Bq/L) at a dose corresponding to the maximum concentration measured in food chain in Belarus immediately after the Chernobyl accident (Handl et al. 2003). The rats were exposed to low level of ^{137}Cs by chronic ingestion for 3 months that didn't affect their food intake, weight, or general health status. Blood tests showed no effect on hepatic function markers such as ALT and AST, confirming that the dose used in this study was not hepatotoxic. Nevertheless, toxicity experience using ^{137}Cs single administration showed elevation of plasma transaminases level

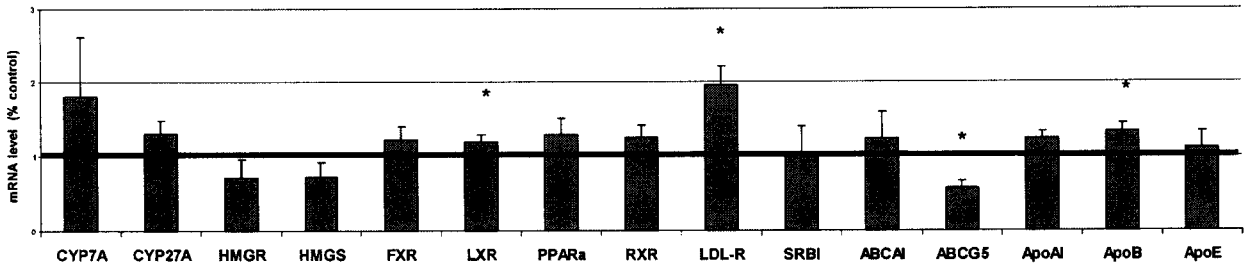


FIGURE 1
mRNA levels of cesium 137 (^{137}Cs)-exposed rats for 3 months. Gene expression of lipoprotein receptors, sterol transporters, apolipoproteins, enzymes, and nuclear receptors were measured by real-time quantitative RT-PCR in the liver of control or ^{137}Cs-exposed rats. Control value were normalized to 1 and symbolized by the horizontal bold line. The results were expressed as a ratio to mRNA levels of the housekeeping gene hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT). Data are means ± *SEM* ($n = 8$); $^*p < .05$ significantly different from control value.

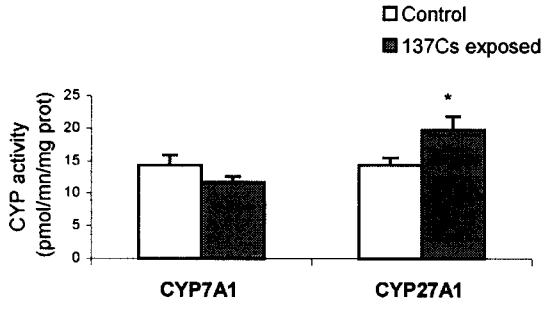


FIGURE 2
Enzymatic activities of CYP7A1 and CYP27A1 in liver of control or cesium 137 (^{137}Cs)-exposed rats during 3 months. Data are the means ± *SEM* ($n = 6$); $^{*}p < .05$ significantly different from control value.

(Stojadinovic and Jovanovic 1966), suggesting that the liver could be a biological target of ^{137}Cs. Highly exposed people to ionizing radiation during Chernobyl accident (liquidators) have also altered liver histology (Liubchenko et al. 1994). Similar impairments were observed in rats living within the accident zone (Pinchuk et al. 1991). In our conditions of low-dose contamination, we didn't observed macroscopic alteration of the liver.

In addition, people exposed to radiation during the Chernobyl accident have altered plasma cholesterol and triglycerides, levels that could lead to cardiovascular diseases (Chaialo et al. 1991). In our study, the plasma level of cholesterol, triglycerides, and phospholipids were not affected after a 3-month contamination at a dose of 150 Bq/rat/day. These discrepancies are probably due to the dose of ^{137}Cs used and the duration of the contamination in our experimental condition. On the other hand, we have observed molecular modifications in the liver of ^{137}Cs-exposed rats. Indeed, we observed that in ^{137}Cs-exposed rats, gene expression of LDLr responsible of hepatic capture of circulating cholesterol was increased. In parallel, we observed an increased mRNA level of apoB, a LDLr ligand. The up-regulation of LDLr and apoB in the liver suggests that hepatic capture of cholesterol was changed. Moreover, the transporter ABCG5, responsible for sterol elimination and more precisely for elimination of cholesterol in the bile, was decreased in contaminated rat. In contrast, CYP27A1 activity, a key enzyme of cholesterol transformation in bile acid, was increased. Some studies observed that high ionizing radiations lead to modifications of cholesterol metabolism (Feurgard et al. 1999; Scanff et al. 2004). Surprisingly, we observed molecular modification of gene involved in cholesterol capture, synthesis, and degradation with environmental low dose of ^{137}Cs. This dysregulation of cholesterol metabolism was associated with a modification LXRα gene expression, a crucial nuclear receptor for the control of lipid homeostasis (Ulven et al. 2005), without leading to its alteration. This could be explained by a chronic contamination too short. In conclusion, these results indicate that the chronic exposure with low level of ^{137}Cs lead to subtle molecular modifications without indication of toxicity. This study suggests that long-term chronic contamination could evolve to lipid disorder.

REFERENCES

Bandazhevskaya, G. S., V. B. Nesterenko, V. I. Babenko, T. V. Yerkovich, and Y. I. Bandazhevsky. 2004. Relationship between caesium (137Cs) load, cardiovascular symptoms, and source of food in 'Chernobyl' children—preliminary observations after intake of oral apple pectin. *Swiss. Med. Wkly.* 134:725–729.

Boehler, N., M. Riottot, J. Ferezou, M. Souidi, F. Milliat, C. Serougne, J. L. Smith, and C. Lutton. 1999. Antilithiasic effect of beta-cyclodextrin in LPN hamster: Comparison with cholestyramine. *J. Lipid. Res.* 40:726–734.

Bussy, C., P. Lestaevel, B. Dhieux, C. Amourette, F. Paquet, P. Gourmelon, and P. Houpert. 2006. Chronic ingestion of uranyl nitrate perturbs acetylcholinesterase activity and monoamine metabolism in male rat brain. *Neurotoxicology* 27:245–252.

Chaialo, P. P., G. M. Chobot'ko, I. V. Shimelis, and B. P. Prevarskii. 1991. [Content of blood lipids and characteristics of dyslipoproteinemias in people exposed to radiation during the accident at the Chernobyl nuclear power station]. *Ukr. Biokhim. Zh.* 63:93–96.

Cheburakov, BIu., SIu. Cheburakov, and NIu. Belozerov. 2004. [Morphological changes in testicular tissue in clean-up personnel after the Chernobyl nuclear reactor accident]. *Arkh. Patol.* 66:19–21.

Cherenko, S. M., O. S. Larin, M. B. Gorobeyko, and R. M. Sichynava. 2004. Clinical analysis of thyroid cancer in adult patients exposed to ionizing radiation due to the Chernobyl nuclear accident: 5-Year comparative investigations based on the results of surgical treatment. *World J. Surg.* 28:1071–1074.

Dehtiar'ova, L. V., and T. H. Kozlova. 2001. [Morphofunctional characteristics of secretion-producing structures of the gastric and duodenal mucosa in liquidators of aftermaths of the Chernobyl accident with peptic ulcer of the duodenum]. *Lik. Sprava.* (1):19–23.

Feurgard, C., N. Boehler, J. Ferezou, C. Serougne, J. Aigueperse, P. Gourmelon, C. Lutton, and D. Mathe. 1999. Ionizing radiation alters hepatic cholesterol metabolism and plasma lipoproteins in Syrian hamster. *Int. J. Radiat. Biol.* 75:757–766.

Fritz, T. E. 1972. Cesium 137 late effects of single intravenous injections in beagles. In *ANL 7970, Argone National Laboratory Annual Report* 206–208.

Goncharov, N. P., G. V. Katsiya, G. S. Kolesnikova, G. A. Dobracheva, T. N. Todua, V. V. Vax, A. Giwercman, and G. M. Waites. 1998. Endocrine and reproductive health status of men who had experienced short-term radiation exposure at Chernobyl. *Int. J. Androl.* 21:271–276.

Gueguen, Y., M. Souidi, C. Baudelin, N. Dudoignon, S. Grison, I. Dublineau, C. Marquette, P. Voisin, P. Gourmelon, and J. Aigueperse. 2006. Short-term hepatic effects of depleted uranium on xenobiotic and bile acid metabolizing cytochrome P450 enzymes in the rat. *Arch. Toxicol.* 80(4):187–195.

Handl, J., D. Beltz, W. Botsch, S. Harb, D. Jakob, R. Michel, and L. D. Romantschuk. 2003. Evaluation of radioactive exposure from 137Cs in contaminated areas of Northern Ukraine. *Health Phys.* 84:502–517.

Ivanov, V. K., M. A. Maksioutov, SYu Chekin, Z. G. Kruglova, A. V. Petrov, and A. F. Tsyb. 2000. Radiation-epidemiological analysis of incidence of noncancer diseases among the Chernobyl liquidators. *Health Phys.* 78:495–501.

Lestaevel, P., B. Dhieux, E. Tourlonias, P. Houpert, F. Paquet, P. Voisin, J. Aigueperse, and P. Gourmelon. 2006. Evaluation of the effect of chronic exposure to 137Cs on sleep-wake cycle in rats. *Toxicology.* 226(2–3):118–125.

Lestaevel, P., P. Houpert, C. Bussy, B. Dhieux, P. Gourmelon, and F. Paquet. 2005. The brain is a target organ after acute exposure to depleted uranium. *Toxicology* 212:219–226.

Libby, P., M. Aikawa, and U. Schonbeck. 2000. Cholesterol and atherosclerosis. *Biochim. Biophys. Acta* 1529:299–309.

Likhtarov, I., L. Kovgan, S. Vavilov, M. Chepurny, A. Bouville, N. Luckyanov, P. Jacob, P. Voilleque, and G. Voigt. 2005. Post-Chornobyl thyroid cancers in Ukraine. Report 1: Estimation of thyroid doses. *Radiat. Res.* 163:125–136.

Liubchenko, P. N., L. I. Kovaleva, A. P. Nikolaeva, E. A. Bendikov, E. B. Dubinina, and V. A. Ol'shanskii. 1994. [Intrahepatic circulation in participants of clean-up after the Chernobyl Atomic Energy Plant accident]. *Med. Tr. Prom. Ekol.* (2):15–17.

Nikula, K. J., B. A. Muggenburg, W. C. Griffith, W. W. Carlton, T. E. Fritz, and B. B. Boecker. 1996. Biological effects of 137CsCl injected in beagle dogs of different ages. *Radiat. Res.* 146:536–547.

Norris, W. P., C. M. Poole, and C. E. Rehfeld. 1966. Cesium 137—Current status and dosimetry of survivors. In *Toxicity and Dosimetry of Radionuclides, ANL 7278*, 98–101.

Ory, D. S. 2004. Nuclear receptor signaling in the control of cholesterol homeostasis: Have the orphans found a home? *Circ. Res.* 95:660–670.

Pinchuk, V. G., V. V. Nikitchenko, BIa Gol'dshmid, L. I. Andrushchak, and I. Serkiz 1991. [The biological effects in animals related to the accident at the Chernobyl Atomic Electric Power Station. 4. The morphological and ultrastructural changes in the liver of rats]. *Radiobiologiia* 31:648–653.

Scanff, P., M. Souidi, S. Grison, N. M. Griffiths, and P. Gourmelon. 2004. Alteration of the enterohepatic recirculation of bile acids in rats after exposure to ionizing radiation. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 82:114–124.

Shkala, L. V. 1998. [Metabolic disorders in digestive and hepatobiliary pathology in those who worked in the cleanup of the aftermath of the accident at the Chernobyl Atomic Electric Power Station]. *Lik. Sprava.* (7):42–45.

Souidi, M., Y. Gueguen, C. Linard, N. Dudoignon, S. Grison, C. Baudelin, C. Marquette, P. Gourmelon, J. Aigueperse, and I. Dublineau. 2005. In vivo effects of chronic contamination with depleted uranium on CYP3A and associated nuclear receptors PXR and CAR in the rat. *Toxicology* 214:113–122.

Souidi, M., M. Parquet, J. Ferezou, and C. Lutton. 1999. Modulation of cholesterol 7alpha-hydroxylase and sterol 27-hydroxylase activities by steroids and physiological conditions in hamster. *Life Sci.* 64:1585–1593.

Stojadinovic, S., and M. Jovanovic. 1966. Activity of transaminases in the rat serum after internal contamination with 137Cs and 90Sr. *Strahlentherapie* 131:633–636.

Tissandie, E., Y. Gueguen, J. M. Lobaccaro, J. Aigueperse, P. Gourmelon, F. Paquet, and M. Souidi. 2006a. Chronic contamination with (137)cesium affects vitamin D(3) metabolism in rats. *Toxicology*. 80(8):173–480.

Tissandie, E., Y. Gueguen, J. M. Lobaccaro, F. Paquet, J. Aigueperse, and M. Souidi. 2006b. Effects of depleted uranium after short-term exposure on vitamin D metabolism in rat. *Arch. Toxicol.* In Press.

Ulven, S. M., K. T. Dalen, J. A. Gustafsson, and H. I. Nebb. 2005. LXR is crucial in lipid metabolism. *Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty Acids.* 73:59–63.

Article 4 – Effect of acetaminophen administration on uranium chronically exposed rats.

Article publié dans « *Toxicology* ».

Guéguen Y, Grandcolas L, Baudelin C, Grison S, **Tissandié E**, Jourdain JR, Paquet F, Voisin P, Aigueperse J, Gourmelon P and Souidi M.

Available online at www.sciencedirect.com
ScienceDirect
Toxicology 229 (2007) 62–72
TOXICOLOGY
www.elsevier.com/locate/toxicol

Effect of acetaminophen administration to rats chronically exposed to depleted uranium

Y. Guéguen [a,*], L. Grandcolas [a], C. Baudelin [a], S. Grison [a], E. Tissandié [a], J.R. Jourdain [b], F. Paquet [a], P. Voisin [a], J. Aigueperse [a], P. Gourmelon [a], M. Souidi [a]

[a] *Institute for Radiological Protection and Nuclear Safety, Radiological Protection and Human Health Division, Radiobiology and Epidemiology Department, Laboratory of Experimental Toxicology, BP No. 17, F-92262 Fontenay-aux-Roses Cedex, France*
[b] *Institute for Radiological Protection and Nuclear Safety, Radiological Protection and Human Health Division, Internal Dosimetry Department, BP No. 17, F-92262 Fontenay-aux-Roses Cedex, France*

Received 16 August 2006; received in revised form 3 October 2006; accepted 5 October 2006
Available online 17 October 2006

Abstract

The extensive use of depleted uranium (DU) in both civilian and military applications results in the increase of the number of human beings exposed to this compound. We previously found that DU chronic exposure induces the expression of CYP enzymes involved in the metabolism of xenobiotics (drugs). In order to evaluate the consequences of these changes on the metabolism of a drug, rats chronically exposed to DU (40 mg/l) were treated by acetaminophen (APAP, 400 mg/kg) at the end of the 9-month contamination. Acetaminophen is considered as a safe drug within the therapeutic range but in the case of overdose or in sensitive animals, hepatotoxicity and nephrotoxicity could occur.

In the present work, plasma concentration of APAP was higher in the DU group compared to the non-contaminated group. In addition, administration of APAP to the DU-exposed rats increased plasma ALT ($p < 0.01$) and AST ($p < 0.05$) more rapidly than in the control group. Nevertheless, no histological alteration of the liver was observed but renal injury characterized by incomplete proximal tubular cell necrosis was higher for the DU-exposed rats. Moreover, in the kidney, CYP2E1 gene expression, an important CYP responsible for APAP bioactivation and toxicity, is increased ($p < 0.01$) in the DU-exposed group compared to the control group. In the liver, CYP's activities were decreased between control and DU-exposed rats. These results could explain the worse elimination of APAP in the plasma and confirm our hypothesis of a modification of the drug metabolism following a DU chronic contamination.
© 2006 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Depleted uranium; Cytochromes P450; Acetaminophen; Chronic contamination; Rat

Abbreviations: ABC, ATP binding cassette; CYP, cytochrome P450; ALT, alanine amino-transferase; APAP, acetaminophen; AST, aspartate amino-transferase; DU, depleted uranium; GST, glutathione-*S*-transferase; HPRT, hypoxanthine–guanine phosphoribosyltransferase; MDR, multidrug resistance protein; MRP, multidrug resistance associated protein; UGT, UDP glucuronsyltransferase; SULT, sulfotransferase

* Corresponding author at: Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, Direction de la RadioProtection de l'Homme, Service de Radiobiologie et d'Epidémiologie, Laboratoire de Radiotoxicologie Expérimentale, IRSN, BP No. 17, F 92262 Fontenay-aux-Roses Cedex, France. Tel.: +33 1 58 35 99 78; fax: +33 1 58 35 84 67.
E-mail address: yann.gueguen@irsn.fr (Y. Guéguen).

0300-483X/$ – see front matter © 2006 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.tox.2006.10.006

1. Introduction

Uranium is a toxic heavy metal present in the environment as a result of natural deposits and releases by human applications (mill tailings, nuclear industry and military army). The release of uranium into the environment presents a threat to human health in many parts of the world. Depleted uranium (DU), a by-product of the enrichment process of natural uranium, is only slightly radioactive and its toxicity is essentially chemical (Priest, 2001; Murray et al., 2002). Experimental animal studies as well as studies of occupationally exposed persons have shown that the major health effect of uranium is a consequence of its chemical toxicity, rather than a radiation hazard (Wrenn et al., 1985; Leggett, 1989; Taylor and Taylor, 1997). Uptake of uranium through drinking water is one of the major ways of incorporation of natural uranium, and then humans are more likely exposed chronically to low doses of uranium (Zamora et al., 1998).

In the last few years, many publications have described the effect of chronic exposure to DU through drinking water on the central nervous system (Lestaevel et al., 2005; Bussy et al., 2006), on reproduction and development (Domingo, 2001; Linares et al., 2005) and behavior (Belles et al., 2005) in experimental animals. These biological observations complete the toxicological studies which classically describe its nephrotoxicity after an acute exposure to high concentrations of uranium (Leggett, 1989; Craft et al., 2004). In addition, in our laboratory, the effect of chronic exposure to low concentrations of DU was studied on xenobiotic metabolizing enzymes. Previous works described gene expression modifications of the xenobiotic cytochrome P450, particularly CYP3A, in many tissues (Souidi et al., 2005) without modifications of the phase II and phase III xenobiotic enzymes in the liver and the kidney (Gueguen et al., 2005).

Xenobiotic metabolizing enzymes have a primary role in protection against potential harmful insult from the environment (pollutants, pesticides, etc.). The liver contains these enzymes most abundantly (Debri et al., 1995), but the kidney, a target tissue of uranium, could also actively metabolize many drugs, hormones and xenobiotics with a major role in the excretion of these substances (Lohr et al., 1998).

To continue the investigation started in this field, the question of an alteration of the metabolism of a drug can be raised. Previous results suggested that DU-exposure could modify the pharmacokinetics of a drug due to the modifications of the expression of xenobiotic metabolizing enzymes (Souidi et al., 2005; Gueguen et al., 2006). Then, in a first experimental study, treatment of DU-exposed rats with a slightly toxic concentration of APAP (acetaminophen also known as paracetamol) has been done. It was shown that acetaminophen is metabolically activated by cytochrome P450 to form a reactive metabolite that covalently binds to protein (Mitchell et al., 1973) both in liver and kidney (Dahlin et al., 1984; Hart et al., 1994). APAP is generally accepted as a safe drug when administered within the therapeutic range but after overdose absorption or in specific conditions (alcohol absorption, etc.) acetaminophen is known to be hepatotoxic and nephrotoxic in man and in experimental animals (Curry et al., 1982; Keaton, 1988; Vermeulen et al., 1992; Bonkovsky et al., 1994).

The aim of this study was thus to evaluate the effect of low dose chronic DU to rats treated by APAP at the end of a long-term DU-exposure for 9 months. Therefore, the possibility of an effect of DU exposure on the toxicity of APAP was analyzed in rats. We measured several parameters involved in APAP toxicity. Body weight data and plasma biochemical parameters related to liver and kidney injury, plasma APAP concentration, histological findings and xenobiotic metabolizing enzyme activities were measured in control and DU exposed rats additionally treated with APAP.

2. Materials and methods

2.1. Animals

The experiments were performed in male Sprague–Dawley rats (300 g) provided by Charles River (L'Arbresle, France), housed at constant room temperature (21 °C ± 1) with a 12 h:12 h (light/dark) cycle, and provided with free access to standard rat pellets (SAFE, Augy, France) and water throughout the 2 weeks acclimatization periods. They were then carefully monitored (food and water intake, body weight) until the end of the experiment. The experiments were approved by the Animals Care Committee of the Institute and conducted in accordance with French regulations for animal experimentation (Ministry of Agriculture Act No. 2001-464, May 2001).

2.2. Animal treatment

The rats in the experimental group were exposed to uranyl nitrate (U^{238} = 99.74%, U^{235} = 0.26%, U^{234} = 0.001%), in their drinking water for 9 months, at a dose of 40 mg/l (about 1 mg/rat/day) (AREVA-NC, France). This dose 40 mg/l was also the double of the highest concentration found naturally on Earth, in the drinking water of Finland (Asikainen and Kahlos, 1980).

The rats in the experimental group and the control group were treated by intra-peritoneal injection of acetaminophen (APAP) at a single dose of 400 mg/kg body weight (75 mg/ml in

25% polyethylene glycol 400) during 2 h ($n = 8$) or 24 h ($n = 8$) before euthanasia. Animals were euthanized by intracardiac puncture with a 1-ml insulin syringe to collect blood at the end of the APAP treatment.

Non-treated animals exposed ($n = 3$) or not to DU ($n = 3$) were treated with the same volume of vehicle i.p. and used for plasma and histological analyses.

2.3. Plasma biochemical parameters and histopathology

We used an automated Konelab 20 to measure plasma creatinine, urea, ALT (alanine amino-transferase), AST (aspartate amino-transferase) (biological chemistry reagents, Thermo Electron Corporation, France) in the control and DU-exposed rats.

Thin sections of the liver and the kidney were cut using a microtome, stained with hematoxylin and eosin and examined by light microscope. Damage was assessed by expert laboratory pathologist (Biodoxis, Romainville, France) on classically used criteria.

2.4. Plasma APAP analysis

The plasma concentration of APAP was measured using the modified method of Tran et al. (2001). Plasma samples (100 μl) were mixed with theophylline as an internal standard and diluted with Milli-Q® water to give a total volume of 290 μl. Plasma proteins were precipitated with 10 μl of 30% (w/v) perchloric acid. The samples were mixed using a vortex® shaker for 10 s and centrifuged for 10 min at 10 000 × g. The supernatant was filtrated through a 0.45 μm filter and 20 μl of filtrate was injected into the HPLC system on a SymmetryShield RP18 column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm, Waters) with mobile phase consisting of 20 mM phosphate buffer–acetonitrile (85:15, v/v) at a flow rate of 1 ml/min. Peaks were detected by absorbance at 254 nm with a UV detector. Typical retention times were 3.4 and 4.4 min for theophylline and APAP, respectively.

2.5. Preparation of liver microsomes

Liver microsomes were prepared from fresh samples (about 1 g) according to Souidi et al. (1999). We determined microsomal protein content as previously described, according to the Lowry method with bovine serum albumin as a standard (Lowry et al., 1951).

2.6. Testosterone hydroxylase assay

Testosterone hydroxylase activity was determined with a technique previously described (Souidi et al., 2005) on liver microsomes. Enzymatic activity of the testosterone hydroxylases (2α-testosterone-hydroxylase (CYP2C), 6β-testosterone-hydroxylase (CYP3A), 7α-testosterone-hydroxylase (CYP2A), and 16α-testosterone-hydroxylase (CYP2B) is expressed as picomoles per minute per whole liver.

2.7. Real time quantitative RT-PCR

Real-time PCR was used to analyze the mRNA level of the CYP2C11, CYP3A2, GSTA2, UGT1A1, UGT2B1, SULT1B1, MRP2 and MDR1.

Total RNA from the liver was isolated using RNeasy total RNA isolation Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) and reversely transcribed with random hexamers using Superscript II First Strand Synthesis System (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Real-time PCR was performed on an Abi Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) using 10 ng of template DNA for each reaction. Samples were normalized to hypoxanthine–guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) (Ropenga et al., 2004) and fold-inductions calculated relative to the control at day 1. Sequences for the forward and reverse primers are listed in Table 1.

2.8. Statistical analysis

Results are reported as mean ± S.E. Statistical analyses were performed with Student's t-test. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Weight and plasma biochemical parameters

Plasma APAP level was measured after 2 or 24 h of treatment (Fig. 1). There was no difference after 2 h of treatment but after 24 h the plasma level of APAP was higher in the DU exposed group compared to the non-contaminated group (by 56%, $p < 0.05$).

Table 2 shows the weight data for control and DU-exposed rats both having been treated with APAP for 2 h and for 24 h. The administration of a single dose of 400 mg/kg of APAP to the rats induced a decrease of their body weight (15%, $p < 0.01$) after 24 h compared to after only 2 h of treatment, which was significant only for the control rats. Concerning liver and kidney weights per body weight, a significant decrease was observed in the DU exposed group after 24 h of treatment compared to the 2 h APAP control group (respectively 12%, $p < 0.05$ and 11%, $p < 0.05$).

Plasma biochemical parameters associated with liver and kidney function are shown in Fig. 2. Mean plasma concentrations of transaminases in the control group were not significantly increased except for ALT (51%, $p < 0.05$) after 24 h of APAP treatment. Concerning the DU-exposed group, ALT and AST were significantly increased (respectively by 110%, $p < 0.01$ and 135%, $p < 0.05$) starting from 2 h of APAP treatment. Moreover, ALT was significantly higher in DU-exposed group (by 51%, $p < 0.05$) compared to control at this time. After

Table 1
Primer sequences for rat CYPs, phases II and III xenobiotics-metabolizing enzymes and transporters

Gene (accession no.)	Primers	5′ → 3′ sequence	Reference
CYP2C11 (X79081)	Forward Reverse	ATG GGA TGC AAT GGA AGG AG TCT TGC CCA TCC CAA AAG TC	This study
CYP3A2 (U09742)	Forward Reverse	AGT AGT GAC GAT TCC AAC ATA T TCA GAG GTA TCT GTG TTT CCT	Rekka et al. (2002)
CYP2E1 (NM031543)	Forward Reverse	GGA GGA GCT CAA AAA CAC CAA A GGT GCG CAG CCA ATC AG	This study
GSTA2 (NM017013)	Forward Reverse	TTG ACA TGT ATT CAG AGG GT TTG TTT TGC ATC CAT GGC TG	t Hoen et al. (2002)
UGT2B1 (NM031533)	Forward Reverse	TGG AGA ACA TGG TGT AGT GGT TTG GCT TTT TCT TCA GTA GTC AGG	This study
SULT1B1 (NM022513)	Forward Reverse	TCC CAA AAT CCT TCT GGG ATA A GTG CCA GGA AGA GGC TGA ATA	This study
MRP2 (NM012833)	Forward Reverse	ACC TTC CAC GTA GTG ATC CT GAT TTC CCA GAG CCT ACA GT	This study
MDR1a (NM133401)	Forward Reverse	ATC AAC TCG CAA AAG CAT CC AAT TCA ACT TCA GGA TCC GC	Theron et al. (2003)

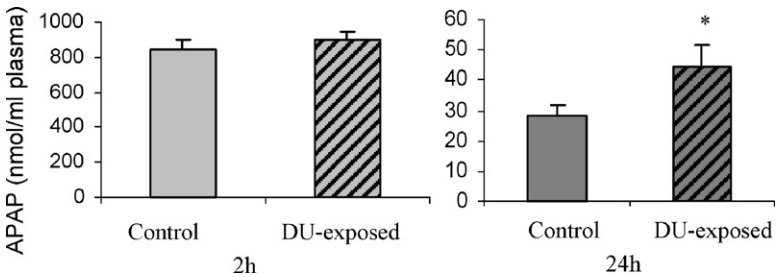


Fig. 1. Plasma acetaminophen (APAP) concentration of rats chronically exposed to depleted uranium (DU) during 9 months and treated by acetaminophen during 2 or 24 h. Data are mean ± S.E.M. ($n = 8$); $^{*}p < 0.05$ significantly different from control value.

24 h of treatment, ALT was increased in the control (by 51%, $p < 0.05$) and the DU-exposed group (65%, $p < 0.001$) (Fig. 2A).

Plasma creatinine was increased after 2 h of APAP treatment in the DU and the non-contaminated group and returned to normal level after 24 h of treatment. Similarly, urea was increased after 2 h of APAP treatment but was only significant for the DU exposed group (Fig. 2B).

3.2. Liver and kidney histological analyses

For the liver, there was no clear histological modification between DU-exposed rats and non-contaminated rats (Fig. 3). Nevertheless, an increased cytoplasm clarification was observed after 2 h of APAP treatment in both groups and returned to control appearance after 24 h of treatment. Conversely, concerning the kidney histol-

Table 2
Body, liver and kidney weight in non-exposed ($n = 8$) and DU-exposed ($n = 9$) rats treated by acetaminophen (APAP) for 2 or 24 h

	Non-exposed		DU-exposed	
	APAP (2 h)	APAP (24 h)	APAP (2 h)	APAP (24 h)
Final body weight (g)	715.1 ± 27.2	609.1 ± 14.8**	674.2 ± 28.3	622.2 ± 16.6
Liver (g/100 g body weight)	3.33 ± 0.12	3.15 ± 0.12	3.33 ± 0.11	2.95 ± 0.09*
Kidney (g/100 g body weight)	0.60 ± 0.02	0.63 ± 0.05	0.65 ± 0.03	0.58 ± 0.01*

The APAP 2 h value is considered as the control in both groups. The values are expressed as mean ± S.E. $^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$ between the 2 h acetaminophen treatment and the 24 h acetaminophen treatment.

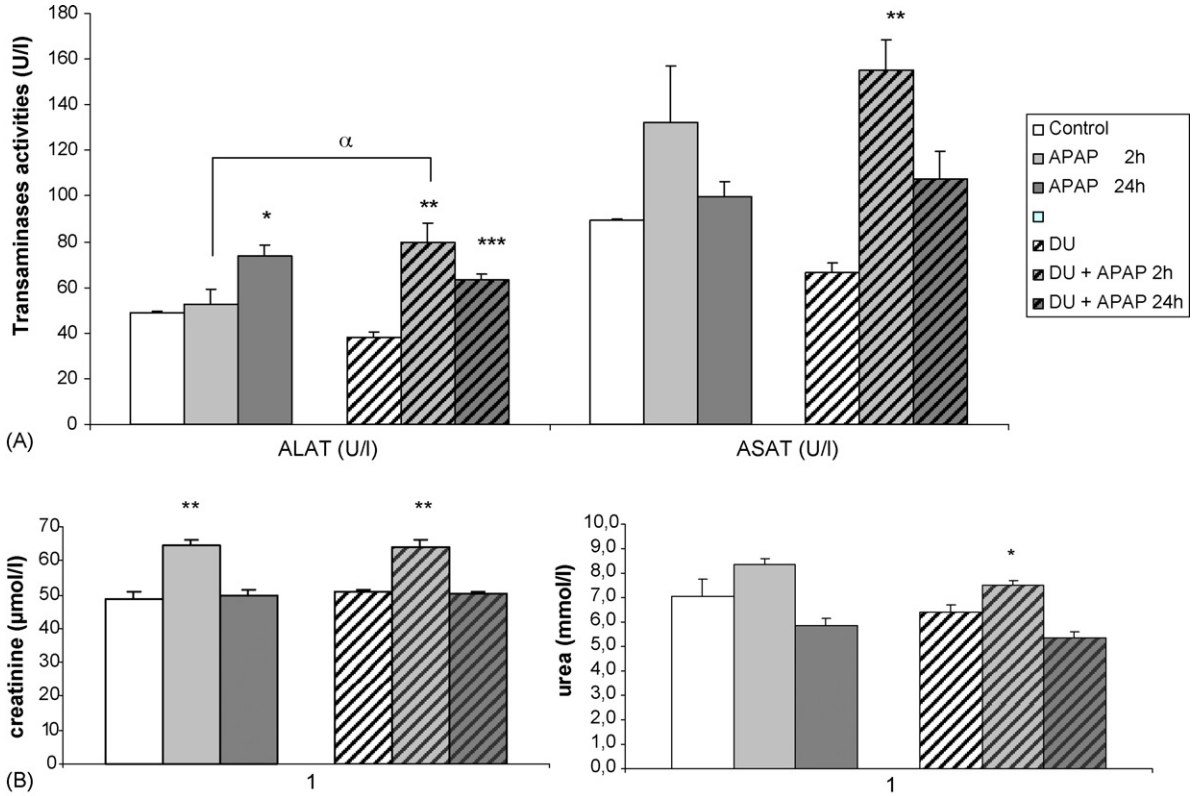


Fig. 2. Plasma (A) transaminase activities (ALT, AST), (B) urea and creatinine of rats chronically exposed to depleted uranium (DU) during 9 months and treated by acetaminophen (APAP) during 2 or 24 h. Data are mean ± S.E.M. ($n = 8$); $^{***}p < 0.001$, $^{**}p < 0.01$, $^{*}p < 0.05$ significantly different from control value. $^{\alpha}p < 0.05$, significantly different from non-exposed group.

ogy, after 2 h of acetaminophen treatment, no alteration was observed, but after 24 h, some proximal tubular cell necroses were observed. Moreover, this alteration was more obvious in the DU-exposed group as pointed out by the arrows (Fig. 4).

3.3. Liver and kidney xenobiotic metabolizing enzymes

Gene expression of xenobiotic metabolizing enzymes and liver enzymes activities of cytochromes P450 enzymes were studied in the control and DU-exposed group both treated by acetaminophen (Fig. 5).

In the liver, the gene expression of the phase I (CYP3A2, 2C11, 2E1) and phase II (GSTA2, UGT2B1, SULT1B1,) enzymes decreased very drastically between 2 and 24 h but no significant changes were observed between control and DU-exposed group. Conversely, MRP2 mRNA level was increased after 24 h of acetaminophen treatment but the gene expression of the phase III transporters was not significantly changed between control and DU-exposed group. In the kidney, mRNA levels of the xenobiotic gene studied were globally increased after 24 h of acetaminophen treatment and this augmentation was higher in the DU-exposed group for CYP2E1 ($p < 0.01$), GSTA2 ($p < 0.01$) and MRP2 ($p < 0.01$).

Liver cytochrome P450 activities were measured 2 and 24 h following acetaminophen treatment (Fig. 6). Testosterone metabolism is a widely used indicator of CYP2A, 2B, 2C and 3A enzymes activities. Analysis of testosterone metabolites demonstrated that hepatic activities of CYP2A, 2B and 3A were decreased between 2 and 24 h of APAP treatment for the control group. In the DU-exposed group, they were already fully diminished after 2 h of APAP treatment. Only for 7α-hydroxytestosterone (CYP2A) there was a further progressive and significant decrease in the DU-contaminated group during the time period from 2 h ($p < 0.01$) to 24 h ($p < 0.05$) of exposure to APAP.

4. Discussion

Relative to other radioactive compounds, DU has a low level of radioactivity and a extremely long half life.

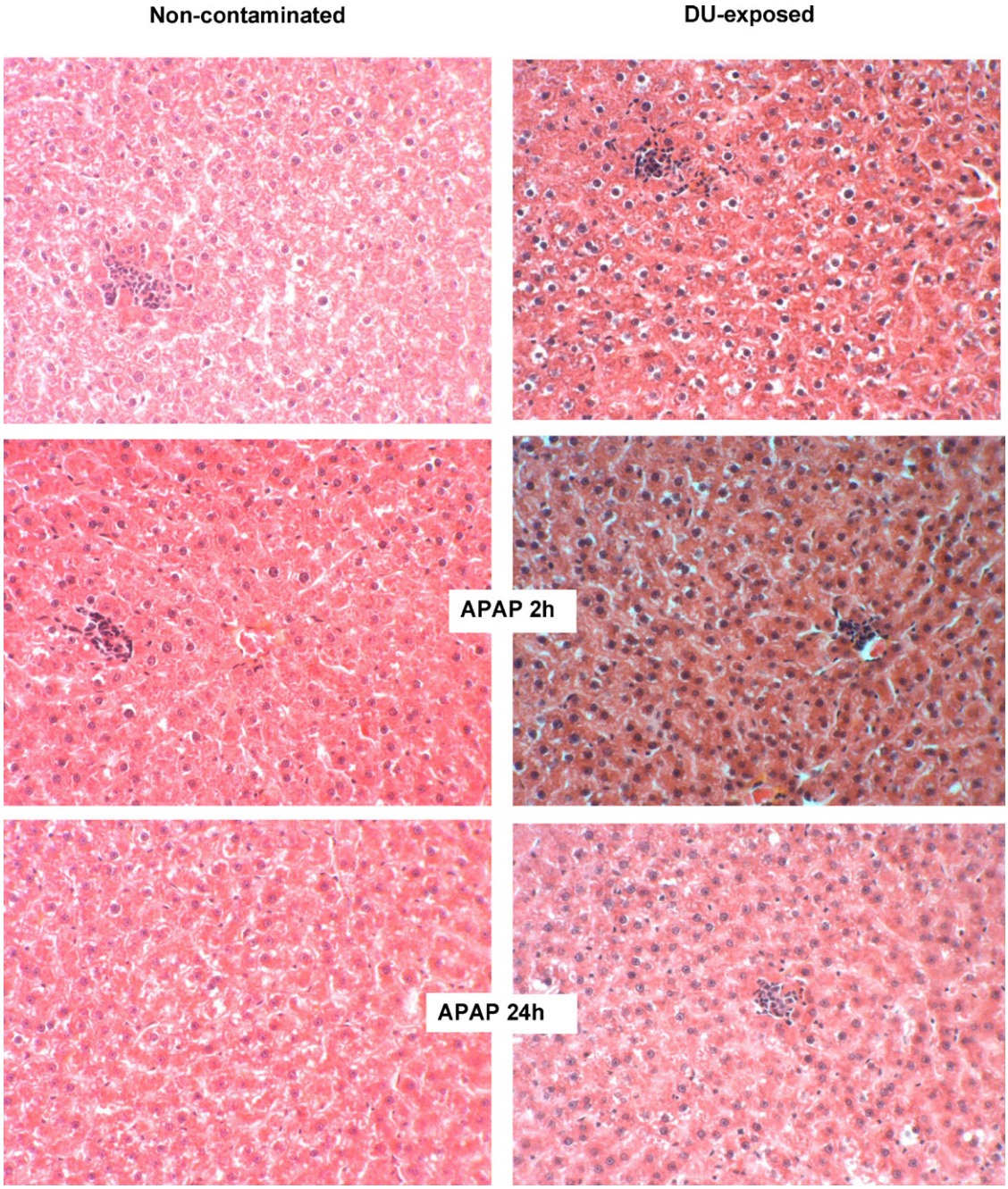


Fig. 3. Effects of DU chronic ingestion and acetaminophen (APAP) treatment (400 mg/kg) on rat liver histology (200×). Microphotographs of rat liver were obtained from non-contaminated (NC, $n = 8$) and contaminated rats (DU, $n = 8$) treated by APAP during 2h (APAP 2h) or 24h (APAP 24h). Longitudinal sections were stained with hematoxylin–eosin–saffron.

Although there is a risk of radiological toxicity from orally ingested natural uranium, the principal health effects are a consequence of the chemical toxicity of uranium. The effect of DU could be compared to other classical heavy metals found in the environment as its level of radioactivity is very low. Indeed, heavy metals were associated in previous studies to changes in drug metabolizing enzymes (Moore, 2004).

Few studies examined the effect of uranium on CYP enzymes and all of them concerned acute administration of a high toxic level of uranium. Pasanen et al (Pasanen et al., 1995) observed a decreased activity of some hep-

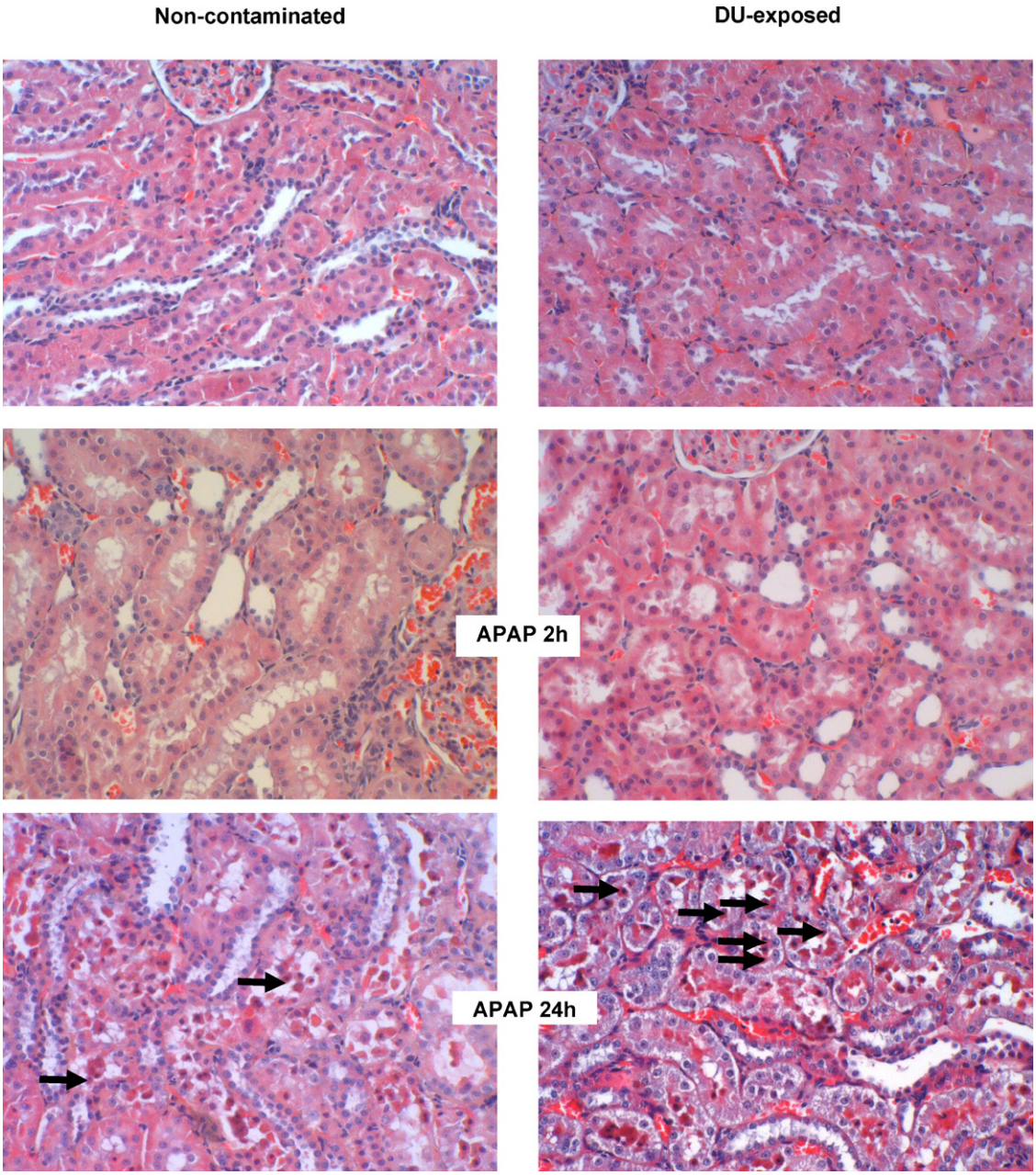


Fig. 4. Effects of DU chronic ingestion and acetaminophen (APAP) treatment (400 mg/kg) on rat kidney histology (200×). Microphotographs of rat kidney were obtained from non-contaminated (NC, $n = 8$) and contaminated rat (DU, $n = 8$) treated by APAP during 2h (APAP 2h) or 24h (APAP 24h) and were representative of alterations observed in the different group. Longitudinal sections were stained with hematoxylin–eosin–saffron.

atic and lung testosterone metabolizing CYP after acute administration through intratracheal instillation. In previous studies, we found that DU contamination at low dose (1 mg/rat/day) induces the expression of CYPs, including CYP3A1, CYP3A2, CYP2C11 and CYP2B1 but did not change the expression of phase II and III metabolizing enzymes (Gueguen et al., 2005; Souidi et al., 2005). In addition, the general health status of the animal was not modified. The induction by DU of these enzymes has been observed in different tissues, including the liver and the kidney. Then, chronic ingestion of DU may increase levels of phase I metabolites of some xenobiotics (drugs) by increasing CYPs in the liver and the kidney. This stimulating effect of DU on these specific CYPs could lead to modifications of the pharmacokinetics of many drugs and then to hepatic and/or renal

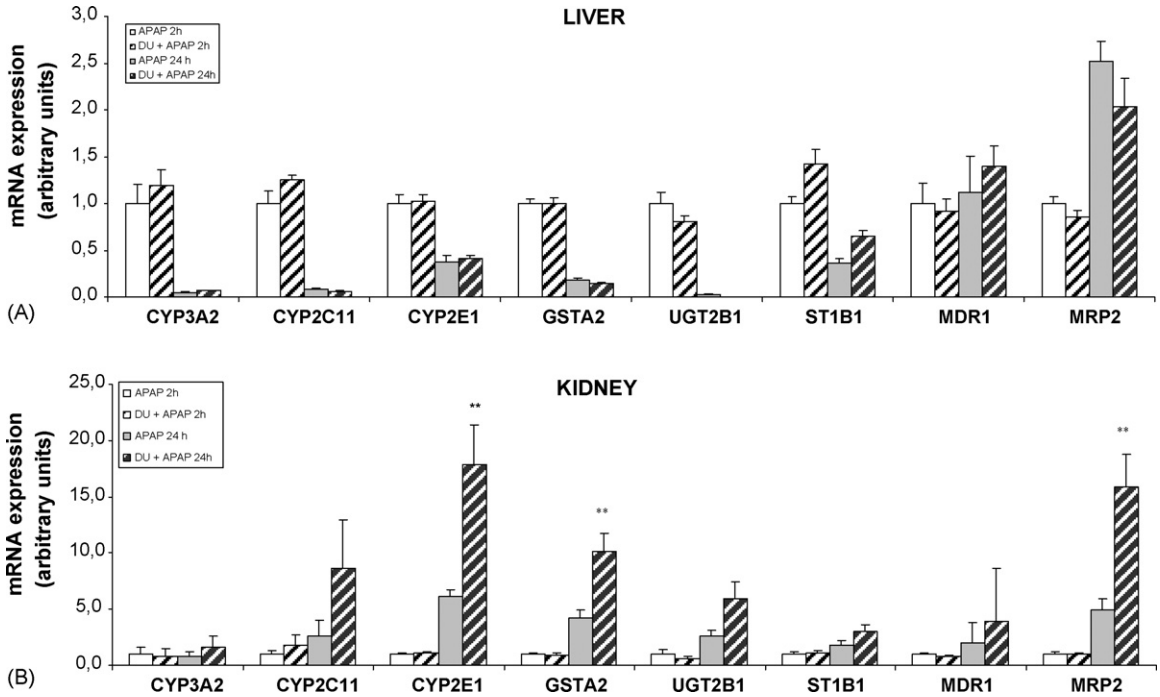


Fig. 5. Gene expression of xenobiotic metabolizing enzyme in (A) the liver and (B) the kidney after chronic exposure to depleted uranium (DU) and acetaminophen treatment (APAP) during 2 and 24 h. mRNA levels of CYP3A2, CYP2C11, CYP2E1, GSTA2, UGT2B1, ST1B1, MDR1 and MRP2 were measured in the liver and the kidney by real-time quantitative RT-PCR of control or 9 months depleted uranium (DU) contaminated rats treated with acetaminophen (400 mg/kg). The results were expressed as a ratio to the housekeeping gene hypoxanthine–guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) mRNA levels. Data are mean ± S.E.M. ($n = 8$); $^{***}p < 0.001$, $^{**}p < 0.01$, $^{*}p < 0.05$ significantly different from control value.

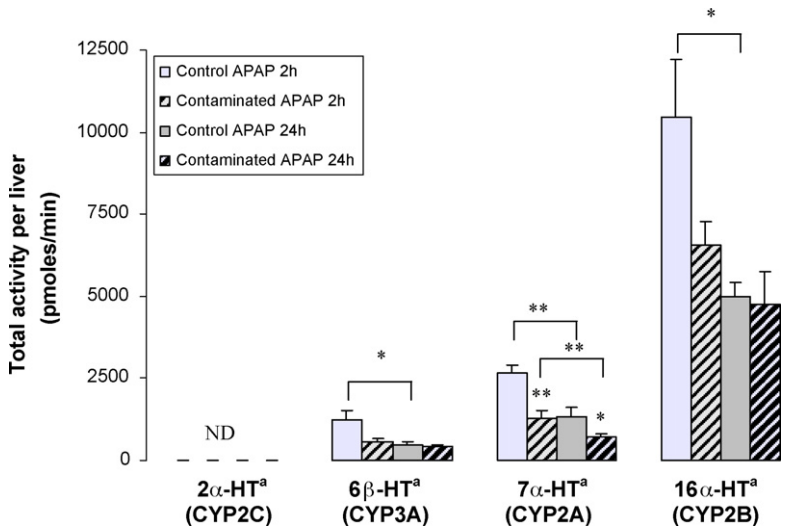


Fig. 6. Testosterone hydroxylase activity in hepatic microsomes samples from male rats that were contaminated with DU for 9 months and treated by acetaminophen (APAP) during 2 or 24 h. The associated isoforms of testosterone hydroxylation were: 2α (CYP2C), 6β (CYP3A), 7α (CYP2A) and in position 16α (CYP2B). Data are the mean ± S.E. ($n = 6$); $^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$ significantly different from control value. (a) The abbreviation designates the regio- and stereochemistry of hydroxylated testosterone metabolite (i.e. 2α-HT denotes 2α-hydroxytestosterone). ND is the abbreviation for not detected.

toxicities in the setting of drug administration. Indeed, in a model of uranyl-nitrate-induced acute renal failure in rats, P450 isoforms gene expression and the pharmacokinetics of many drugs were affected (Chung et al., 2003; Moon et al., 2003). Nevertheless, the effect of a chronic non-toxic level of DU on CYPs enzymes and drug metabolism was still unknown.

In the present study, APAP treatments were performed in rats chronically exposed to DU in order to evaluate the responsiveness of these contaminated animals to a slightly toxic dose of APAP. Acetaminophen is one of the most commonly used analgesics/antipyretics worldwide. This compound is generally considered as a safe drug at therapeutic level, however, in the case of overdose or in sensitive individuals, hepatotoxicity and nephrotoxicity can occur (Curry et al., 1982; Vermeulen et al., 1992; Bonkovsky et al., 1994).

Rats received a single dose of 400 mg/kg corresponding to a slightly toxic concentration. Preliminary studies were conducted to determine the optimal concentration with no modification of kidney biomarkers and a weak increase of liver biomarker at 24 h (data not shown). In these conditions, the body weight of the rats treated during 24 h was reduced in the control group compared to the rats treated for only 2 h, whereas it was not significantly reduced for the DU-exposed group. Conversely, the liver and kidney weight were diminished after 24 h only in the DU group, giving some sign of an increased sensitivity of these rats to acetaminophen treatment. This observation brings us to measure plasma APAP concentration. The more important plasma concentration of APAP in the DU-exposed rats (i.e. after 24 h of treatment) raises the question of an alteration of the liver. Indeed, in the case of overdose or in sensitive individuals, APAP is known to induce hepatotoxicity, which presents itself as centrilobular necrosis in humans and in experimental animals (Vermeulen et al., 1992; Thomas, 1993). Then, plasma markers (ALT, AST) and liver histology were analyzed. An increased ALT activity was noticed from 2 h of APAP treatment in the DU group whereas it increased later in the control group. These results confirm an increased sensitivity of DU-exposed rats to APAP toxicity. Nevertheless, no alteration of the liver was observed in terms of histological criteria unlike usual alteration observed after higher APAP overdoses in animals (Echard et al., 2001; Heinloth et al., 2004) APAP nephrotoxicity characterized by proximal tubular cell necrosis has also been observed (Kleinman et al., 1980; Stern et al., 2005). The analysis of kidney marker and especially kidney histology revealed renal injuries that were more important in the DU-exposed group. Theses results suggest that the elevated plasma level of APAP in the DU-exposed group at 24 h is the consequence of a slight kidney defect characterized by incomplete proximal tubular cell necrosis. In the context of uranium chemical toxicity, the kidney is one of the major target tissues (Leggett, 1989; Diamond et al., 1989). Both functional and histological damage to the proximal tubulus has been demonstrated (Haley, 1982; Gilman et al., 1998). However, the administrated level of DU (40 mg/l) which corresponds to 1/10 of the kidney toxic level for the whole life of the animals has never been shown to be nephrotoxic (Souidi et al., 2005). Hence, long-term contamination of rats with low dose of DU will lead to more sensitive animals, particularly the kidney, to APAP toxicity.

Plasma and histological observations imply that molecular modifications should appear. The disturbance of drug elimination by DU exposure raises the question of molecular modification of drug metabolizing enzymes. In the kidney of DU-exposed rats, gene expression of phases I–III xenobiotic enzymes and transporters analyzed were increased after 24 h of APAP treatment. Moreover, CYP2E1 which is known to be one of the major CYP responsible for APAP bioactivation and toxicity (Vermeulen et al., 1992; James et al., 2003) is increased by three-fold in the DU-exposed group at 24 h compared to the control group. These results agree with the kidney injury observed by histological criteria. In the liver, no modification of the gene expression of the xenobiotic metabolizing enzymes was observed. The testosterone metabolites related to CYPs activities were globally decreased between 2 and 24 h of APAP treatment as the CYP gene expression. Nevertheless, modifications of CYP activities were observed between control and contaminated animals. The decreased CYPs activities probably result in the interference of DU chronic contamination with phase I enzymes. This diminished liver CYP activities and the kidney alterations observed could explain the less good elimination of APAP in the plasma.

In the present study, we confirm the hypothesis of a modification of the drug metabolism by DU-exposure given in previous studies. Following this study done with a toxic concentration of APAP, it will be interesting to study the effect of a treatment of APAP at therapeutic doses administered to DU-contaminated rats.

Acknowledgments

The authors thank T. Loiseau and S. Gongora for their assistance during the animal pre-treatment period and the experimentation. This study was part of the ENVIRHOM research program supported by the Institute for Radioprotection and Nuclear Safety (IRSN).

References

Asikainen, M., Kahlos, H., 1980. Natural radioactivity of drinking water in Finland. Health Phys. 39, 77–83.

Belles, M., Albina, M.L., Linares, V., Gomez, M., Sanchez, D.J., Domingo, J.L., 2005. Combined action of uranium and stress in the rat. I. Behavioral effects. Toxicol. Lett. 158, 176–185.

Bonkovsky, H.L., Kane, R.E., Jones, D.P., Galinsky, R.E., Banner, B., 1994. Acute hepatic and renal toxicity from low doses of acetaminophen in the absence of alcohol abuse or malnutrition: evidence for increased susceptibility to drug toxicity due to cardiopulmonary and renal insufficiency. Hepatology 19, 1141–1148.

Bussy, C., Lestaevel, P., Dhieux, B., Amourette, C., Paquet, F., Gourmelon, P., Houpert, P., 2006. Chronic ingestion of uranyl nitrate perturbs acetylcholinesterase activity and monoamine metabolism in male rat brain. Neurotoxicology 27, 245–252.

Chung, W., Kim, E.J., Lee, I., Kim, S.G., Lee, M.G., Kim, S.H., 2003. Effects of recombinant human growth hormone on the pharmacokinetics of intravenous chlorzoxazone in rats with acute renal failure induced by uranyl nitrate. Life Sci. 73, 253–263.

Craft, E., Abu-Qare, A., Flaherty, M., Garofolo, M., Rincavage, H., Abou-Donia, M., 2004. Depleted and natural uranium: chemistry and toxicological effects. J. Toxicol. Environ. Health B: Crit. Rev. 7, 297–317.

Curry Jr., R.W., Robinson, J.D., Sughrue, M.J., 1982. Acute renal failure after acetaminophen ingestion. JAMA 247, 1012–1014.

Dahlin, D.C., Miwa, G.T., Lu, A.Y., Nelson, S.D., 1984. *N*-Acetyl-*p*-benzoquinone imine: a cytochrome P-450-mediated oxidation product of acetaminophen. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81, 1327–1331.

Debri, K., Boobis, A.R., Davies, D.S., Edwards, R.J., 1995. Distribution and induction of CYP3A1 and CYP3A2 in rat liver and extrahepatic tissues. Biochem. Pharmacol. 50, 2047–2056.

Diamond, G.L., Morrow, P.E., Panner, B.J., Gelein, R.M., Baggs, R.B., 1989. Reversible uranyl fluoride nephrotoxicity in the Long Evans rat. Fundam. Appl. Toxicol. 13, 65–78.

Domingo, J.L., 2001. Reproductive and developmental toxicity of natural and depleted uranium: a review. Reprod. Toxicol. 15, 603–609.

Echard, B.W., Talpur, N.A., Fan, A.Y., Bagchi, D., Preuss, H.G., 2001. Hepatoprotective ability of a novel botanical formulation on mild liver injury in rats produced by acute acetaminophen and/or alcohol ingestion. Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol. 110, 73–85.

Gilman, A.P., Villeneuve, D.C., Secours, V.E., Yagminas, A.P., Tracy, B.L., Quinn, J.M., Valli, V.E., Willes, R.J., Moss, M.A., 1998. Uranyl nitrate: 28-day and 91-day toxicity studies in the Sprague–Dawley rat. Toxicol. Sci. 41, 117–128.

Gueguen, Y., Paquet, F., Voisin, P., Souidi, M., 2005. Effects of chronic contamination with depleted uranium on xenobiotic biotransformation enzymes in the rat. In: Proceedings of the 14th International Conference on Cytochromes P450, pp. 61–65.

Gueguen, Y., Souidi, M., Baudelin, C., Dudoignon, N., Grison, S., Dublineau, I., Marquette, C., Voisin, P., Gourmelon, P., Aigueperse, J., 2006. Short-term hepatic effects of depleted uranium on xenobiotic and bile acid metabolizing cytochrome P450 enzymes in the rat. Arch. Toxicol. 80, 187–195.

Haley, D.P., 1982. Morphologic changes in uranyl nitrate-induced acute renal failure in saline- and water-drinking rats. Lab. Invest. 46, 196–208.

Hart, S.G., Beierschmitt, W.P., Wyand, D.S., Khairallah, E.A., Cohen, S.D., 1994. Acetaminophen nephrotoxicity in CD-1 mice. I. Evidence of a role for in situ activation in selective covalent binding and toxicity. Toxicol. Appl. Pharmacol. 126, 267–275.

Heinloth, A.N., Irwin, R.D., Boorman, G.A., Nettesheim, P., Fannin, R.D., Sieber, S.O., Snell, M.L., Tucker, C.J., Li, L., Travlos, G.S., Vansant, G., Blackshear, P.E., Tennant, R.W., Cunningham, M.L., Paules, R.S., 2004. Gene expression profiling of rat livers reveals indicators of potential adverse effects. Toxicol. Sci. 80, 193–202.

James, L.P., Mayeux, P.R., Hinson, J.A., 2003. Acetaminophen-induced hepatotoxicity. Drug Metab. Dispos. 31, 1499–1506.

Keaton, M.R., 1988. Acute renal failure in an alcoholic during therapeutic acetaminophen ingestion. South Med. J. 81, 1163–1166.

Kleinman, J.G., Breitenfield, R.V., Roth, D.A., 1980. Acute renal failure associated with acetaminophen ingestion: report of a case and review of the literature. Clin. Nephrol. 14, 201–205.

Leggett, R.W., 1989. The behavior and chemical toxicity of U in the kidney: a reassessment. Health Phys. 57, 365–383.

Lestaevel, P., Bussy, C., Paquet, F., Dhieux, B., Clarencon, D., Houpert, P., Gourmelon, P., 2005. Changes in sleep–wake cycle after chronic exposure to uranium in rats. Neurotoxicol. Teratol. 27, 835–840.

Linares, V., Albina, M.L., Belles, M., Mayayo, E., Sanchez, D.J., Domingo, J.L., 2005. Combined action of uranium and stress in the rat. II. Effects on male reproduction. Toxicol. Lett. 158, 186–195.

Lohr, J.W., Willsky, G.R., Acara, M.A., 1998. Renal drug metabolism. Pharmacol. Rev. 50, 107–141.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265–275.

Mitchell, J.R., Jollow, D.J., Potter, W.Z., Gillette, J.R., Brodie, B.B., 1973. Acetaminophen-induced hepatic necrosis. IV. Protective role of glutathione. J. Pharmacol. Exp. Ther. 187, 211–217.

Moon, Y.J., Lee, A.K., Chung, H.C., Kim, E.J., Kim, S.H., Lee, D.C., Lee, I., Kim, S.G., Lee, M.G., 2003. Effects of acute renal failure on the pharmacokinetics of chlorzoxazone in rats. Drug Metab. Dispos. 31, 776–784.

Moore, M.R., 2004. A commentary on the impacts of metals and metalloids in the environment upon the metabolism of drugs and chemicals. Toxicol. Lett. 148, 153–158.

Murray, V.S., Bailey, M.R., Spratt, B.G., 2002. Depleted uranium: a new battlefield hazard. Lancet 360 (Suppl), s31–s32.

Pasanen, M., Lang, S., Kojo, A., Kosma, V.M., 1995. Effects of simulated nuclear fuel particles on the histopathology and CYP enzymes in the rat lung and liver. Environ. Res. 70, 126–133.

Priest, N.D., 2001. Toxicity of depleted uranium. Lancet 357, 244–246.

Rekka, E., Evdokimova, E., Eeckhoudt, S., Labar, G., Calderon, P.B., 2002. Role of temperature on protein and mRNA cytochrome P450 3A (CYP3A) isozymes expression and midazolam oxidation by cultured rat precision-cut liver slices. Biochem Pharmacol 64, 633–643.

Ropenga, A., Chapel, A., Vandamme, M., Griffiths, N.M., 2004. Use of reference gene expression in rat distal colon after radiation exposure: a caveat. Radiat. Res. 161, 597–602.

Souidi, M., Gueguen, Y., Linard, C., Dudoignon, N., Grison, S., Baudelin, C., Marquette, C., Gourmelon, P., Aigueperse, J., Dublineau, I., 2005. In vivo effects of chronic contamination with depleted uranium on CYP3A and associated nuclear receptors PXR and CAR in the rat. Toxicology 214, 113–122.

Souidi, M., Parquet, M., Ferezou, J., Lutton, C., 1999. Modulation of cholesterol 7alpha-hydroxylase and sterol 27-hydroxylase activities by steroids and physiological conditions in hamster. Life Sci. 64, 1585–1593.

Stern, S.T., Bruno, M.K., Hennig, G.E., Horton, R.A., Roberts, J.C., Cohen, S.D., 2005. Contribution of acetaminophen-cysteine to

acetaminophen nephrotoxicity in CD-1 mice. I. Enhancement of acetaminophen nephrotoxicity by acetaminophen-cysteine. Toxicol. Appl. Pharmacol. 202, 151–159.

t Hoen, P.A., Rooseboom, M., Bijsterbosch, M.K., van Berkel, T.J., Vermeulen, N.P., Commandeur, J.N., 2002. Induction of glutathione-S-transferase mRNA levels by chemopreventive selenocysteine Se-conjugates. Biochem Pharmacol 63, 1843–1849.

Taylor, D.M., Taylor, S.K., 1997. Environmental uranium and human health. Rev. Environ. Health 12, 147–157.

Theron, D., Barraud de Lagerie, S., Tardivel, S., Pelerin, H., Demeuse, P., Mercier, C., Mabondzo, A., Farinotti, R., Lacour, B., Roux, F., Gimenez, F., 2003. Influence of tumor necrosis factor-alpha on the expression and function of P-glycoprotein in an immortalised rat brain capillary endothelial cell line GPNT. Biochem Pharmacol 66, 579–587.

Thomas, S.H., 1993. Paracetamol (acetaminophen) poisoning. Pharmacol. Ther. 60, 91–120.

Tran, A., Treluyer, J.M., Rey, E., Barbet, J., Ferracci, G., d'Athis, P., Vincent, J., Pons, G., 2001. Protective effect of stiripentol on acetaminophen-induced hepatotoxicity in rat. Toxicol. Appl. Pharmacol. 170, 145–152.

Vermeulen, N.P., Bessems, J.G., Van de Straat, R., 1992. Molecular aspects of paracetamol-induced hepatotoxicity and its mechanism-based prevention. Drug Metab. Rev. 24, 367–407.

Wrenn, M.E., Durbin, P.W., Howard, B., Lipsztein, J., Rundo, J., Still, E.T., Willis, D.L., 1985. Metabolism of ingested U and Ra. Health Phys. 48, 601–633.

Zamora, M.L., Tracy, B.L., Zielinski, J.M., Meyerhof, D.P., Moss, M.A., 1998. Chronic ingestion of uranium in drinking water: a study of kidney bioeffects in humans. Toxicol. Sci. 43, 68–77.

Références

Abu-Qare, A. W., and Abou-Donia, M. B. (2002). Depleted uranium--the growing concern. *J Appl Toxicol* **22**, 149-52.

Adams, J. S., Chen, H., Chun, R. F., Nguyen, L., Wu, S., Ren, S. Y., Barsony, J., and Gacad, M. A. (2003). Novel regulators of vitamin D action and metabolism: Lessons learned at the Los Angeles zoo. *J Cell Biochem* **88**, 308-14.

Adorini, L. (2002). Immunomodulatory effects of vitamin D receptor ligands in autoimmune diseases. *Int Immunopharmacol* **2**, 1017-28.

Agalesdes, P., Manesse, D., Philippe, M., Israël, F., and Robeau, D. (2000). Inventaire des sources de césium. *In: Le Césium de l'environnement à l'homme. EDP Sciences, Paris* **pp. 13-26**.

Aiba, I., Yamasaki, T., Shinki, T., Izumi, S., Yamamoto, K., Yamada, S., Terato, H., Ide, H., and Ohyama, Y. (2006). Characterization of rat and human CYP2J enzymes as Vitamin D 25-hydroxylases. *Steroids* **71**, 849-56.

Armbrecht, H. J., Boltz, M. A., and Kumar, V. B. (1999). Intestinal plasma membrane calcium pump protein and its induction by 1,25(OH)(2)D(3) decrease with age. *Am J Physiol* **277**, G41-7.

Armbrecht, H. J., Boltz, M. A., Ritter, C. S., and Brown, A. J. (2007). Parathyroid hormone stimulation of the renal 25-hydroxyvitamin D-1alpha-hydroxylase--effect of age and free radicals. *J Steroid Biochem Mol Biol* **103**, 330-3.

Armbrecht, H. J., Hodam, T. L., and Boltz, M. A. (2003). Hormonal regulation of 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase and 24-hydroxylase gene transcription in opossum kidney cells. *Arch Biochem Biophys* **409**, 298-304.

ATSDR (1999). Toxicological profile for uranium. In:Toxicological profile. *US, department of health and human services. Public health service. Agency for toxic Substances and Disease Registry, Atlanta.*

ATSDR (2004). Toxicological profile for cesium. In:Toxicological profile. *US, department of health and human services. Public health service. Agency for toxic Substances and Disease Registry, Atlanta.*

Auvinen, A., Kurttio, P., Pekkanen, J., Pukkala, E., Ilus, T., and Salonen, L. (2002). Uranium and other natural radionuclides in drinking water and risk of leukemia: a case-cohort study in Finland. *Cancer Causes Control* **13**, 825-9.

Bandazhevskaya, G. S., Nesterenko, V. B., Babenko, V. I., Yerkovich, T. V., and Bandazhevsky, Y. I. (2004). Relationship between caesium (137Cs) load, cardiovascular symptoms, and source of food in 'Chernobyl' children -- preliminary observations after intake of oral apple pectin. *Swiss Med Wkly* **134**, 725-9.

Bandazhevsky, Y. I. (2003). Chronic Cs-137 incorporation in children's organs. *Swiss Med Wkly* **133**, 488-90.

Baran, D. T., Quail, J. M., Ray, R., Leszyk, J., and Honeyman, T. (2000). Annexin II is the membrane receptor that mediates the rapid actions of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3). *J Cell Biochem* **78**, 34-46.

Barber, D. S., Ehrich, M. F., and Jortner, B. S. (2005). The effect of stress on the temporal and regional distribution of uranium in rat brain after acute uranyl acetate exposure. *J Toxicol Environ Health A* **68**, 99-111.

Barbour, G. L., Coburn, J. W., Slatopolsky, E., Norman, A. W., and Horst, R. L. (1981). Hypercalcemia in an anephric patient with sarcoidosis: evidence for extrarenal generation of 1,25-dihydroxyvitamin D. *N Engl J Med* **305**, 440-3.

Barker, C. W., Fagan, J. B., and Pasco, D. S. (1994). Down-regulation of P4501A1 and P4501A2 mRNA expression in isolated hepatocytes by oxidative stress. *J Biol Chem* **269**, 3985-90.

Berger, U., Wilson, P., McClelland, R. A., Colston, K., Haussler, M. R., Pike, J. W., and Coombes, R. C. (1988). Immunocytochemical detection of 1,25-dihydroxyvitamin D receptors in normal human tissues. *J Clin Endocrinol Metab* **67**, 607-13.

Bland, R., Walker, E. A., Hughes, S. V., Stewart, P. M., and Hewison, M. (1999). Constitutive expression of 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase in a transformed human proximal tubule cell line: evidence for direct regulation of vitamin D metabolism by calcium. *Endocrinology* **140**, 2027-34.

Blantz, R. C. (1975). The mechanism of acute renal failure after uranyl nitrate. *J Clin Invest* **55**, 621-35.

Bleise, A., Danesi, P. R., and Burkart, W. (2003). Properties, use and health effects of depleted uranium (DU): a general overview. *J Environ Radioact* **64**, 93-112.

Brandao-Mello, C. E., Oliveira, A. R., Valverde, N. J., Farina, R., and Cordeiro, J. M. (1991). Clinical and hematological aspects of 137Cs: the Goiania radiation accident. *Health Phys* **60**, 31-9.

Breuil, V., and Euller-Ziegler, L. (2004). Nutrition et vieillissement osseux. L'ostéoporose. *Nutrition clinique et métabolisme* **18**, 212-8.

Brewer, L. D., Thibault, V., Chen, K. C., Langub, M. C., Landfield, P. W., and Porter, N. M. (2001). Vitamin D hormone confers neuroprotection in parallel with downregulation of L-type calcium channel expression in hippocampal neurons. *J Neurosci* **21**, 98-108.

Brzoska, M. M., and Moniuszko-Jakoniuk, J. (2005a). Bone metabolism of male rats chronically exposed to cadmium. *Toxicol Appl Pharmacol* **207**, 195-211.

Brzoska, M. M., and Moniuszko-Jakoniuk, J. (2005b). Effect of low-level lifetime exposure to cadmium on calciotropic hormones in aged female rats. *Arch Toxicol*.

Bussy, C., Lestaevel, P., Dhieux, B., Amourette, C., Paquet, F., Gourmelon, P., and Houpert, P. (2006). Chronic ingestion of uranyl nitrate perturbs acetylcholinesterase activity and monoamine metabolism in male rat brain. *Neurotoxicology* **27**, 245-52.

Cantaluppi, C., and Degetto, S. (2000). Civilian and military uses of depleted uranium: environmental and health problems. *Ann Chim* **90**, 665-76.

Carafoli, E., Tiozzo, R., Pasquali-Ronchetti, I., and Laschi, R. (1971). A study of Ca 2+ metabolism in kidney mitochondria during acute uranium intoxication. *Lab Invest* **25**, 516-27.

Chapuy, M. C., Preziosi, P., Maamer, M., Arnaud, S., Galan, P., Hercberg, S., and Meunier, P. J. (1997). Prevalence of vitamin D insufficiency in an adult normal population. *Osteoporos Int* **7**, 439-43.

Chelet, Y. (2006). L'utilisation des radionucléides. In: La radioactivité manuel d'initiation. *EDP Sciences, Paris* **pp. 305-6**.

Chen, K. S., and DeLuca, H. F. (1995). Cloning of the human 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D-3 24-hydroxylase gene promoter and identification of two vitamin D-responsive elements. *Biochim Biophys Acta* **1263**, 1-9.

Chen, W., and Chiang, J. Y. (2003). Regulation of human sterol 27-hydroxylase gene (CYP27A1) by bile acids and hepatocyte nuclear factor 4alpha (HNF4alpha). *Gene* **313**, 71-82.

Cheng, J. B., Levine, M. A., Bell, N. H., Mangelsdorf, D. J., and Russell, D. W. (2004). Genetic evidence that the human CYP2R1 enzyme is a key vitamin D 25-hydroxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 7711-5.

Cheng, J. B., Motola, D. L., Mangelsdorf, D. J., and Russell, D. W. (2003). De-orphanization of cytochrome P450 2R1: a microsomal vitamin D 25-hydroxilase. *J Biol Chem* **278**, 38084-93.

CLEFS-CEA. (2003a). Des rayonnements aux doses, encadré F. *CEA (Paris)* **48**, p.66.

CLEFS-CEA. (2003b). Radioactivité naturelle et radioactivité artificielle, encadré A. *CEA (Paris)* **48**, p.6.

Colle, C., Adam, C., Garnier-Laplace, J., and Roussel-Debet, S. (2005). Césium 137 et environnement, rapport IRSN/DEI/SECRE/SESRE.

Colle, C., and Roussel-Debet, S. (2000). Sols et végétaux. In: *Le Césium de l'environnement à l'homme. EDP Sciences, Paris* **pp. 63-92**.

Cooper, J. R., Stradling, G. N., Smith, H., and Ham, S. E. (1982). The behaviour of uranium-233 oxide and uranyl-233 nitrate in rats. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* **41**, 421-33.

Cormier, C. (2006). Vitamin D and calcium. *Rev Rhum* **73**, 846-851.

Costa, E. M., and Feldman, D. (1986). Homologous up-regulation of the 1,25 (OH)2 vitamin D3 receptor in rats. *Biochem Biophys Res Commun* **137**, 742-7.

Craft, E., Abu-Qare, A., Flaherty, M., Garofolo, M., Rincavage, H., and Abou-Donia, M. (2004). Depleted and natural uranium: chemistry and toxicological effects. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* **7**, 297-317.

Crestani, M., De Fabiani, E., Caruso, D., Mitro, N., Gilardi, F., Vigil Chacon, A. B., Patelli, R., Godio, C., and Galli, G. (2004). LXR (liver X receptor) and HNF-4 (hepatocyte nuclear factor-4): key regulators in reverse cholesterol transport. *Biochem Soc Trans* **32**, 92-6.

Cross, F. T., Palmer, R. F., Busch, R. H., Filipy, R. E., and Stuart, B. O. (1981). Development of lesions in Syrian golden hamsters following exposure to radon daughters and uranium ore dust. *Health Phys* **41**, 135-53.

Daburon, F., LIPsztein, J. L., Melo, D. R., Ramalho, A., Valverde, N. J., de Oliveira, A., and Curado, M. P. (2000). Dosimérie et effets biologiques. *In: Le Césium de l'environnement à l'homme. EDP Sciences, Paris* **pp. 215-31**.

Dahlback, H., and Wikvall, K. (1988). 25-Hydroxylation of vitamin D3 by a cytochrome P-450 from rabbit liver mitochondria. *Biochem J* **252**, 207-13.

Dardenne, O., Prud'homme, J., Arabian, A., Glorieux, F. H., and St-Arnaud, R. (2001). Targeted inactivation of the 25-hydroxyvitamin D(3)-1(alpha)-hydroxylase gene (CYP27B1) creates an animal model of pseudovitamin D-deficiency rickets. *Endocrinology* **142**, 3135-41.

Darwish, H. M., and DeLuca, H. F. (1992). Identification of a 1,25-dihydroxyvitamin D3-response element in the 5'-flanking region of the rat calbindin D-9k gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 603-7.

Day, R., Gorin, M. B., and Eller, A. W. (1995). Prevalence of lens changes in Ukrainian children residing around Chernobyl. *Health Phys* **68**, 632-42.

de Viragh, P. A., Haglid, K. G., and Celio, M. R. (1989). Parvalbumin increases in the caudate putamen of rats with vitamin D hypervitaminosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 3887-90.

den Dekker, E., Hoenderop, J. G., Nilius, B., and Bindels, R. J. (2003). The epithelial calcium channels, TRPV5 & TRPV6: from identification towards regulation. *Cell Calcium* **33**, 497-507.

Després, A., and Métivier, H. (2000). Dosimétrie des expositions aux isotopes radioactifs du césium. *In: Le Césium de l'environnement à l'homme. EDP Sciences, Paris* **pp. 189-232**.

DeVita, R., Olivieri, A., Spinelli, A., Grollino, M. G., Padovani, L., Tarroni, G., Cozza, R., Sorcini, M., Pennelli, P., Casparrini, G., Crescenzi, G. S., Mauro, F., and Carta, S. (2000). Health status and internal radiocontamination assessment in children exposed to the fallout of the Chernobyl accident. *Arch Environ Health* **55**, 181-6.

Di Lella, L. A., Nannoni, F., Protano, G., and Riccobono, F. (2005). Uranium contents and (235)U/(238)U atom ratios in soil and earthworms in western Kosovo after the 1999 war. *Sci Total Environ* **337**, 109-18.

Diamond, G. L., Morrow, P. E., Panner, B. J., Gelein, R. M., and Baggs, R. B. (1989). Reversible uranyl fluoride nephrotoxicity in the Long Evans rat. *Fundam Appl Toxicol* **13**, 65-78.

Diaz Sylvester, P. L., Lopez, R., Ubios, A. M., and Cabrini, R. L. (2002). Exposure to subcutaneously implanted uranium dioxide impairs bone formation. *Arch Environ Health* **57**, 320-5.

Domingo, J. L. (2001). Reproductive and developmental toxicity of natural and depleted uranium: a review. *Reprod Toxicol* **15**, 603-9.

Domingo, J. L., Llobet, J. M., Tomas, J. M., and Corbella, J. (1987). Acute toxicity of uranium in rats and mice. *Bull Environ Contam Toxicol* **39**, 168-74.

Domingo, J. L., Paternain, J. L., Llobet, J. M., and Corbella, J. (1989). The developmental toxicity of uranium in mice. *Toxicology* **55**, 143-52.

Donnadieu-Claraz, M., Bonnehorgne, M., Dhieux, B., Maubert, C., Cheynet, M., Paquet, F., and Gourmelon, P. (2007). Chronic exposure to uranium leads to iron accumulation in rat kidney cells. *Radiat Res* **167**, 454-64.

Dublineau, I., Grison, S., Baudelin, C., Dudoignon, N., Souidi, M., Marquette, C., Paquet, F., Aigueperse, J., and Gourmelon, P. (2005). Absorption of uranium through the entire gastrointestinal tract of the rat. *Int J Radiat Biol* **81**, 473-82.

Dublineau, I., Grison, S., Grandcolas, L., Baudelin, C., Paquet, F., Voisin, P., Aigueperse, J., and Gourmelon, P. (2007). Effects of chronic 137Cs ingestion on barrier properties of jejunal epithelium in rats. *J Toxicol Environ Health A* **70**, 810-9.

Dublineau, I., Grison, S., Linard, C., Baudelin, C., Dudoignon, N., Souidi, M., Marquette, C., Paquet, F., Aigueperse, J., and Gourmelon, P. (2006). Short-term effects of depleted uranium on immune status in rat intestine. *J Toxicol Environ Health A* **69**, 1613-28.

Dumas, R. (1999). [Vitamin D-resistant rickets]. *Arch Pediatr* **6**, 715-9.

Dusso, A., Finch, J., Delmez, J., Rapp, N., Lopez-Hilker, S., Brown, A., and Slatopolsky, E. (1990). Extrarenal production of calcitriol. *Kidney Int Suppl* **29**, S36-40.

Dusso, A. S., Brown, A. J., and Slatopolsky, E. (2005). Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol* **289**, F8-28.

Eloranta, J. J., and Kullak-Ublick, G. A. (2005). Coordinate transcriptional regulation of bile acid homeostasis and drug metabolism. *Arch Biochem Biophys* **433**, 397-412.

Erben, R. G., Soegiarto, D. W., Weber, K., Zeitz, U., Lieberherr, M., Gniadecki, R., Moller, G., Adamski, J., and Balling, R. (2002). Deletion of deoxyribonucleic acid binding domain of the vitamin D receptor abrogates genomic and nongenomic functions of vitamin D. *Mol Endocrinol* **16**, 1524-37.

Farach-Carson, M. C., and Nemere, I. (2003). Membrane receptors for vitamin D steroid hormones: potential new drug targets. *Curr Drug Targets* **4**, 67-76.

Fraser, D. R. (1980). Regulation of the metabolism of vitamin D. *Physiol Rev* **60**, 551-613.

Friedman, P. A., and Gesek, F. A. (1993). Vitamin D3 accelerates PTH-dependent calcium transport in distal convoluted tubule cells. *Am J Physiol* **265**, F300-8.

Fukuda, S., Ikeda, M., Chiba, M., and Kaneko, K. (2006). Clinical diagnostic indicators of renal and bone damage in rats intramuscularly injected with depleted uranium. *Radiat Prot Dosimetry* **118**, 307-14.

Galle, P. (1998). Uranium. *In: Toxiques nucléaires. Masson, Paris* **pp. 186-205**.

Gamache, G. L., Levinson, D. M., Reeves, D. L., Bidyuk, P. I., and Brantley, K. K. (2005). Longitudinal neurocognitive assessments of Ukrainians exposed to ionizing radiation after the Chernobyl nuclear accident. *Arch Clin Neuropsychol* **20**, 81-93.

Gao, X. H., Dwivedi, P. P., Omdahl, J. L., Morris, H. A., and May, B. K. (2004). Calcitonin stimulates expression of the rat 25-hydroxyvitamin D3-24-hydroxylase (CYP24) promoter in HEK-293 cells expressing calcitonin receptor: identification of signaling pathways. *J Mol Endocrinol* **32**, 87-98.

Garabedian, M., Menn, S., Walrant-Debray, O., Teinturier, C., Delaveyne, R., and Roden, A. (2005). [Prevention of child and adolescent vitamin D deficiency. II. Validation of a decision-making abacus based on sun exposure and vitamin D intakes]. *Arch Pediatr* **12**, 410-9.

Garcion, E., Wion-Barbot, N., Montero-Menei, C. N., Berger, F., and Wion, D. (2002). New clues about vitamin D functions in the nervous system. *Trends Endocrinol Metab* **13**, 100-5.

Gill, R. K., and Christakos, S. (1993). Identification of sequence elements in mouse calbindin-D28k gene that confer 1,25-dihydroxyvitamin D3- and butyrate-inducible responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 2984-8.

Gilman, A. P., Villeneuve, D. C., Secours, V. E., Yagminas, A. P., Tracy, B. L., Quinn, J. M., Valli, V. E., and Moss, M. A. (1998a). Uranyl nitrate: 91-day toxicity studies in the New Zealand white rabbit. *Toxicol Sci* **41**, 129-37.

Gilman, A. P., Villeneuve, D. C., Secours, V. E., Yagminas, A. P., Tracy, B. L., Quinn, J. M., Valli, V. E., Willes, R. J., and Moss, M. A. (1998b). Uranyl nitrate: 28-day and 91-day toxicity studies in the Sprague-Dawley rat. *Toxicol Sci* **41**, 117-28.

Glendenning, P., Ratajczak, T., Dick, I. M., and Prince, R. L. (2000). Calcitriol upregulates expression and activity of the 1b isoform of the plasma membrane calcium pump in immortalized distal kidney tubular cells. *Arch Biochem Biophys* **380**, 126-32.

Gray, T. K., Lester, G. E., and Lorenc, R. S. (1979). Evidence for extra-renal 1 alpha-hydroxylation of 25-hydroxyvitamin D3 in pregnancy. *Science* **204**, 1311-3.

Grignard, E., Gueguen, Y., Lobaccaro, J. M., Voisin, P., Gourmelon, P., and Souidi, M. (2007). Effets de contaminations chroniques par ingestion de césium 137 ou d'uranium sur la stéroïdogénèse testiculaire chez le rat. 6ème Congrès National de Radioprotection, Reims, France, du 19 au 21 Juin.

Gueguen, Y., Mouzat, K., Ferrari, L., Tissandie, E., Lobaccaro, J. M., Batt, A. M., Paquet, F., Voisin, P., Aigueperse, J., Gourmelon, P., and Souidi, M. (2006a). [Cytochromes P450: xenobiotic metabolism, regulation and clinical importance]. *Ann Biol Clin (Paris)* **64**, 535-48.

Gueguen, Y., Souidi, M., Baudelin, C., Dudoignon, N., Grison, S., Dublineau, I., Marquette, C., Voisin, P., Gourmelon, P., and Aigueperse, J. (2006b). Short-term hepatic effects of depleted uranium on xenobiotic and bile acid metabolizing cytochrome P450 enzymes in the rat. *Arch Toxicol* **80**, 187-95.

Guglielmotti, M. B., Ubios, A. M., and Cabrini, R. L. (1985). Alveolar wound healing alteration under uranyl nitrate intoxication. *J Oral Pathol* **14**, 565-72.

Gupta, R. P., Hollis, B. W., Patel, S. B., Patrick, K. S., and Bell, N. H. (2004). CYP3A4 is a human microsomal vitamin D 25-hydroxylase. *J Bone Miner Res* **19**, 680-8.

Hager, G., Kornfehl, J., Knerer, B., Weigel, G., and Formanek, M. (2004). Molecular analysis of p21 promoter activity isolated from squamous carcinoma cell lines of the head and neck under the influence of 1,25(OH)2 vitamin D3 and its analogs. *Acta Otolaryngol* **124**, 90-6.

Hakonson-Hayes, A. C., Fresquez, P. R., and Whicker, F. W. (2002). Assessing potential risks from exposure to natural uranium in well water. *J Environ Radioact* **59**, 29-40.

Haley, D. P., Bulger, R. E., and Dobyan, D. C. (1982). The long-term effects of uranyl nitrate on the structure and function of the rat kidney. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* **41**, 181-92.

Handl, J., Beltz, D., Botsch, W., Harb, S., Jakob, D., Michel, R., and Romantschuk, L. D. (2003). Evaluation of radioactive exposure from 137Cs in contaminated areas of Northern Ukraine. *Health Phys* **84**, 502-17.

Hartsock, W. J., Cohen, J. D., and Segal, D. J. (2007). Uranyl acetate as a direct inhibitor of DNA-binding proteins. *Chem Res Toxicol* **20**, 784-9.

Haussler, M. R., Whitfield, G. K., Haussler, C. A., Hsieh, J. C., Thompson, P. D., Selznick, S. H., Dominguez, C. E., and Jurutka, P. W. (1998). The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed. *J Bone Miner Res* **13**, 325-49.

Healy, K. D., Vanhooke, J. L., Prahl, J. M., and DeLuca, H. F. (2005). Parathyroid hormone decreases renal vitamin D receptor expression in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 4724-8.

Henrichs, H., Paretzke, H. G., Voigt, G., and Berg, D. (1989). Measurements of Cs absorption and retention in man. *Health Phys* **57**, 571-8.

Herdick, M., and Carlberg, C. (2000). Agonist-triggered modulation of the activated and silent state of the vitamin D(3) receptor by interaction with co-repressors and co-activators. *J Mol Biol* **304**, 793-801.

Hewison, M., Zehnder, D., Bland, R., and Stewart, P. M. (2000). 1alpha-Hydroxylase and the action of vitamin D. *J Mol Endocrinol* **25**, 141-8.

Hoenderop, J. G., Dardenne, O., Van Abel, M., Van Der Kemp, A. W., Van Os, C. H., St -Arnaud, R., and Bindels, R. J. (2002). Modulation of renal Ca2+ transport protein genes by dietary Ca2+ and 1,25-dihydroxyvitamin D3 in 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase knockout mice. *Faseb J* **16**, 1398-406.

Hoenderop, J. G., Muller, D., Van Der Kemp, A. W., Hartog, A., Suzuki, M., Ishibashi, K., Imai, M., Sweep, F., Willems, P. H., Van Os, C. H., and Bindels, R. J. (2001). Calcitriol controls the epithelial calcium channel in kidney. *J Am Soc Nephrol* **12**, 1342-9.

Holick, M. F. (1995). Noncalcemic actions of 1,25-dihydroxyvitamin D3 and clinical applications. *Bone* **17**, 107S-111S.

Holick, M. F. (2002). vitamin D: the underappreciated D-lightful hormone that is important for skeletal and cellular health. *Curr opin endocriol diabetes* **9**, 87-98.

Holick, M. F. (2004). Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* **80**, 1678S-88S.

Houpert, P., Bizot, J. C., Bussy, C., Dhieux, B., Lestaevel, P., Gourmelon, P., and Paquet, F. (2007). Comparison of the effects of enriched uranium and 137-cesium on the behaviour of rats after chronic exposure. *Int J Radiat Biol* **83**, 99-104.

Houpert, P., Lestaevel, P., Bussy, C., Paquet, F., and Gourmelon, P. (2005). Enriched but not depleted uranium affects central nervous system in long-term exposed rat. *Neurotoxicology* **26**, 1015-20.

Howland, J. W. (1949). Studies on human exposure to uranium compounds. *In: Pharmacology and Toxicology of Uranium. New York* **pp. 993-1017**.

Hsieh, J. C., Dang, H. T., Galligan, M. A., Whitfield, G. K., Haussler, C. A., Jurutka, P. W., and Haussler, M. R. (2004). Phosphorylation of human vitamin D receptor serine-182 by PKA suppresses 1,25(OH)2D3-dependent transactivation. *Biochem Biophys Res Commun* **324**, 801-9.

Hsieh, J. C., Jurutka, P. W., Nakajima, S., Galligan, M. A., Haussler, C. A., Shimizu, Y., Shimizu, N., Whitfield, G. K., and Haussler, M. R. (1993). Phosphorylation of the human vitamin D receptor by protein kinase C. Biochemical and functional evaluation of the serine 51 recognition site. *J Biol Chem* **268**, 15118-26.

Hsieh, J. C., Shimizu, Y., Minoshima, S., Shimizu, N., Haussler, C. A., Jurutka, P. W., and Haussler, M. R. (1998). Novel nuclear localization signal between the two DNA-binding zinc fingers in the human vitamin D receptor. *J Cell Biochem* **70**, 94-109.

Hughes, M. R., Brumbaugh, P. F., Hussler, M. R., Wergedal, J. E., and Baylink, D. J. (1975). Regulation of serum 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 by calcium and phosphate in the rat. *Science* **190**, 578-80.

IRSN (2007). Rayonnements ionisants et santé. *site internet de l'IRSN http://www.irsn.fr/document/files/file/librairie/collection_professionnels/rayonnements_ionisants.pdf* consulté le 20/07/07.

Johansson, L., Björeland, A., and Agren, G. (1998). Tranfer of 137Cs to infants via human breast milk. *Radiat Prot Dosimetry* **79**, 165-67.

Juntunen, R. (1991). Etela-Suomen Kallioporakaivojen uraani-ja radon-tukimukeset (Uranium and radon in wells drilled into bedrock in southern Finland). *Report of investigation 98. Espoo: Geologian Tutkimuskimusteskus*.

Jurutka, P. W., Hsieh, J. C., Nakajima, S., Haussler, C. A., Whitfield, G. K., and Haussler, M. R. (1996). Human vitamin D receptor phosphorylation by casein kinase II at Ser-208 potentiates transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 3519-24.

Kato, S., Yoshizazawa, T., Kitanaka, S., Murayama, A., and Takeyama, K. (2002). Molecular genetics of vitamin D- dependent hereditary rickets. *Horm Res* **57**, 73-8.

Kersten, S., Dong, D., Lee, W., Reczek, P. R., and Noy, N. (1998). Auto-silencing by the retinoid X receptor. *J Mol Biol* **284**, 21-32.

Kharchenko, V. P., Rassokhin, B. M., and Zubovskii, G. A. (2001). [Value of bone densitometry in the determination of vertebral mineral density in participants of the clean-up after Chernobyl accident]. *Med Tr Prom Ekol*, 29-32.

Kim, M. S., Fujiki, R., Murayama, A., Kitagawa, H., Yamaoka, K., Yamamoto, Y., Mihara, M., Takeyama, K., and Kato, S. (2007). 1Alpha,25(OH)2D3-induced transrepression by vitamin D

receptor through E-box-type elements in the human parathyroid hormone gene promoter. *Mol Endocrinol* **21**, 334-42.

Kitazawa, S., Kajimoto, K., Kondo, T., and Kitazawa, R. (2003). Vitamin D3 supports osteoclastogenesis via functional vitamin D response element of human RANKL gene promoter. *J Cell Biochem* **89**, 771-7.

Kobayashi, S., Nagase, M., Honda, N., and Hishida, A. (1984). Glomerular alterations in uranyl acetate-induced acute renal failure in rabbits. *Kidney Int* **26**, 808-15.

Korashy, H. M., and El-Kadi, A. O. (2005). Regulatory mechanisms modulating the expression of cytochrome P450 1A1 gene by heavy metals. *Toxicol Sci* **88**, 39-51.

Kraenzlin, M. (2003). Ostéomalacie. *Forum Med Suisse* **N°32/33**, 754-763.

Kroncke, K. D., Klotz, L. O., Suschek, C. V., and Sies, H. (2002). Comparing nitrosative versus oxidative stress toward zinc finger-dependent transcription. Unique role for NO. *J Biol Chem* **277**, 13294-301.

Kurttio, P., Auvinen, A., Salonen, L., Saha, H., Pekkanen, J., Makelainen, I., Vaisanen, S. B., Penttila, I. M., and Komulainen, H. (2002). Renal effects of uranium in drinking water. *Environ Health Perspect* **110**, 337-42.

Kurttio, P., Komulainen, H., Leino, A., Salonen, L., Auvinen, A., and Saha, H. (2005). Bone as a possible target of chemical toxicity of natural uranium in drinking water. *Environ Health Perspect* **113**, 68-72.

La Touche, Y. D., Willis, D. L., and Dawydiak, O. I. (1987). Absorption and biokinetics of U in rats following an oral administration of uranyl nitrate solution. *Health Phys* **53**, 147-62.

Lazjuk, G. I., Nikolaev, D. L., and Novikova, I. V. (1997). Changes in registered congenital anomalies in the Republic of Belarus after the Chernobyl accident. *Stem Cells* **15 Suppl 2**, 255-60.

Leggett, R. W. (1989). The behavior and chemical toxicity of U in the kidney: a reassessment. *Health Phys* **57**, 365-83.

Leggett, R. W. (1994). Basis for the ICRP's age-specific biokinetic model for uranium. *Health Phys* **67**, 589-610.

Leggett, R. W., and Harrison, J. D. (1995). Fractional absorption of ingested uranium in humans. *Health Phys* **68**, 484-98.

Leggett, R. W., and Pellmar, T. C. (2003). The biokinetics of uranium migrating from embedded DU fragments. *J Environ Radioact* **64**, 205-25.

Leggett, R. W., Williams, L. R., Melo, D. R., and Lipsztein, J. L. (2003). A physiologically based biokinetic model for cesium in the human body. *Sci Total Environ* **317**, 235-55.

Leheste, J. R., Melsen, F., Wellner, M., Jansen, P., Schlichting, U., Renner-Muller, I., Andreassen, T. T., Wolf, E., Bachmann, S., Nykjaer, A., and Willnow, T. E. (2003). Hypocalcemia and osteopathy in mice with kidney-specific megalin gene defect. *Faseb J* **17**, 247-9.

Lehmann, B., Tiebel, O., and Meurer, M. (1999). Expression of vitamin D3 25-hydroxylase (CYP27) mRNA after induction by vitamin D3 or UVB radiation in keratinocytes of human skin equivalents--a preliminary study. *Arch Dermatol Res* **291**, 507-10.

Lemercier, V., Millot, X., Ansoborlo, E., Menetrier, F., Flury-Herard, A., Rousselle, C., and Scherrmann, J. M. (2003). Study of uranium transfer across the blood-brain barrier. *Radiat Prot Dosimetry* **105**, 243-5.

Lestaevel, P., Bussy, C., Paquet, F., Dhieux, B., Clarencon, D., Houpert, P., and Gourmelon, P. (2005a). Changes in sleep-wake cycle after chronic exposure to uranium in rats. *Neurotoxicol Teratol* **27**, 835-40.

Lestaevel, P., Dhieux, B., Tourlonias, E., Houpert, P., Paquet, F., Voisin, P., Aigueperse, J., and Gourmelon, P. (2006). Evaluation of the effect of chronic exposure to 137Cesium on sleep-wake cycle in rats. *Toxicology* **226**, 118-25.

Lestaevel, P., Houpert, P., Bussy, C., Dhieux, B., Gourmelon, P., and Paquet, F. (2005b). The brain is a target organ after acute exposure to depleted uranium. *Toxicology* **212**, 219-26.

Lestaevel, P., Romero, E., Ben Soussan, H., Voisin, P., and Gourmelon, P. (2007). Le stress oxydant: un mécanisme pour expliquer la physiopathologie cérébrale induite par une ingestion chronique d'uranium? 8ème Colloque international de radiobiologie fondamentale et appliquée, La Londe les Maures, France, du 16 au 21 Septembre.

Li, P., Li, C., Zhao, X., Zhang, X., Nicosia, S. V., and Bai, W. (2004). p27(Kip1) stabilization and G(1) arrest by 1,25-dihydroxyvitamin D(3) in ovarian cancer cells mediated through down-regulation of cyclin E/cyclin-dependent kinase 2 and Skp1-Cullin-F-box protein/Skp2 ubiquitin ligase. *J Biol Chem* **279**, 25260-7.

Lian, J. B., Stein, J. L., Stein, G. S., Montecino, M., van Wijnen, A. J., Javed, A., and Gutierrez, S. (2001). Contributions of nuclear architecture and chromatin to vitamin D-dependent transcriptional control of the rat osteocalcin gene. *Steroids* **66**, 159-70.

Liel, Y., Shany, S., Smirnoff, P., and Schwartz, B. (1999). Estrogen increases 1,25-dihydroxyvitamin D receptors expression and bioresponse in the rat duodenal mucosa. *Endocrinology* **140**, 280-5.

Likhtarov, I., Kovgan, L., Vavilov, S., Chepurny, M., Bouville, A., Luckyanov, N., Jacob, P., Voilleque, P., and Voigt, G. (2005). Post-Chornobyl thyroid cancers in Ukraine. Report 1: estimation of thyroid doses. *Radiat Res* **163**, 125-36.

Linares, V., Sanchez, D. J., Belles, M., Albina, L., Gomez, M., and Domingo, J. L. (2007). Pro-oxidant effects in the brain of rats concurrently exposed to uranium and stress. *Toxicology* **236**, 82-91.

Llobet, J. M., Sirvent, J. J., Ortega, A., and Domingo, J. L. (1991). Influence of chronic exposure to uranium on male reproduction in mice. *Fundam Appl Toxicol* **16**, 821-9.

MacDonald, P. N., Baudino, T. A., Tokumaru, H., Dowd, D. R., and Zhang, C. (2001). Vitamin D receptor and nuclear receptor coactivators: crucial interactions in vitamin D-mediated transcription. *Steroids* **66**, 171-6.

MacKenzie, A. B. (2000). Environmental radioactivity: experience from the 20th century--trends and issues for the 21st century. *Sci Total Environ* **249**, 313-29.

Madic, C., and Genet, M. (2001). Propriétés physiques et chimiques de l'uranium. *In: L'Uranium de l'environnement à l'Homme. EDP Sciences, Paris* **pp. 43-81**.

Mao, Y., Desmeules, M., Schaubel, D., Berube, D., Dyck, R., Brule, D., and Thomas, B. (1995). Inorganic components of drinking water and microalbuminuria. *Environ Res* **71**, 135-40.

Masuyama, H., Brownfield, C. M., St-Arnaud, R., and MacDonald, P. N. (1997). Evidence for ligand-dependent intramolecular folding of the AF-2 domain in vitamin D receptor-activated transcription and coactivator interaction. *Mol Endocrinol* **11**, 1507-17.

Maugars, Y., Glémarec, J., Guillot, P., Rodet, D., Berthelot, J. M., and Prost, A. (2000). Métabolisme phosphocalcique et ostéomalacie. *Rev Rhum* **67**, 95-8.

McDiarmid, M. A., Keogh, J. P., Hooper, F. J., McPhaul, K., Squibb, K., Kane, R., DiPino, R., Kabat, M., Kaup, B., Anderson, L., Hoover, D., Brown, L., Hamilton, M., Jacobson-Kram, D., Burrows, B., and Walsh, M. (2000). Health effects of depleted uranium on exposed Gulf War veterans. *Environ Res* **82**, 168-80.

Mel'nichenko, E. M., Kushner, A. N., Zafranskaia, M. M., and Miliutin, A. A. (1999). [The immunoglobulin content in the saliva of children living under different radioecological conditions]. *Stomatologiia (Mosk)* **78**, 12-4.

Messiha, F. S. (1988). Maternal cesium chloride ingestion and the newborn. *Neurosci Biobehav Rev* **12**, 209-13.

Métivier, H., and Lorthioir, S. (2000). Propriétés physiques et chimiques du césium. *In: Le Césium de l'environnement à l'homme. EDP Sciences, Paris* **pp. 3-13**.

Miller, A. C., Blakely, W. F., Livengood, D., Whittaker, T., Xu, J., Ejnik, J. W., Hamilton, M. M., Parlette, E., John, T. S., Gerstenberg, H. M., and Hsu, H. (1998). Transformation of human osteoblast cells to the tumorigenic phenotype by depleted uranium-uranyl chloride. *Environ Health Perspect* **106**, 465-71.

Miller, A. C., Xu, J., Stewart, M., Prasanna, P. G., and Page, N. (2002). Potential late health effects of depleted uranium and tungsten used in armor-piercing munitions: comparison of neoplastic transformation and genotoxicity with the known carcinogen nickel. *Mil Med* **167**, 120-2.

Moon, Y. J., Lee, A. K., Chung, H. C., Kim, E. J., Kim, S. H., Lee, D. C., Lee, I., Kim, S. G., and Lee, M. G. (2003). Effects of acute renal failure on the pharmacokinetics of chlorzoxazone in rats. *Drug Metab Dispos* **31**, 776-84.

Moreau, A., Maurel, P., Vilarem, M. J., and Pascussi, J. M. (2007). Constitutive androstane receptor-vitamin D receptor crosstalk: consequence on CYP24 gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* **360**, 76-82.

Moss, M. (1983). Uranium in drinking water-report on clinical studies in Nova-Scotia. *In: Chemical toxicology and clinical chemistry of metals. Academic Press, London* **pp. 149-152**.

Murayama, A., Kim, M. S., Yanagisawa, J., Takeyama, K., and Kato, S. (2004). Transrepression by a liganded nuclear receptor via a bHLH activator through co-regulator switching. *Embo J* **23**, 1598-608.

Nagai, F., Kato, E., and Tamura, H. O. (2004). Oxidative stress induces GSTP1 and CYP3A4 expression in the human erythroleukemia cell line, K562. *Biol Pharm Bull* **27**, 492-5.

Nenciu, A., and Delorme, S. (2005). Quand devrait-on donner la vitamine D sous sa forme active lors d'insuffisance rénale chronique? *Pharmactuel* **38**, 89-91.

Nesbitt, T., and Drezner, M. K. (1993). Insulin-like growth factor-I regulation of renal 25-hydroxyvitamin D-1-hydroxylase activity. *Endocrinology* **132**, 133-8.

Nesterenko, V. B., Nesterenko, A. V., Babenko, V. I., Yerkovich, T. V., and Babenko, I. V. (2004). Reducing the 137Cs-load in the organism of "Chernobyl" children with apple-pectin. *Swiss Med Wkly* **134**, 24-7.

Neveu, I., Naveilhan, P., Baudet, C., Brachet, P., and Metsis, M. (1994). 1,25-dihydroxyvitamin D3 regulates NT-3, NT-4 but not BDNF mRNA in astrocytes. *Neuroreport* **6**, 124-6.

Nguyen, T. M., Lieberherr, M., Fritsch, J., Guillozo, H., Alvarez, M. L., Fitouri, Z., Jehan, F., and Garabedian, M. (2004). The rapid effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 require the vitamin D receptor and influence 24-hydroxylase activity: studies in human skin fibroblasts bearing vitamin D receptor mutations. *J Biol Chem* **279**, 7591-7.

Nikula, K. J., Muggenburg, B. A., Chang, I. Y., Griffith, W. C., Hahn, F. F., and Boecker, B. B. (1995). Biological effects of 137CsCl injected in beagle dogs. *Radiat Res* **142**, 347-61.

Nishikawa, J., Kitaura, M., Imagawa, M., and Nishihara, T. (1995). Vitamin D receptor contains multiple dimerization interfaces that are functionally different. *Nucleic Acids Res* **23**, 606-11.

Nishio, k., Megumi, t., and Yonezawa, M. (1968). Effects of 137Cs and 90Sr administered continuously and through generations upon mice (VI). Annual report of the Radiation Center of Osaka Prefecture, Vol 9, Sakai, Osaka. pp. 86-93.

Noda, M., Vogel, R. L., Craig, A. M., Prahl, J., DeLuca, H. F., and Denhardt, D. T. (1990). Identification of a DNA sequence responsible for binding of the 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor and 1,25-dihydroxyvitamin D3 enhancement of mouse secreted phosphoprotein 1 (SPP-1 or osteopontin) gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 9995-9.

Noreault, T. L., Jacobs, J. M., Nichols, R. C., Trask, H. W., Wrighton, S. A., Sinclair, P. R., Evans, R. M., and Sinclair, J. F. (2005a). Arsenite decreases CYP3A23 induction in cultured rat hepatocytes by transcriptional and translational mechanisms. *Toxicol Appl Pharmacol* **209**, 174-82.

Noreault, T. L., Kostrubsky, V. E., Wood, S. G., Nichols, R. C., Strom, S. C., Trask, H. W., Wrighton, S. A., Evans, R. M., Jacobs, J. M., Sinclair, P. R., and Sinclair, J. F. (2005b). Arsenite decreases CYP3A4 and RXRalpha in primary human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* **33**, 993-1003.

Norman, A. W. (2006). Minireview: vitamin D receptor: new assignments for an already busy receptor. *Endocrinology* **147**, 5542-8.

Norman, A. W., Okamura, W. H., Bishop, J. E., and Henry, H. L. (2002). Update on biological actions of 1alpha,25(OH)2-vitamin D3 (rapid effects) and 24R,25(OH)2-vitamin D3. *Mol Cell Endocrinol* **197**, 1-13.

Nykjaer, A., Dragun, D., Walther, D., Vorum, H., Jacobsen, C., Herz, J., Melsen, F., Christensen, E. I., and Willnow, T. E. (1999). An endocytic pathway essential for renal uptake and activation of the steroid 25-(OH) vitamin D3. *Cell* **96**, 507-15.

Nykjaer, A., Fyfe, J. C., Kozyraki, R., Leheste, J. R., Jacobsen, C., Nielsen, M. S., Verroust, P. J., Aminoff, M., de la Chapelle, A., Moestrup, S. K., Ray, R., Gliemann, J., Willnow, T. E., and Christensen, E. I. (2001). Cubilin dysfunction causes abnormal metabolism of the steroid hormone 25(OH) vitamin D(3). *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 13895-900.

Omdahl, J. L., and DeLuca, H. F. (1972). Rachitogenic activity of dietary strontium. I. Inhibition of intestinal calcium absorption and 1,25-dihydroxycholecalciferol synthesis. *J Biol Chem* **247**, 5520-6.

Ortega, A., Domingo, J. L., Llobet, J. M., Tomas, J. M., and Paternain, J. L. (1989). Evaluation of the oral toxicity of uranium in a 4-week drinking-water study in rats. *Bull Environ Contam Toxicol* **42**, 935-41.

Paquet, F., Houpert, P., Blanchardon, E., Delissen, O., Maubert, C., Dhieux, B., Moreels, A. M., Frelon, S., and Gourmelon, P. (2006). Accumulation and distribution of uranium in rats after chronic exposure by ingestion. *Health Phys* **90**, 139-47.

Pasanen, M., Lang, S., Kojo, A., and Kosma, V. M. (1995). Effects of simulated nuclear fuel particles on the histopathology and CYP enzymes in the rat lung and liver. *Environ Res* **70**, 126-33.

Pascussi, J. M., Robert, A., Nguyen, M., Walrant-Debray, O., Garabedian, M., Martin, P., Pineau, T., Saric, J., Navarro, F., Maurel, P., and Vilarem, M. J. (2005). Possible involvement of pregnane X receptor-enhanced CYP24 expression in drug-induced osteomalacia. *J Clin Invest* **115**, 177-86.

Paternain, J. L., Domingo, J. L., Ortega, A., and Llobet, J. M. (1989). The effects of uranium on reproduction, gestation, and postnatal survival in mice. *Ecotoxicol Environ Saf* **17**, 291-6.

Paulin, R., and Siles, S. (1998). Césium. *In: Toxiques nucléaires. Masson, Paris* **pp. 83-104**.

Pellmar, T. C., Fuciarelli, A. F., Ejnik, J. W., Hamilton, M., Hogan, J., Strocko, S., Emond, C., Mottaz, H. M., and Landauer, M. R. (1999a). Distribution of uranium in rats implanted with depleted uranium pellets. *Toxicol Sci* **49**, 29-39.

Pellmar, T. C., Hogan, J. B., Benson, K. A., and Laudauer, M. R. (1998). Toxicological Evaluation of Depleted Uranium in Rats: Six-Month Evaluation Point. In: AFRRI Special Publication 98-1. *Armed forces Radiobology Research Institute, Bethesda*.

Pellmar, T. C., Keyser, D. O., Emery, C., and Hogan, J. B. (1999b). Electrophysiological changes in hippocampal slices isolated from rats embedded with depleted uranium fragments. *Neurotoxicology* **20**, 785-92.

Peterlik, M., and Cross, H. S. (2005). Vitamin D and calcium deficits predispose for multiple chronic diseases. *Eur J Clin Invest* **35**, 290-304.

Pike, J. W., Spanos, E., Colston, K. W., MacIntyre, I., and Haussler, M. R. (1978). Influence of estrogen on renal vitamin D hydroxylases and serum 1alpha,25-(OH)2D3 in chicks. *Am J Physiol* **235**, E338-43.

Polly, P., Herdick, M., Moehren, U., Baniahmad, A., Heinzel, T., and Carlberg, C. (2000). VDR-Alien: a novel, DNA-selective vitamin D(3) receptor-corepressor partnership. *Faseb J* **14**, 1455-63.

Post, S. M., Duez, H., Gervois, P. P., Staels, B., Kuipers, F., and Princen, H. M. (2001). Fibrates suppress bile acid synthesis via peroxisome proliferator-activated receptor-alpha-mediated downregulation of cholesterol 7alpha-hydroxylase and sterol 27-hydroxylase expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **21**, 1840-5.

Priest, N. D. (2001). Toxicity of depleted uranium. *Lancet* **357**, 244-6.

Priest, N. D., Howells, G. R., Green, D., and Haines, J. W. (1982). Uranium in bone: metabolic and autoradiographic studies in the rat. *Hum Toxicol* **1**, 97-114.

Quinn, C. M., Jessup, W., Wong, J., Kritharides, L., and Brown, A. J. (2005). Expression and regulation of sterol 27-hydroxylase (CYP27A1) in human macrophages: a role for RXR and PPARgamma ligands. *Biochem J* **385**, 823-30.

Raaf, C. L., Falk, R., Thornberg, C., Zakaria, M., and Mattsson, S. (2004). Human metabolism of radiocaesium revisited. *Radiat Prot Dosimetry* **112**, 395-404.

Racine, R., Gueguen, Y., Veyssières, G., Grandcolas, L., Grison, S., Aiguerperse, J., and Souidi, M. (2007). Gene expression of cholesterol-metabolizing CYPs after chronic ingestion of 137 Cesium.international proceeding, 15th International Conference on Cytochromes P450-Biophysics and Functional Genomics, Bled, Slovenia, June 17-21. **pp. 123-128**.

Racz, A., and Barsony, J. (1999). Hormone-dependent translocation of vitamin D receptors is linked to transactivation. *J Biol Chem* **274**, 19352-60.

Rao, Y. P., Vlahcevic, Z. R., Stravitz, R. T., Mallonee, D. H., Mullick, J., Avadhani, N. G., and Hylemon, P. B. (1999). Down-regulation of the rat hepatic sterol 27-hydroxylase gene by bile acids in transfected primary hepatocytes: possible role of hepatic nuclear factor 1alpha. *J Steroid Biochem Mol Biol* **70**, 1-14.

Reginster, J. Y. (2005). The high prevalence of inadequate serum vitamin D levels and implications for bone health. *Curr Med Res Opin* **21**, 579-86.

Rezende, V. B., Barbosa, F., Jr., Montenegro, M. F., Sandrim, V. C., Gerlach, R. F., and Tanus-Santos, J. E. (2007). Haplotypes of vitamin D receptor modulate the circulating levels of lead in exposed subjects. *Arch Toxicol*.

Rochel, N., Wurtz, J. M., Mitschler, A., Klaholz, B., and Moras, D. (2000). The crystal structure of the nuclear receptor for vitamin D bound to its natural ligand. *Mol Cell* **5**, 173-9.

Romanenko, A., Morell-Quadreny, L., Nepomnyaschy, V., Vozianov, A., and Llombart-Bosch, A. (2000a). Pathology and proliferative activity of renal-cell carcinomas (RCCS) and renal oncocytomas in patients with different radiation exposure after the Chernobyl accident in Ukraine. *Int J Cancer* **87**, 880-3.

Romanenko, A., Morimura, K., Wanibuchi, H., Salim, E. I., Kinoshita, A., Kaneko, M., Vozianov, A., and Fukushima, S. (2000b). Increased oxidative stress with gene alteration in urinary bladder urothelium after the Chernobyl accident. *Int J Cancer* **86**, 790-8.

Romanenko, A., Morimura, K., Wanibuchi, H., Wei, M., Zaparin, W., Vinnichenko, W., Kinoshita, A., Vozianov, A., and Fukushima, S. (2003). Urinary bladder lesions induced by persistent chronic low-dose ionizing radiation. *Cancer Sci* **94**, 328-33.

Rosen, H., Reshef, A., Maeda, N., Lippoldt, A., Shpizen, S., Triger, L., Eggertsen, G., Bjorkhem, I., and Leitersdorf, E. (1998). Markedly reduced bile acid synthesis but maintained levels of cholesterol and vitamin D metabolites in mice with disrupted sterol 27-hydroxylase gene. *J Biol Chem* **273**, 14805-12.

Rosen, J. F., Chesney, R. W., Hamstra, A., DeLuca, H. F., and Mahaffey, K. R. (1980). Reduction in 1,25-dihydroxyvitamin D in children with increased lead absorption. *N Engl J Med* **302**, 1128-31.

Rozhinskaia, L., Marova, E. I., Rassokhin, B. M., Purtova, G. S., Bukhman, A. I., Oganov, V. S., Rakhmanov, A. S., Bakulin, A. V., Rodionova, S. S., and Mishchenko, B. P. (1994). [Osteopenic syndrome in liquidators of the aftereffects of the accident at the Chernobyl power plant]. *Probl Endokrinol (Mosk)* **40**, 24-7.

Sanchez, B., Lopez-Martin, E., Segura, C., Labandeira-Garcia, J. L., and Perez-Fernandez, R. (2002). 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) increases striatal GDNF mRNA and protein expression in adult rats. *Brain Res Mol Brain Res* **108**, 143-6.

Saueia, C. H., and Mazzilli, B. P. (2006). Distribution of natural radionuclides in the production and use of phosphate fertilizers in Brazil. *J Environ Radioact* **89**, 229-39.

Shawky, S. (2002). Depleted uranium: an overview of its properties and health effects. *East Mediterr Health J* **8**, 432-9.

Shevchenko, A. S., Kobialko, V. O., Shevchenko, T. S., Lazarev, N. M., Astasheva, N. P., and Aleksakhin, R. M. (1993). [Modification of Ca2+ metabolism in the blood cells of cattle with radiation-induced thyroid disorder after the Chernobyl nuclear power plant accident]. *Radiats Biol Radioecol* **33**, 775-82.

Shimada, T., Hasegawa, H., Yamazaki, Y., Muto, T., Hino, R., Takeuchi, Y., Fujita, T., Nakahara, K., Fukumoto, S., and Yamashita, T. (2004). FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis. *J Bone Miner Res* **19**, 429-35.

Shinki, T., Ueno, Y., DeLuca, H. F., and Suda, T. (1999). Calcitonin is a major regulator for the expression of renal 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase gene in normocalcemic rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 8253-8.

Shkala, L. V. (1998). [Metabolic disorders in digestive and hepatobiliary pathology in those who worked in the cleanup of the aftermath of the accident at the Chernobyl Atomic Electric Power Station]. *Lik Sprava*, 42-5.

Skuterud, L., Pedersen, O., Staaland, H., Roed, K. H., Salbu, B., Liken, A., and Hove, K. (2004). Absorption, retention and tissue distribution of radiocaesium in reindeer: effects of diet and radiocaesium source. *Radiat Environ Biophys* **43**, 293-301.

Slater, S. J., Kelly, M. B., Taddeo, F. J., Larkin, J. D., Yeager, M. D., McLane, J. A., Ho, C., and Stubbs, C. D. (1995). Direct activation of protein kinase C by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3. *J Biol Chem* **270**, 6639-43.

Souberbielle, J. C., Friedlander, G., Kahan, A., and Cormier, C. (2006). Evaluating vitamin D status. Implications for preventing and managing osteoporosis and other chronic diseases. *Joint Bone Spine* **73**, 249-53.

Souidi, M., Dubrac, S., Parquet, M., and Lutton, C. (2003). [Hepatic and extrahepatic sterol 27-hydroxylase: roles in cholesterol and bile acid metabolism and associated diseases]. *Gastroenterol Clin Biol* **27**, 100-11.

Souidi, M., Gueguen, Y., Linard, C., Dudoignon, N., Grison, S., Baudelin, C., Marquette, C., Gourmelon, P., Aigueperse, J., and Dublineau, I. (2005). In vivo effects of chronic contamination with depleted uranium on CYP3A and associated nuclear receptors PXR and CAR in the rat. *Toxicology* **214**, 113-22.

Souidi, M., Tissandie, E., Grandcolas, L., Grison, S., Paquet, F., Voisin, P., Aigueperse, J., Gourmelon, P., and Gueguen, Y. (2006). Chronic contamination with 137cesium in rat: effect on liver cholesterol metabolism. *Int J Toxicol* **25**, 493-7.

St-Arnaud, R. (1999). Targeted inactivation of vitamin D hydroxylases in mice. *Bone* **25**, 127-9.

St-Arnaud, R., Dardenne, O., and Glorieux, F. H. (2001). Etiologie moléculaire des rachitisme vitamino-dépendants héréditaires. *Med Sci* **17**, 1289-96.

St-Arnaud, R., and Glorieux, F. H. (1998). 24,25-Dihydroxyvitamin D--active metabolite or inactive catabolite? *Endocrinology* **139**, 3371-4.

Stefanovic, V., Ivic, M. A., and Strahinjic, S. (1987). Calcium and phosphate metabolism in uranyl nitrate-induced acute renal failure. *Arch Int Physiol Biochim* **95**, 223-8.

Stojadinovic, S., and Jovanovic, M. (1966). Activity of transaminases in the rat serum after internal contamination with 137Cs and 90Sr. *Strahlentherapie* **131**, 633-6.

Sullivan, M. F. (1980). Absorption of actinide elements from the gastrointestinal tract of neonatal animals. *Health Phys* **38**, 173-85.

Sullivan, M. F., Ruemmler, P. S., Ryan, J. L., and Buschbom, R. L. (1986). Influence of oxidizing or reducing agents on gastrointestinal absorption of U, Pu, Am, Cm and Pm by rats. *Health Phys* **50**, 223-32.

Sumner, D. (2007). Health effects resulting from the Chernobyl accident. *Med Confl Surviv* **23**, 31-45.

Takatsuji, T., Sato, H., Takada, J., Endo, S., Hoshi, M., Sharifov, V. F., Veselkina, II, Pilenko, I. V., Kalimullin, W. A., Masyakin, V. B., Kovalev, A. I., Yoshikawa, I., and Okajima, S. (2000). Relationship between the 137Cs whole-body counting results and soil and food contamination in farms near Chernobyl. *Health Phys* **78**, 86-9.

Takemoto, F., Shinki, T., Yokoyama, K., Inokami, T., Hara, S., Yamada, A., Kurokawa, K., and Uchida, S. (2003). Gene expression of vitamin D hydroxylase and megalin in the remnant kidney of nephrectomized rats. *Kidney Int* **64**, 414-20.

Takeshita, A., Ozawa, Y., and Chin, W. W. (2000). Nuclear receptor coactivators facilitate vitamin D receptor homodimer action on direct repeat hormone response elements. *Endocrinology* **141**, 1281-4.

Taulan, M., Paquet, F., Maubert, C., Delissen, O., Demaille, J., and Romey, M. C. (2004). Renal toxicogenomic response to chronic uranyl nitrate insult in mice. *Environ Health Perspect* **112**, 1628-35.

Theodoropoulos, C., Demers, C., Petit, J. L., and Gascon-Barre, M. (2003). High sensitivity of rat hepatic vitamin D3-25 hydroxylase CYP27A to 1,25-dihydroxyvitamin D3 administration. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **284**, E138-47.

Thiebault, C., Carriere, M., Milgram, S., Simon, A., Avoscan, L., and Gouget, B. (2007). Uranium Induces Apoptosis and Is Genotoxic to Normal Rat Kidney (NRK-52E) Proximal Cells. *Toxicol Sci* **98**, 479-87.

Thomas, R. G., and Thomas, R. L. (1970). Lethality of 137Cs and 90Sr administered in combination to rats. *Radiat Res* **42**, 282-91.

Titov, L. P., Kharitonic, G. D., Gourmanchuk, I. E., and Ignatenko, S. I. (1995). Effects of radiation on the production of immunoglobulins in children subsequent to the Chernobyl disaster. *Allergy Proc* **16**, 185-93.

Tsujikawa, H., Kurotaki, Y., Fujimori, T., Fukuda, K., and Nabeshima, Y. (2003). Klotho, a gene related to a syndrome resembling human premature aging, functions in a negative regulatory circuit of vitamin D endocrine system. *Mol Endocrinol* **17**, 2393-403.

Ubios, A. M., Guglielmotti, M. B., Steimetz, T., and Cabrini, R. L. (1991). Uranium inhibits bone formation in physiologic alveolar bone modeling and remodeling. *Environ Res* **54**, 17-23.

van Etten, E., and Mathieu, C. (2005). Immunoregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3: basic concepts. *J Steroid Biochem Mol Biol* **97**, 93-101.

Veenstra, T. D., Benson, L. M., Craig, T. A., Tomlinson, A. J., Kumar, R., and Naylor, S. (1998). Metal mediated sterol receptor-DNA complex association and dissociation determined by electrospray ionization mass spectrometry. *Nat Biotechnol* **16**, 262-6.

Vidal, M., Ramana, C. V., and Dusso, A. S. (2002). Stat1-vitamin D receptor interactions antagonize 1,25-dihydroxyvitamin D transcriptional activity and enhance stat1-mediated transcription. *Mol Cell Biol* **22**, 2777-87.

Wagner, N., Wagner, K. D., Schley, G., Badiali, L., Theres, H., and Scholz, H. (2003). 1,25-dihydroxyvitamin D3-induced apoptosis of retinoblastoma cells is associated with reciprocal changes of Bcl-2 and bax. *Exp Eye Res* **77**, 1-9.

Walters, M. R., Hunziker, W., and Norman, A. W. (1980). Unoccupied 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptors. Nuclear/cytosol ratio depends on ionic strength. *J Biol Chem* **255**, 6799-805.

White, P., and Cooke, N. (2000). The multifunctional properties and characteristics of vitamin D-binding protein. *Trends Endocrinol Metab* **11**, 320-7.

WHO (2001). Depleted Uranium: Sources, Exposure and Health Effects. World Health Organization, Geneva: Department of Protection of the Human Environnment; 2001. *Full Report. In WHO* **(WHO/SDE/PHE/01.1)**.

Wongsurawat, N., and Armbrecht, H. J. (1985). Insulin modulates the stimulation of renal 1,25-dihydroxyvitamin D3 production by parathyroid hormone. *Acta Endocrinol (Copenh)* **109**, 243-8.

Wrenn, M. E., Durbin, P. W., Howard, B., Lipsztein, J., Rundo, J., Still, E. T., and Willis, D. L. (1985). Metabolism of ingested U and Ra. *Health Phys* **48**, 601-33.

Wu, S., Finch, J., Zhong, M., Slatopolsky, E., Grieff, M., and Brown, A. J. (1996). Expression of the renal 25-hydroxyvitamin D-24-hydroxylase gene: regulation by dietary phosphate. *Am J Physiol* **271**, F203-8.

Xu, H., Bai, L., Collins, J. F., and Ghishan, F. K. (2002). Age-dependent regulation of rat intestinal type IIb sodium-phosphate cotransporter by 1,25-(OH)(2) vitamin D(3). *Am J Physiol Cell Physiol* **282**, C487-93.

Xu Y., Hashizume T., Shuhart M.C., Davis C.L., Nelson W.L., Sakaki T., Kalhorn T.F., Watkins P.B., Schuetz E.G., Thummel K.E. (2006). Intestinal and hepatic CYP3A4 catalyze hydroxylation of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3): implications for drug-induced osteomalacia. *Mol Pharmacol*. **69**(1):56-65.

Yagci, A., Werner, A., Murer, H., and Biber, J. (1992). Effect of rabbit duodenal mRNA on phosphate transport in Xenopus laevis oocytes: dependence on 1,25-dihydroxy-vitamin-D3. *Pflugers Arch* **422**, 211-6.

Yamasaki, T., Izumi, S., Ide, H., and Ohyama, Y. (2004). Identification of a novel rat microsomal vitamin D3 25-hydroxylase. *J Biol Chem* **279**, 22848-56.

Zamora, M. L., Tracy, B. L., Zielinski, J. M., Meyerhof, D. P., and Moss, M. A. (1998). Chronic ingestion of uranium in drinking water: a study of kidney bioeffects in humans. *Toxicol Sci* **43**, 68-77.

Zehnder, D., Bland, R., Chana, R. S., Wheeler, D. C., Howie, A. J., Williams, M. C., Stewart, P. M., and Hewison, M. (2002). Synthesis of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) by human endothelial cells is regulated by inflammatory cytokines: a novel autocrine determinant of vascular cell adhesion. *J Am Soc Nephrol* **13**, 621-9.

Zehnder, D., Bland, R., Walker, E. A., Bradwell, A. R., Howie, A. J., Hewison, M., and Stewart, P. M. (1999). Expression of 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase in the human kidney. *J Am Soc Nephrol* **10**, 2465-73.

Zelinski, J. M., Sykes, D. E., and Weiser, M. M. (1991). The effect of vitamin D on rat intestinal plasma membrane CA-pump mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* **179**, 749-55.

Zhavoronkova, L. A., Gogitidze, N. V., and Kholodova, N. B. (1996). [The characteristics of the late reaction of the human brain to radiation exposure: the EEG and neuropsychological study (the sequelae of the accident at the Chernobyl Atomic Electric Power Station)]. *Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova* **46**, 699-711.

Zierold, C., Mings, J. A., and DeLuca, H. F. (2003). Regulation of 25-hydroxyvitamin D3-24-hydroxylase mRNA by 1,25-dihydroxyvitamin D3 and parathyroid hormone. *J Cell Biochem* **88**, 234-7.

Isotope	Périodes de décroissance	Masse relative (%)	Activité (Bq) Pour 1g d'uranium	Activité (%)
^{238}U	4,5 milliards d'années	99,28	12,400	48,2
^{235}U	0,7 milliards d'années	0,718	580	2,3
^{234}U	0,25 milliards d'années	0,0054	12474	49,5

Figure 1 : Caractéristiques des isotopes de l'uranium naturel

	Masse d' ^{235}U (%)	Activité spécifique ($Bq.g^{-1}$)
uranium naturel	0,7	$2,5.10^4$
uranium enrichi	3	$4,2.10^4$
uranium appauvri	0,3	$1,4.10^4$

Figure 2 : Composition et activité des 3 types d'uranium

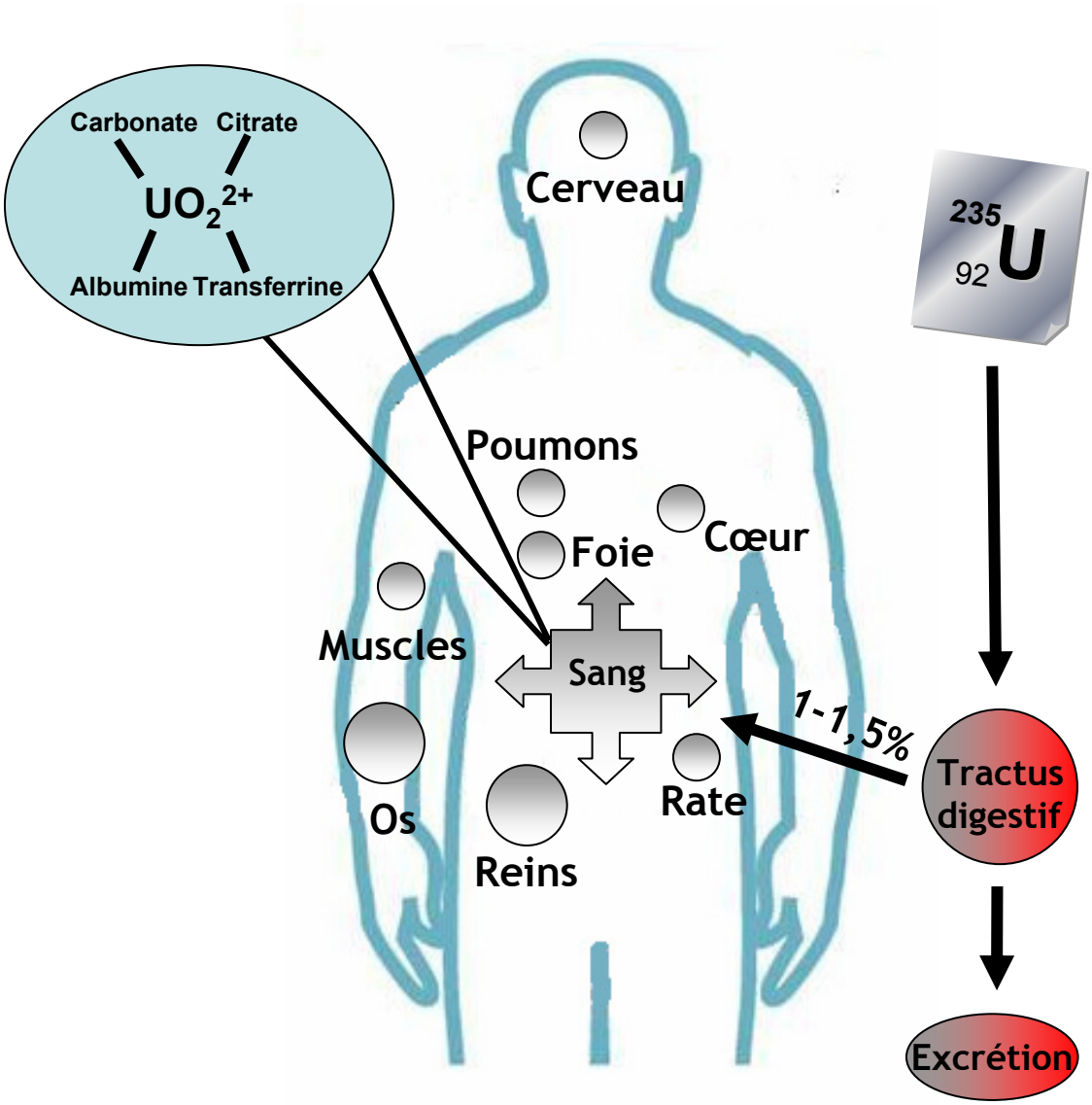


Figure 3 : Distribution de l'uranium dans l'organisme

La majeure partie de l'uranium ingéré est éliminée via les fèces et une petite quantité (1 à 1,5%) est absorbée au niveau du tractus gastro-intestinal. L'uranium absorbé passe dans le compartiment sanguin et est rapidement distribué aux organes cibles. La plupart de la charge systémique se retrouve dans l'os et au niveau du cortex rénal et une partie beaucoup plus faible dans les tissus mous (poumons, rate, foie…). L'uranium plasmatique est sous forme d'ions uranyles associés à des molécules de faible poids moléculaire comme les carbonates et les citrates ou lié à des protéines plasmatiques telle que la transferrine ou l'albumine

		Doses	Effets toxiques	Références
Reins	Données animales	0,96 à 600 mg d'UNO_3/L d'eau de boisson pendant 91 jours	Atteintes tubulaires et glomérulaires	Gilman *et al.* 1998a
		40 mg d'UA/L d'eau de boisson	Atteintes tubulaires	Donnadieu-Claraz *et al* . 2007
	Données humaines	2 à 781 µg d'UN/L d'eau de boisson	Atteintes tubulaires	Zamora *et al.* 1998
		28 µg d'UN/L d'eau de boisson	Atteintes tubulaires	Kurttio *et al.* 2002
		0,71, 16,6 ou 14,7 µg d'UN/L d'eau de boisson	Atteintes tubulaires	Mao *et al.* 1995
Os	Données animales	0,125 mg de UO_2/kg de poids corporel pendant 30 jours (implantation sous cutannée)	Inhibition formation osseuse	Diaz Sylvester *et al.* 2002
	Données humaines	27 µg d'UN/L d'eau de boisson	Augmentation turnover osseux	Kurttio *et al.* 2005
Foie	Données animales	1 à 9 mg d'U.kg.poids-1.jour-1 dans eau de boisson pendant 4 semaines	Atteinte fonction hépatique	Ortega *et al.* 1989
		0,96 à 600 mg d'UNO_3/L d'eau de boisson pendant 91 jours	Lésions histologiques	Gilman *et al.* 1998b
		40 mg d'UA/L d'eau de boisson	Modifications moléculaires du métabolisme des xénobiotiques	Souidi *et al.* 2005
Système nerveux central	Données animales	40 mg d'UE/L d'eau de boisson	Modification comportement	Houpert *et al.* 2005
			Augmentation sommeil paradoxal	Lestaevel *et al.* 2005
		40 mg d'UA/L d'eau de boisson	Perturbation neurotransmission	Bussy *et al.* 2006
	Données humaines	Soldats exposés à UA à partir de fragments d'obus	Déficits neurocognitifs	Mc Diarmid *et al.* 2000
Testicules	Données animales	40 mg d'UE/L d'eau de boisson	Augmentation testostérone et modification moléculaires du métabolisme des hormones stéroïdiennes	Grignard *et al.* 2007

Figure 4 : Tableau récapitulatif des effets toxiques de l'uranium après exposition chronique

Denrées	1986	1989
Lait	37 000	300
Légumes verts	52 000	220
Légumes racines	1 300	220
Viandes	3 700	3 000
Poissons	7 400	560
Champignons	7 500	560

Figure 5 : Teneur en 134Cs +137Cs des produits alimentaires à Korma (Biélorussie) en Bq/kg (Paulin et Siles, 1998)

Aliments	Consommation quotidienne (kg de produit frais)	Activité moyenne en ^{137}Cs (Bq kg^{-1} de produit frais)	Ingestion quotidienne de ^{137}Cs (Bq)
Lait	1,000	54	54
Pain	0,400	0,3	0,1
Pommes de terre	0,500	9,1	4,5
Navets	0,050	3,8	0,2
Choux	0,050	1,5	0,1
Fruits	0,400	4,7	1,9
Viande	0,200	20	4,0
Poisson	0,050	12	0,6
Œufs	0,014	2,5	0,04
Baies sauvages	0,011	2600	28
Champignons	0,010	200000	2000
Total hors champignons	2,801		**96**
Total champignons inclus	2,811		**2096**

Figure 6 : Ingestion quotidienne de ^{137}Cs de la population de Christinovka entre Juillet et Octobre 1998 (Handl et al, 2003)

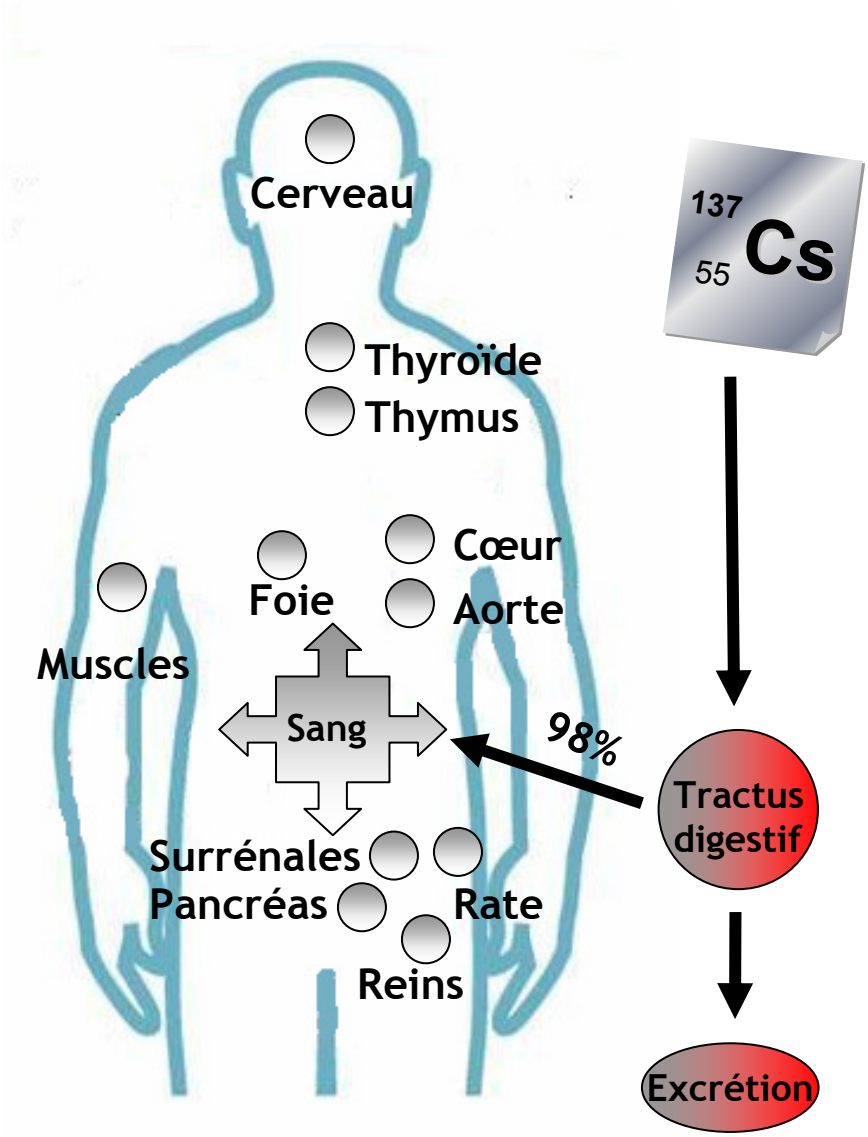


Figure 7 : Distribution de du césium 137 dans l'organisme

La majeure partie du césium 137 ingéré (98%) est absorbé au niveau du tractus gastro-intestinal.. Une fois qu'il quitte le compartiment sanguin vers les organes, le césium 137 se distribue de façon relativement homogène dans l'organisme.

		Doses	Effets toxiques	Références
Système immunitaire	Données humaines	enfants vivant dans les territoires contaminés (Biélorussie)	Dérèglement du système immunitaire humoral	Titov *et al.* 1995 Mel'nichenko *et al.* 1999
		enfants vivant dans les territoires contaminés (Pripiat, Ukraine)	Dérèglement du système immunitaire cellulaire	DeVita *et al.* 2000
Reproduction	Données humaines	population vivant dans les territoires contaminés (Biélorussie)	Malformations congénitales et fœtales	Lazjuk *et al.* 1997
Système nerveux central	Données animales	6500 Bq de ^{137}Cs /L d'eau de boisson	Perturbation du cycle veille sommeil et de l'activité électroencéphalogra-phique	Lestaevel *et al.* 2006
	Données humaines	population habitant la zone des 150 Km autour de la centrale de Tchernobyl	Désordres neurologiques	Gamache *et al.* 2005
Système cardio-vasculaire	Données humaines	enfants vivant dans les territoires contaminés (Biélorussie)	Augmentation de la fréquence des troubles électrocardiographiques et de l'hypertension artérielle	Bandazhevsky *et al.* 2004
Rein	Données humaines	population vivant dans les territoires contaminés (Ukraine)	Cancer du rein	Romanenko *et al.* 2000
Véssie	Données humaines	population vivant dans les territoires contaminés (Ukraine)	Cystites chroniques proliférative s	Romanenko et al, 2003
Thyroïde	Données humaines	enfants vivant dans les territoires contaminés	Cancer de la thyroïde	Sumner 2007
Système oculaire	Données humaines	population vivant dans les territoires contaminés	augmentation des cas de cataractes	Sumner 2007 Shubik *et al.* 1996
Métabolismes	Données animales	6500 Bq de ^{137}Cs /L d'eau de boisson	Modifications du métabolisme du cholestérol	Souidi *et al.* 2006 Racine *et al.* 2007
		6500 Bq de ^{137}Cs /L d'eau de boisson	Modifications du métabolisme des hormones stéroïdiennes	Grignard *et al* 2007

Figure 8 : Tableau récapitulatif des effets toxiques du césium 137 après exposition chronique

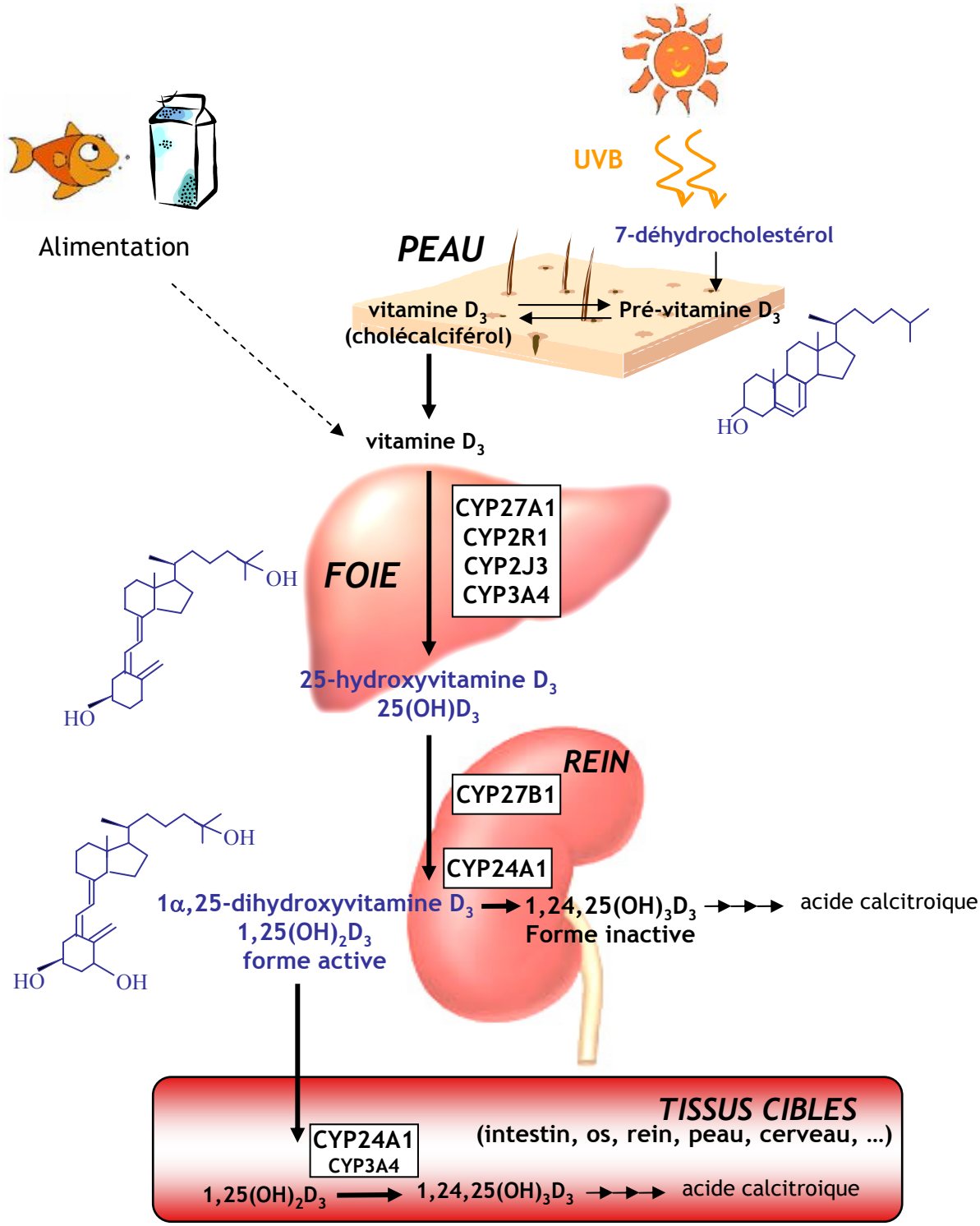


Figure 9 : Représentation schématique du métabolisme de la vitamine D_3.

Dans la peau, le précurseur de la vitamine D_3, le 7-déhydrocholestérol, est transformé en pré-vitamine D3 qui est secondairement isomérisée en vitamine D_3 (ou cholécalciférol). Ce dernier peut également provenir de l'alimentation. Au niveau hépatique, la 25-hydroxyvitamine D_3 ou 25(OH)D_3 est synthétisée après action de la 25-hydroxylase. CYP27A1, CYP2R1, CYP2J3 et CYP3A4 peuvent réaliser cette étape. Dans le rein, la 1α-hydroxylase CYP27B1 synthétise la forme biologiquement active 1,25-dihydroxyvitamine D_3 ou 1,25$(OH)_2D_3$. Son catabolisme est réalisé par la 24-hydroxylase CYP24A1 dans les tissus cibles.

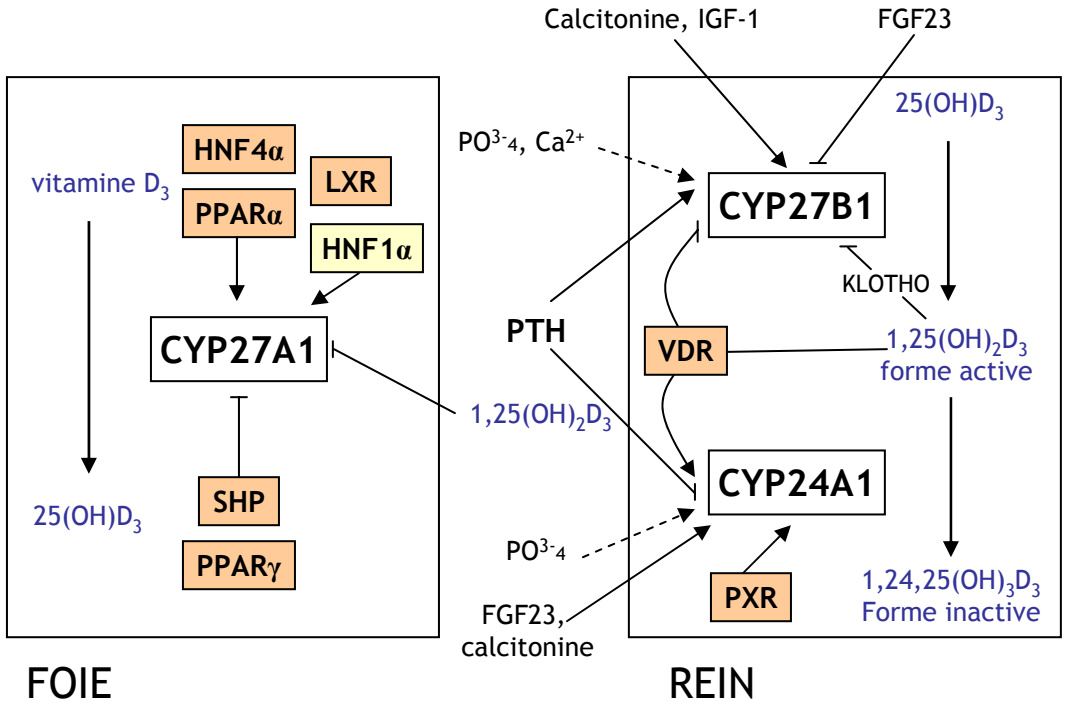
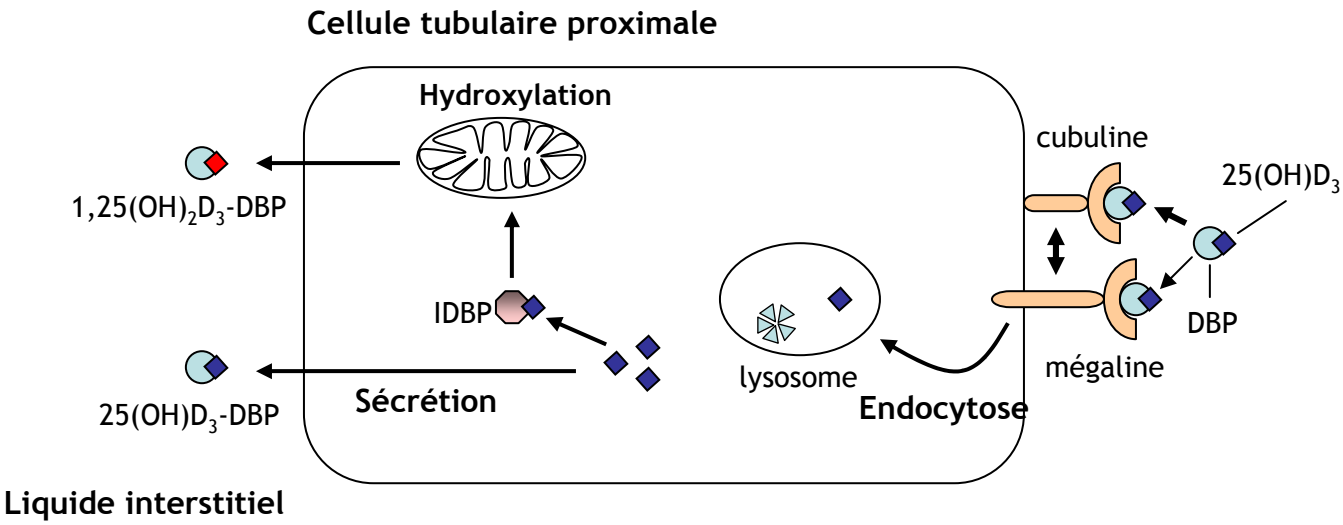


Figure 10 : Régulation du métabolisme de la vitamine D_3.

Dans le foie, l'expression de la CYP27A1 est stimulée par les récepteurs nucléaires HNF4α (hepatic nuclear factor 4α), PPARγ (peroxisome proliferator-activated receptor γ) et LXR (Liver X Receptor) et inhibée par PPARα et SHP (small heterodimer partner). Le facteur de transcription HNF1α (hepatic nuclear factor 1α) stimule également sa transcription alors que la 1,25(OH)$_2$D$_3$, elle-même l'inhibe. Dans le rein, la parathormone (PTH) est le régulateur positif principal de la CYP27B1. L'hypocalcémie et l'hypophosphatémie induisent une augmentation de l'activité et de l'expression de cette enzyme, alors que l'hypercalcémie et l'hyperphosphatémie exercent un contrôle négatif. La 1,25(OH)$_2$D$_3$ via son interaction avec VDR (vitamin D receptor) inhibe l'expression rénale de la CYP27B1 et stimule la transcription de la CYP24A1 rénale, responsable de l'inactivation de la vitamine D3. L'effet inhibiteur de la 1,25(OH)$_2$D$_3$ sur la CYP27B1 peut s'exercer également via la protéine KLOTHO. La CYP27B1 est régulée positivement par la calcitonine et la IGF-1 et négativement par le FGF23 (fibroblast growth factor 23) La CYP24A1 est régulée également par les apports phosphatés et par la PTH. Cette dernière inhibe l'expression de l'enzyme. Au contraire, la calcitonine, le FGF23 et le récepteur nucléaire PXR (pregnane X receptor) induisent son expression. Flèche droite, stimulation ; flèche brisée, inhibition ; flèche en pointillée : stimulation ou inhibition.



D'après Nykjaer *et al.* 1999

Figure 11 : Représentation schématique du transport de la 25(OH)D_3 et de la 1,25(OH)$_2$$D_3$ dans la cellule rénale.

La 25(OH)D_3,, issue du foie, circule liée à une protéine plasmatique, la DBP (vitamin D binding protein). Le complexe 25(OH)D_3-DBP est reconnu par la mégaline, situé sur la bordure en brosse des cellules tubulaires, et est internalisé par endocytose. La cubuline agit comme un capteur des complexes et facilite leur internalisation. La DBP est dégradée dans les lysosomes et la 25(OH)D_3 est libérée dans le cytosol. La 25(OH)D_3 est alors soit sécrété soit associée à une IDBP (intracellular vitamin D binding protein) qui permet son acheminement vers la mitochondrie où elle subit une hydroxylation. La 1,25(OH)2D3 produite est libérée dans le liquide interstitiel pour se complexer à une DBP.

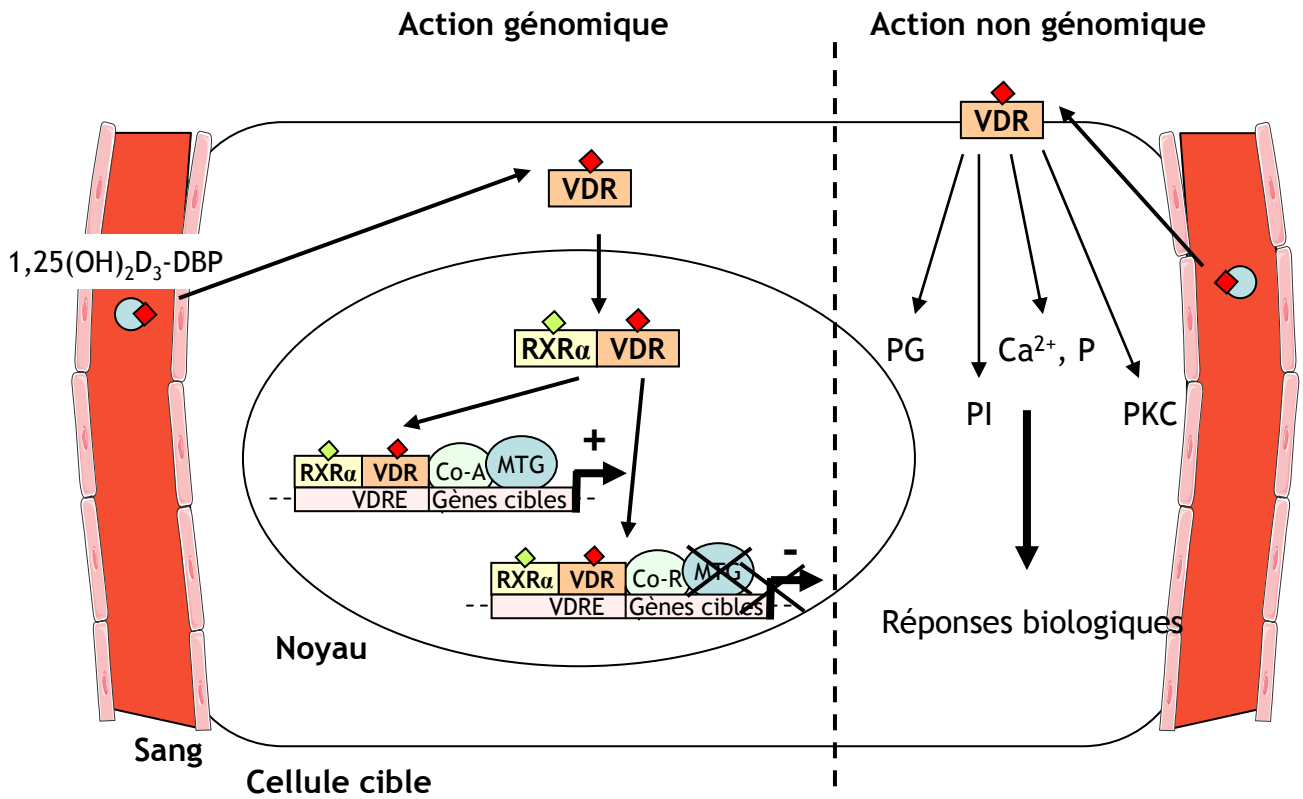
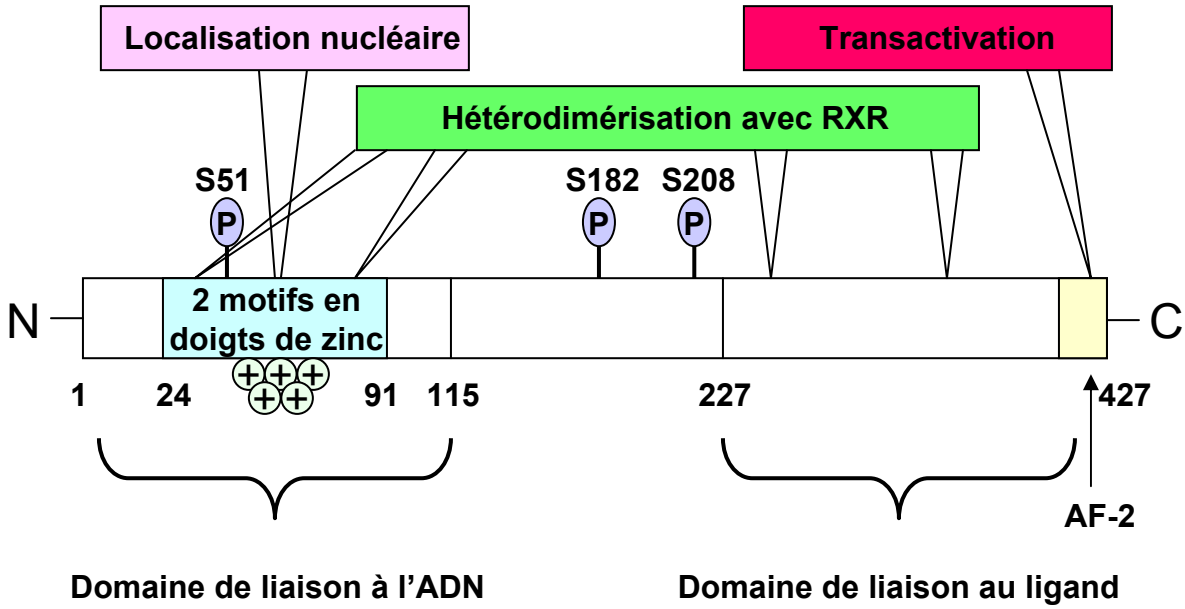


Figure 12 : Représentation schématique du mécanisme d'action 1,25(OH)$_2$D$_3$ dans la cellule cible.

- Mode d'action génomique: La 1,25(OH)$_2$D$_3$, pénètre dans la cellule et se lie à son récepteur (VDR), le couple récepteur-ligand pénètre dans le noyau où il forme un hétérodimère avec RXRα (retinoic X receptor α), puis reconnaît les séquences spécifiques VDRE présentes dans le promoteur des gènes cibles. L'ensemble VDR-RXR recrute soit des co-activateurs (Co-A) qui permettent de faire un pont entre VDR et la machinerie transcriptionnelle générale (MTG) afin d'activer la transcription des gènes cibles, soit des co-répresseurs (Co-R) qui rendent les sites de fixation inaccessibles à la MTG.

- Mode d'action non génomique: La 1,25(OH)$_2$D$_3$ se lie à un récepteur membranaire lequel va activer des voies de signalisation telles que la production des prostaglandines (PG), l'activation de la protéine kinase C (PKC), la modification du métabolisme des phospho-inositides (PI) et la distribution intracellulaire de calcium et de phosphates.



D'après Haussler *et al*. 1998

Figure 13 : Représentation schématique de la structure du VDR humain.

La structure de VDR est comparable à celle de tous les récepteurs nucléaires et comprend deux domaines indépendants : un domaine de liaison à l'ADN et un domaine de liaison au ligand. VDR contient des sites de phosphorylation et des domaines assurant la localisation nucléaire, l'hétérodimérisation avec RXR et la transactivation des gènes cibles.

⊕ *: séquence de 5 acides aminés basiques ; AF-2 : fonction d'activation 2*

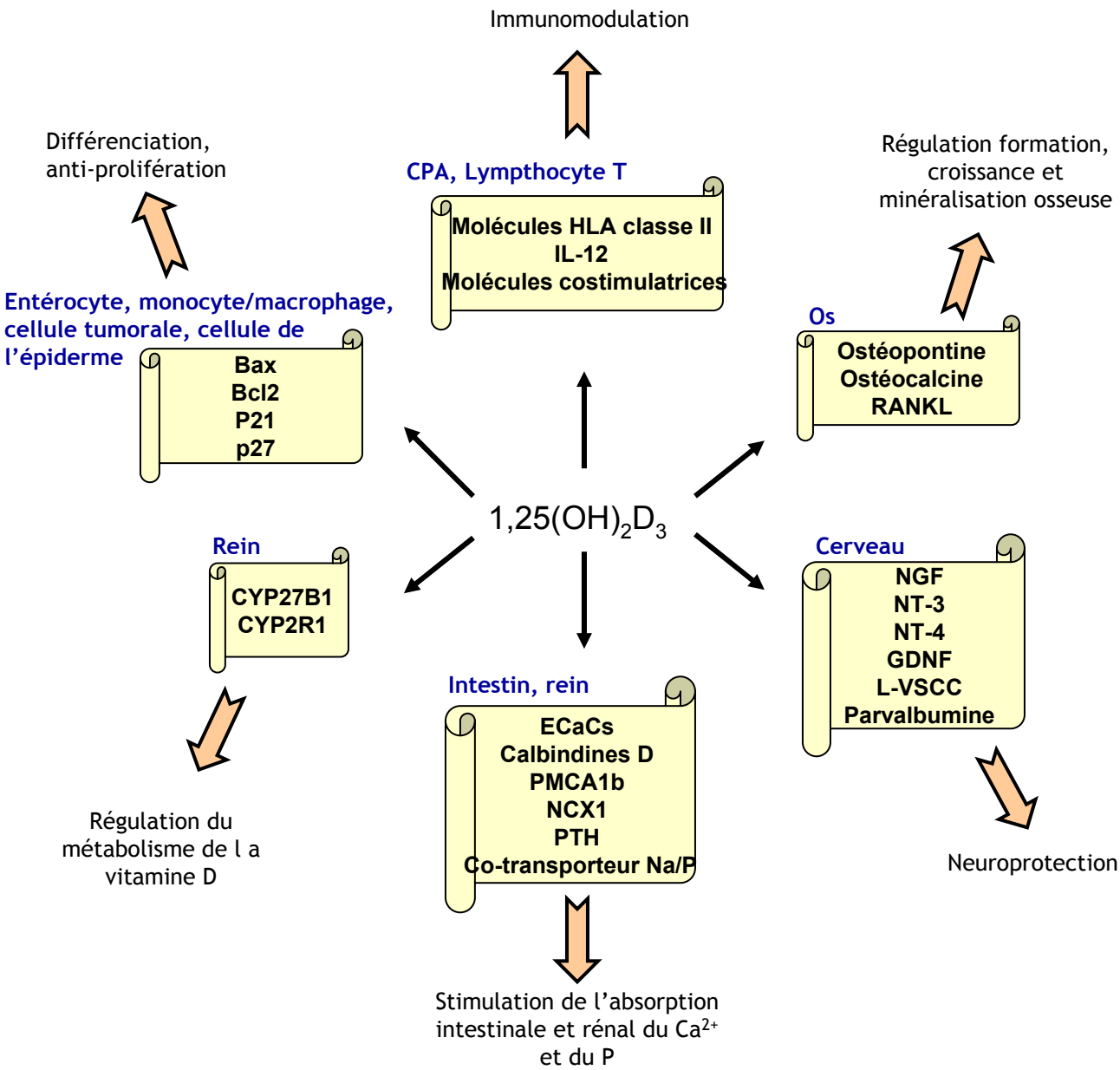


Figure 14 : Les rôles de la vitamine D .

.

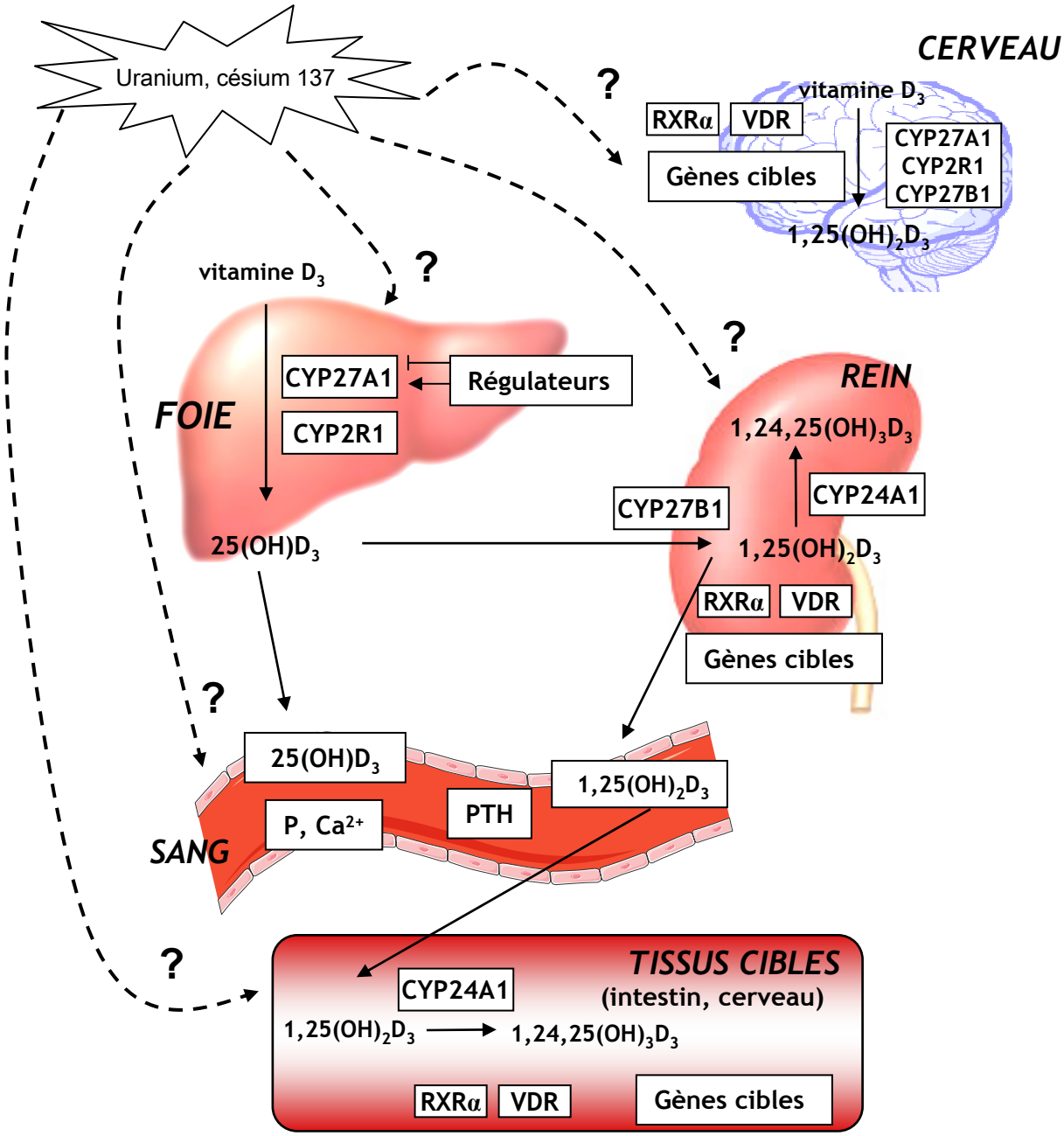


Figure 15 : But du travail de thèse

.

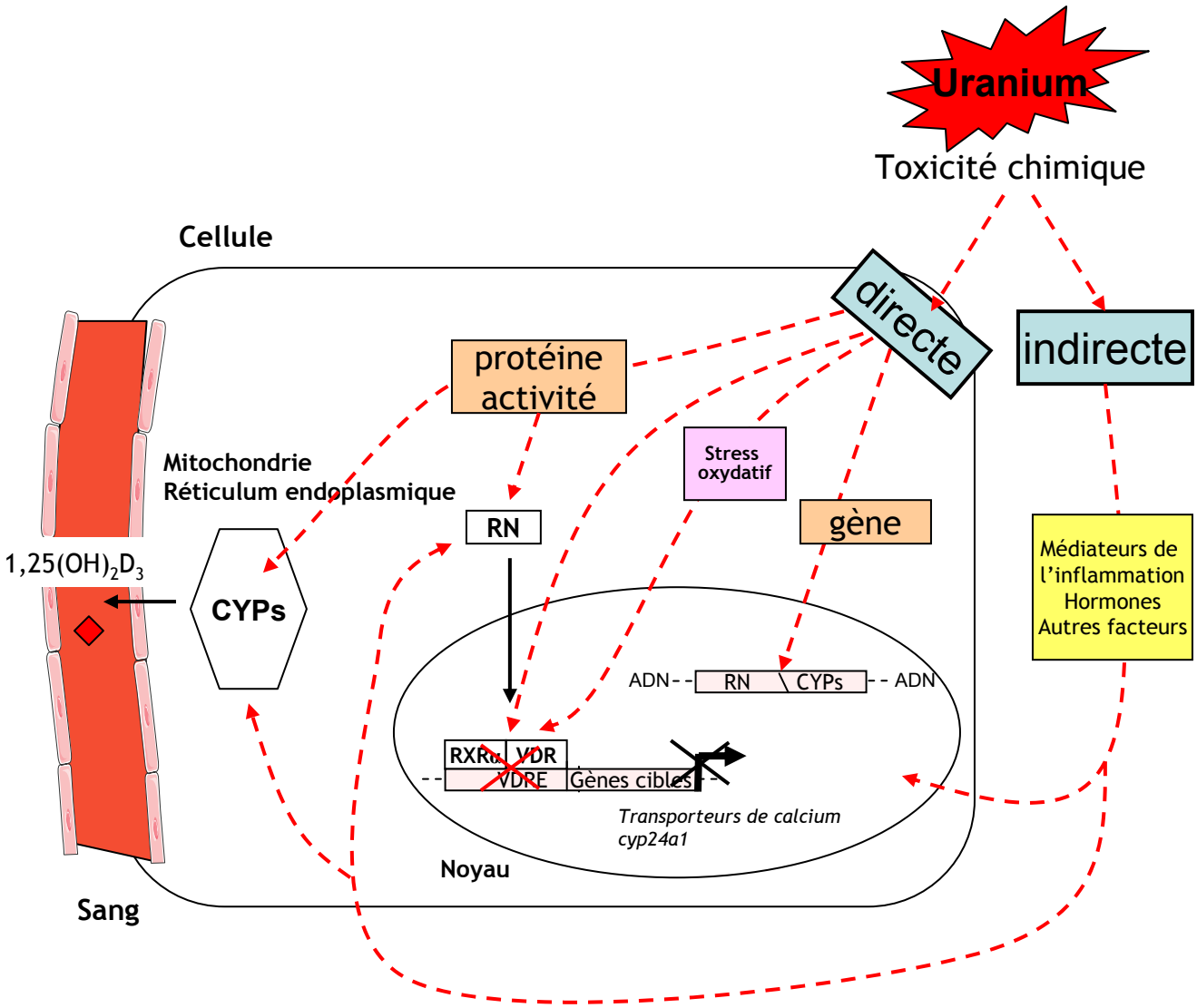


Figure 16 : Hypothèses sur le mécanisme d'action de l'uranium.

Les effets de l'uranium sur le métabolisme de la vitamine D seraient dus principalement à sa chimiotoxicité. Son action serait liée:
-<u>Soit à un effet direct</u> du métal sur l'expression génique et protéique des CYPs et des RN impliqués dans le métabolisme de la vitamine D. Dans le cas d'une action directe, plusieurs hypothèses peuvent être émises: l'uranium pourrait i) modifier l'activité des CYPs par compétition avec le fer au niveau du site actif de l'enzyme et par conséquent modifier les niveaux plasmatiques de 1,25(OH)2D3, ii) interagir avec VDR et RXRα et diminuer leur activité, iii) générer du stress oxydatif et par conséquent diminuer l'activité de VDR et RXRα.
-<u>Soit à un effet indirect</u> en réponse à son action sur un autre système physiologique.
CYPs : cytochromes p450 ; RN : Récepteurs nucléaire.

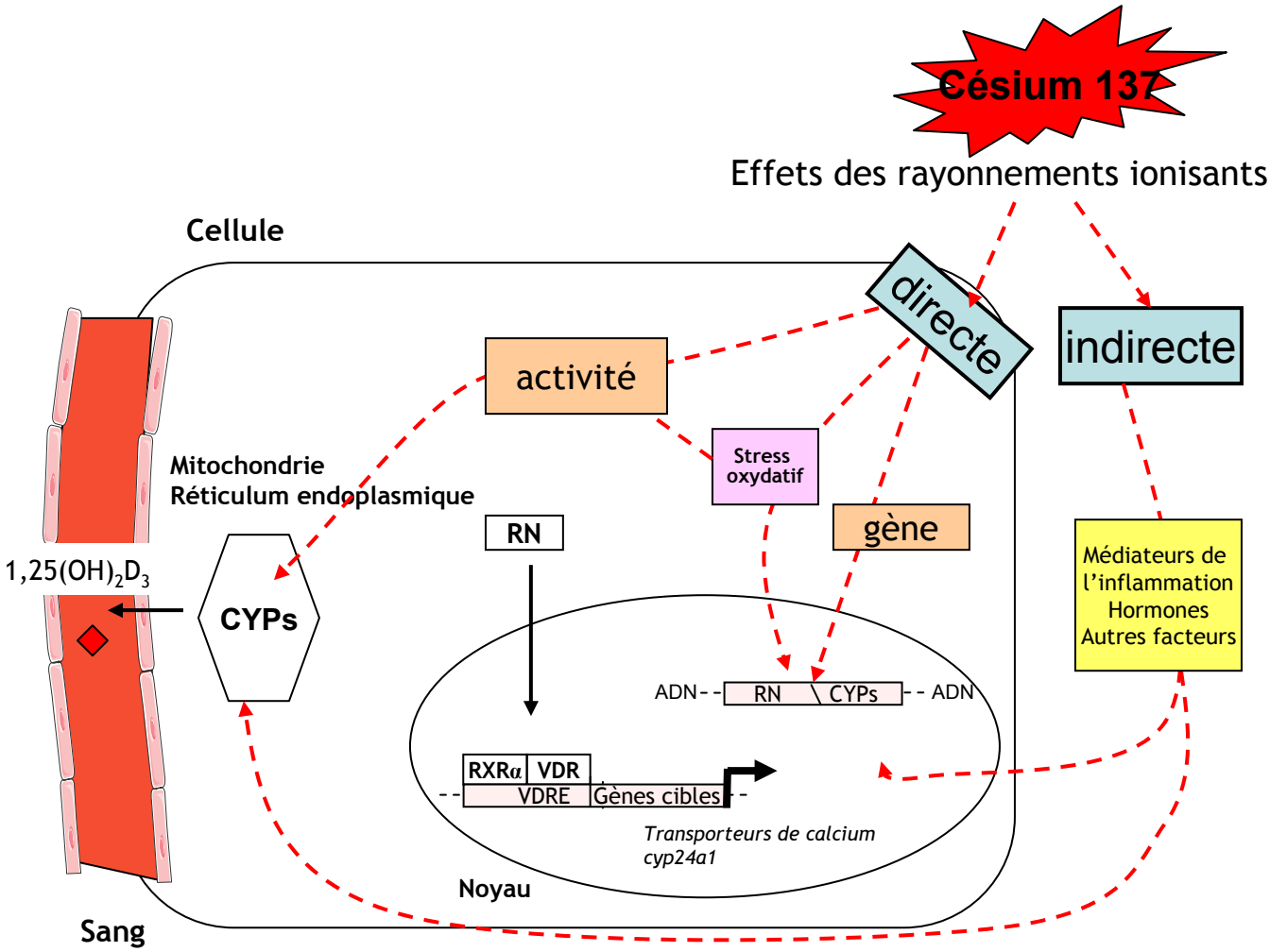


Figure 17 : Hypothèses sur le mécanisme d'action du césium 137.

Les effets du césium sur le métabolisme de la vitamine D sont dus principalement à sa radiotoxicité. Son action serait liée :
- <u>Soit à un effet directe</u> des rayonnements ionisants émis par le ^{137}Cs qui peuvent agir sur l'expression génique et l'activité des CYPs et des RN impliqués dans le métabolisme de la vitamine D, de deux manières : i) par transfert direct de l'énergie du rayonnement qui entraine l'ionisation de la molécule et ainsi la modification de sa structure chimique, ii) par formation de radicaux libres qui initient des réactions chimiques d'oxydo-réductions avec des molécules biologiques situées à proximité, entrainant l'altération structurelle de ces dernières. L'action du ^{137}Cs sur l'activité des CYPs peut conduire à des modification du niveau plasmatique de $1,25(OH)_2D_3$.
- <u>Soit à un effet indirect</u> des rayonnements ionisants en réponse à leurs actions sur un autre système physiologique.
CYPs : cytochromes p450 ; RN : Récepteurs nucléaire.

Résumé :

Les objectifs de ce travail étaient d'évaluer les effets de l'uranium appauvri (UA) ou enrichi (UE) et du césium 137 (^{137}Cs) sur le métabolisme de la vitamine D au niveau du foie, du rein et du système nerveux central chez le rat. Une exposition chronique à de faibles doses d'UA ou de ^{137}Cs diminue le taux de vitamine D active ($1,25(OH)_2D_3$) et entraine des modifications moléculaires des enzymes de types cytochromes P450 (CYPs) impliqués dans ce métabolisme et des récepteurs nucléaires associés. Nous avons démontré qu'une contamination à l'UA et à l'UE affectent de la même manière l'expression de VDR (*vitamin D receptor*) et de RXRα (*retinoic X receptor alpha*) et par conséquent peuvent moduler l'expression des gènes cibles de la vitamine D impliqués dans le transport du calcium au niveau rénal (*ecac1, Epithelials Ca2+ channel 1 et cabp-d28k, Calbindin-D28K*). Ces résultats suggèrent que ces effets sont dus à la toxicité chimique de l'uranium. A l'inverse, les principales cibles moléculaires du ^{137}Cs sont les CYPs qui sont impliquées dans la biosynthèse de la vitamine D (CYP2R1, CYP27B1) au niveau du foie et du système nerveux central.

Abstract :

The aim of this work was to investigate the effects of depleted (DU) or enriched uranium (EU) and of cesium 137 (^{137}Cs) on vitamin D_3 biosynthetic pathway in liver, kidney and brain in rat. A chronic exposure with environmental doses of ^{137}Cs and uranium could decrease the vitamin D active form level ($1,25(OH)_2D_3$) and lead to molecular modifications of cytochromes P450 (CYPs) enzymes involved in this metabolism and associated nuclear receptors. We demonstrated that both UA and UE contamination affected VDR (*vitamin D receptor*) and RXRα (*retinoid X receptor alpha*) expression, and consequently could modulate the expression of vitamin D target genes involved in calcium homeostasis in kidney (*ecac1, Epithelials Ca2+ channel 1 et cabp-d28k, Calbindin-D28K*). These results suggest that these effects could be due to the chemical toxicity of uranium. On the contrary, the main molecular targets of ^{137}Cs are CYPs involved in Vitamin D_3 biosynthesis (CYP2R1, CYP27B1) in liver and brain.