

UNIVERSITÉ DES ANTILLES-GUYANE

ANNÉE 2012

THÈSE N°

THÈSE

Pour l'obtention du

DOCTORAT DE SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DES ANTILLES-GUYANE

Option : Biologie-Santé

Présentée et soutenue publiquement

Le 21 septembre 2012

Par

Fritz-Line VELAYOUDOM-CEPHISE

**PROFIL MÉTABOLIQUE ASSOCIÉ AU STATUT EN VITAMINE D
ET POLYMORPHISMES DES GÈNES CODANT SON RÉCEPTEUR
ET SON TRANSPORTEUR SPÉCIFIQUE DANS UNE POPULATION CARIBÉENNE.
PARAMÈTRES ASSOCIÉS A LA « SEX HORMONE BINDING GLOBULIN »
DANS UNE POPULATION DYSMÉTABOLIQUE CAUCASIENNE**

Membres du Jury:

Monsieur le Professeur Fabrice BONNET

Co-directeur

Monsieur le Docteur Jean-Paul DONNET

Membre du jury

Madame le Docteur Lydia FOUCAN

Directeur

Monsieur le Professeur Michel GEOFFROY

Membre du jury

Monsieur le Professeur Jean-Daniel LALAU

Rapporteur

Monsieur le Professeur Jean-Louis WEMEAU

Rapporteur

UNIVERSITÉ DES ANTILLES-GUYANE

ANNÉE 2012

THÈSE N°

THESE

Pour l'obtention du

DOCTORAT DE SCIENCES DE L'UNIVERSITE DES ANTILLES GUYANE

Option : Biologie-Santé

Présentée et soutenue publiquement

Le 21 septembre 2012

Par

Fritz-Line VELAYOUDOM-CEPHISE

**PROFIL MÉTABOLIQUE ASSOCIÉ AU STATUT EN VITAMINE D
ET POLYMORPHISMES DES GÈNES CODANT SON RÉCEPTEUR
ET SON TRANSPORTEUR SPÉCIFIQUE DANS UNE POPULATION CARIBÉENNE.
PARAMÈTRES ASSOCIÉS A LA « SEX HORMONE BINDING GLOBULIN »
DANS UNE POPULATION DYSMÉTABOLIQUE CAUCASIENNE**

Membres du Jury:

Monsieur le Professeur Fabrice BONNET

Co-directeur

Monsieur le Docteur Jean-Paul DONNET

Membre du jury

Madame le Docteur Lydia FOUCAN

Directeur

Monsieur le Professeur Michel GEOFFROY

Membre du jury

Monsieur le Professeur Jean-Daniel LALAU

Rapporteur

Monsieur le Professeur Jean-Louis WEMEAU

Rapporteur

REMERCIEMENTS

Je remercie ma directrice de thèse, le Docteur Lydia Foucan, pour sa patience, pour la confiance qu'elle m'a toujours témoignée et pour ses encouragements dans les moments difficiles. Elle a assuré mon suivi scientifique par un encadrement rigoureux. Elle m'a transmis les valeurs inhérentes à la recherche scientifique, me permettant ainsi de mener avec enthousiasme, ce travail qui présente un intérêt majeur de santé publique. Qu'elle trouve ici, l'expression de ma sincère gratitude.

Merci au Professeur Fabrice Bonnet, mon co-directeur de thèse pour ses précieux conseils et pour la confiance qu'il m'a accordée sans hésiter.

Je remercie le Professeur Jean-Louis Wémeau pour sa sollicitude et sa bienveillance. Il m'a fait bénéficier de son expérience et transmis la passion de ma profession. Il accepte aujourd'hui d'être rapporteur de mon travail de recherche. Qu'il trouve ici, l'expression de toute ma reconnaissance et mes chaleureux remerciements.

Merci au Professeur Jean-Daniel Lalau d'avoir accepté d'être mon rapporteur.

Je remercie le Professeur Michel Geoffroy, responsable du laboratoire L.A.M.I.A qui a accepté de juger mon travail. Qu'il trouve ici mes plus sincères remerciements.

Merci au Docteur Jean-Paul Donnet, chef du service d'Endocrinologie-Diabétologie du CHU de Pointe-à-Pitre. Il a accueilli mon travail avec enthousiasme et m'a toujours accordé sa confiance. Qu'il trouve ici, l'expression de ma sincère reconnaissance.

A mes parents qui ont toujours été présents à mes côtés.

Pour leur soutien indéfectible et leur amour, simplement.

Je vous dois tout ce que je suis.

A mon époux, et à mes deux princesses

Pour leurs gestes d'affection,

Au personnel infirmier du service d'Endocrinologie-Diabétologie du CHU de Pointe-à-Pitre, notamment à Malika, à Carole et à Brigitte, un grand merci pour leur disponibilité.

Je remercie pour leur collaboration, les docteurs Merault et Ducros, confrères néphrologues, ainsi que les membres de notre équipe de recherche E.C.M pour leur soutien et nos échanges scientifiques.

Je remercie enfin, les patients qui ont accepté de participer à ce projet et sans lesquels ce travail n'aurait pas pu aboutir.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	p8
RÉSUMÉ	p14
ABSTRACT	p15
I. INTRODUCTION	p16
II. VITAMINE D	p21
II.1 Historique et identification de la vitamine D	p22
II.2 Généralités	p24
II.2.1 Structure chimique	p24
II.2.2 Propriétés chimiques	p24
II.2.2.1. Photo conversion de la 7-DHC en pré-vitamine D3	p24
II.2.2.2 Conversion de la pré-vitamine D3 en vitamine D3	p25
II.2.2.3 Translocation de la peau à la circulation sanguine	p25
II.2.2.4 Photo-dégradation et photo-isomères de la vitamine D3	p26
II.2.3 Sources et apports nutritionnels conseillés	p27
II.2.3.1 Sources naturelles de vitamine D	p27
II.2.3.2 Apport complémentaire de vitamine D	p27
II.3 Métabolisme et génétique	p28
II.3.1 Métabolisme de la vitamine D	p28
II.3.1.1 Biosynthèse	p28

II.3.1.2 Transport	p30
II.3.1.3 Catabolisme	p31
II.3.1.4 Rôle biologique	p32
II.3.1.4.1. Effets génomiques du calcitriol	p32
II.3.1.4.2. Effets non génomiques du calcitriol	p32
II.3.1.4.3 Effets « classiques » de la vitamine D	p33
II.3.1.4.3.1 Effet sur l'os	p33
II .3.1.4.3.2 Effet sur l'intestin	p33
II .3.1.4.3.3 Effet sur le rein	p34
II.3.1.4.4 Effets « non classiques » de la vitamine D	p35
II.3.1.4.4.1 Vitamine D et muscles	p35
II.3.1.4.4.2 Vitamine D et système cardiovasculaire	p35
II.3.1.4.4.3 Vitamine D et système immunitaire	p36
II.3.1.5. Dosage biologique de la vitamine D	p37
II.3.1.5.1 Techniques de dosage	p37
II.3.1.6 Aspects pharmaceutiques de la vitamine D en France	p39
II.3.1.6.1 Formes pharmaceutiques	p39
II.3.1.6.2 Quel type de vitamine D choisir?	p40
II.3.1.6.3 Quelle dose de vitamine D? À quel rythme?	p41
II.3.1.6.4 Quelle durée de traitement?	p44

II.3.2 Régulation	p45
II.3.2.1 Paramètres environnementaux et physiologiques	p45
II.3.2.1.1 Influence des saisons, de l'altitude et de la latitude	p45
II.3.2.1.2 Effets des crèmes solaires et des vêtements	p46
II.3.2.1.3 Effets de l'âge	p46
II.3.2.1.4 Rôle de la pigmentation cutanée	p46
II.3.2.1.5 Rôle de la PTH	p47
II.3.2.1.6 Rôle du calcium	p48
II.3.2.1.7 Rôle des phosphates	p48
II.3.2.1.8 Rôle de l'acidose	p49
II.3.2.1.9 Autorégulation par la 1,25(OH)D	p50
II.3.2.1.10 Rôle d'autres hormones: insuline, IGF1	p50
II.3.2.1.11 Rôle des enzymes CYP	p51
II.3.2.1.12 Cas particulier de l'insuffisance rénale chronique	p55
II.3.3 Vitamine D, métabolisme glucidique et risque cardiovasculaire	p59
II.3.3.1 Vitamine D et diabète	p59
II.3.3.1.1. Vitamine D, fonction cellulaire bêta et insulinosécrétion	p61
II.3.3.1.2. Vitamine D et sensibilité à l'insuline	p61
II.3.3.1.3 Vitamine D et cellules bêta pancréatiques	p63
II.3.3.2 Vitamine D et obésité	p63

II.3.3.3 Vitamine D et risque cardiovasculaire	p64
II.3.3.3.1 Effet sur le système Rénine Angiotensine	p65
II.3.3.3.2 Effet sur la cellule cardiaque	p65
II.3.3.3.3 Effet sur la paroi vasculaire	p66
II.3.4 Polymorphismes génétiques	p68
II.3.4.1 Polymorphismes du gène codant pour le récepteur de la vitamine D	p68
II.3.4.1.1 Le récepteur VDR	p68
II.3.4.1.1.1 Identification et structure du VDR	p68
II.3.4.1.1.2 Gène codant pour le VDR	p69
II.3.4.1.1.3 Mode d'action et rôle biologique du VDR	p69
II.3.4.1.1.4 Régulation de l'activité du VDR	p71
II.3.4.1.2 Polymorphismes du gène <i>VDR</i>	p72
II.3.4.1.2.1 Techniques de génotypage	p72
II.3.4.1.2.2 Description des polymorphismes étudiés	p73
II.3.4.1.2.3 Polymorphismes du <i>VDR</i> et diabète	p75
II.3.4.1.2.4 Polymorphismes du <i>VDR</i> et obésité	p76
II.3.4.1.2.5 Polymorphismes du <i>VDR</i> et risque cardiovasculaire	p77

II.3.4.2 Polymorphismes de gènes codant pour les protéines du métabolisme de la vitamine D (DBP ou GC, cytochrome CYP27B1 et Nicotinamide Adénine Dinucléotide synthétase ou NADSYN1) p79

II.3.4.2.1 Descriptions des polymorphismes étudiés : *GC, CYP27B1, NADSYN1* p79

II.3.4.2.2 Vitamine D et polymorphismes de *GC, CYP27B1 et NADSYN1* p82

III. PRÉSENTATION DES TRAVAUX DE RECHERCHE SUR LA VITAMINE V ET LES POLYMORPHISMES GÉNÉTIQUES (*VDR, GC, CYP27B1, NADSYN1*) p85

III.1 Evaluation des concentrations de 25(OH)D et de 1,25(OH)D chez des sujets dialysés en Guadeloupe p86

III.2 Etude du déficit en vitamine D, des polymorphismes du VDR et de leur association aux facteurs de risque cardiovasculaire dans une population de diabétiques de type 2 d'origine afro-caribéenne p90

III.3 Associations entre les polymorphismes des gènes *GC* et *NADSYN1*, le surpoids, la dyslipidémie et le statut vitaminique D chez des sujets Afro-caribéens non diabétiques. p95

IV. SEX HORMONE BINDING GLOBULIN (SHBG) p101

IV.1 Structure et synthèse de la SHBG p102

IV.2 Physiologie et mode d'action de la SHBG p104

IV.3 SHBG et paramètres du métabolisme du glucose (insulinorésistance, insulinosécrétion, diabète)	p106
IV.4 Présentation de notre travail de recherche sur la SHBG : Étude du rôle des stéroïdes sexuels, de la graisse intrahépatique et de FGF- dans l'association entre la SHBG et les paramètres dysmétaboliques.	p111
V. CONCLUSION	p115
VI. PERSPECTIVES	p119
VII.1 Evaluation de la supplémentation en Cholécalfiérol chez des sujets diabétiques de type 2 déficitaires en vitamine D : étude prospective	p120
VII.2 Justification de l'étude et objectifs	p120
VII.3 Patients et méthodes	p121
VII.4 Financement et aspect légal	p123
VII.REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	p123
VIII.ANNEXES: LISTE DES TABLEAUX, ILLUSTRATIONS, ABREVIATION	p148
IX.1 Liste des figures et tableaux	p148
IX.2 Liste des abréviations	p149
IX. GLOSSAIRE	p153
X. LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES	p157

RÉSUMÉ

Profil métabolique associé au statut en vitamine D et polymorphismes des gènes codant son récepteur et son transporteur spécifique dans une population Caribéenne.

Paramètres associés à la « Sex Hormone Binding Globulin » dans une population dysmétabolique Caucasienne.

En Guadeloupe, la prévalence du diabète est deux fois plus élevée qu'en France hexagonale, avec une prédominance féminine. En dehors des facteurs environnementaux, la vitamine D et certains polymorphismes de gènes impliqués dans son métabolisme seraient associés à un risque de pathologies métaboliques. Les androgènes sont également associés aux anomalies du métabolisme glucidique, soit directement, soit via leur transporteur SHBG (Sex Hormone Binding Protein).

Nous avons émis les hypothèses de recherche suivantes : 1/ le statut en vitamine D et les polymorphismes des gènes impliqués dans son métabolisme pourraient être associés aux paramètres métaboliques chez des sujets Afro-Caribéens (AC). Ils pourraient expliquer l'importance des pathologies cardiométaboliques en Guadeloupe. 2/ la SHBG pourrait être associée aux anomalies du métabolisme glucidique, indépendamment des stéroïdes sexuels.

Nos travaux sont présentés dans 4 études. Nous avons mis en évidence une prévalence élevée du déficit en vitamine D chez les sujets AC diabétiques de type 2. Nous avons trouvé une association significative entre le statut vitaminique D et le risque cardiométabolique chez ces sujets, mais aussi dans une population de sujets en hémodialyse chronique. Les polymorphismes des gènes impliqués dans le métabolisme de la vitamine D sont aussi associés à ce risque. Chez les sujets dysmétaboliques, une relation entre la SHBG, la graisse intra-hépatique, les hépatokines et les paramètres métaboliques a été mise en évidence, indépendamment des stéroïdes sexuels. En conclusion, la vitamine D et la SHBG pourraient être des marqueurs d'intérêt pour le dépistage des sujets à haut risque cardiométabolique.

ABSTRACT

Metabolic profile associated with vitamin D status and polymorphisms in the vitamin D receptor and transporter genes in a Caribbean population

Parameters associated with the "Sex Hormone Binding Globulin" in a dysmetabolic Caucasian population

In Guadeloupe, the prevalence of diabetes is two times higher than in Metropolitan France, with a female predominance. Apart from environmental factors, vitamin D and polymorphisms of genes involved in vitamin D metabolism would be associated with increased risk of metabolic diseases. Androgens are also associated with abnormal glucose metabolism, directly or through the Sex Hormone Binding Protein (SHBG).

Our main hypotheses were: 1 / vitamin D status and polymorphisms of genes involved in its metabolism may be associated with metabolic parameters in Afro-Caribbean (AC). They could explain the importance of cardiometabolic diseases in Guadeloupe. 2 / SHBG may be associated with abnormal glucose metabolism, independently of sex steroids. Our research is presented in four studies. We have demonstrated a high prevalence of vitamin D deficiency in AC patients with type 2 diabetes. We found a significant association between vitamin D status and cardiometabolic risk in these subjects, but also in a population of patients undergoing in chronic hemodialysis. Polymorphisms in genes involved in vitamin D metabolism are also associated with this risk. In dysmetabolic patients, a relationship between SHBG, intrahepatic fat, hépatokines and metabolic parameters was demonstrated, independently of sex steroids hormones. In conclusion, vitamin D and SHBG may be markers of interest for screening patients at high cardiometabolic risk.

CHAPITRE I :
INTRODUCTION

Avec les modifications du mode de vie actuel, privilégiant la sédentarité, on assiste à une véritable pandémie du diabète de type 2 (DT2) et de l'obésité. La prévalence du diabète dans le monde est en augmentation, estimée à 4,4% en 2030 avec 300 millions de diabétiques de type 2 (1). En France hexagonale, la prévalence du diabète est évaluée à 4,57% soit un peu plus de 2,5 millions de sujets (2). En Guadeloupe, les chiffres sont deux fois plus élevés qu'en France hexagonale, avec une prévalence de plus de 8% (Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire, novembre 2010). Il en est de même pour l'obésité dont la prévalence en Guadeloupe, est estimée à 29% chez la femme et à 12% chez l'homme (3). Par ailleurs, alors que le diabète a une prévalence plus élevée chez l'homme en France hexagonale, celui-ci prédomine chez la femme en Guadeloupe. Il en est de même pour la répartition de l'obésité et du surpoids (3).

Un nouveau paramètre, la vitamine D, vient s'ajouter aux facteurs environnementaux classiquement impliqués dans la progression des pathologies métaboliques et cardiovasculaires. Cette vitamine agit comme une véritable hormone stéroïde, par l'intermédiaire d'un récepteur nucléaire (4, 5). Parmi les hormones stéroïdes, les androgènes sont également associés à un profil métabolique particulier et seraient impliqués soit directement, soit via leur transporteur (SHBG ou Sex Hormone Binding Protein) dans les mécanismes d'insulinorésistance chez le diabétique ou le sujet obèse (6, 7).

Chez les sujets Afro-Américains à la peau foncée, la prévalence du déficit en vitamine D est supérieure à celle des sujets à la peau plus claire du fait de la barrière mélanique aux ultra-violets B. Ce déficit en vitamine D est décrit comme un facteur de risque supplémentaire de pathologies cardiovasculaires et est impliqué dans les troubles de l'homéostasie glucidique (8, 9).

La population Guadeloupéenne (de 440000 habitants), sur laquelle porte l'essentiel de notre étude, est majoritairement d'origine Afro-Caribéenne avec une pigmentation cutanée foncée.

Notre première hypothèse de travail est que le déficit en vitamine D pourrait être associé à un profil métabolique à risque cardiovasculaire en Guadeloupe. Il nous a donc paru important d'évaluer le statut en vitamine D ainsi que ses relations avec les paramètres métaboliques dans cette population Caraïbienne. Par ailleurs, les variations de concentrations de la vitamine D semblent être liées à des polymorphismes génétiques impliqués dans son transport et son métabolisme (10). Certains de ces polymorphismes génétiques pourraient être aussi associés au déficit en vitamine D ou aux paramètres métaboliques dans cette même population Afro-Caraïbienne.

D'autre part, la répartition du diabète et de l'obésité prédominant chez la femme en Guadeloupe, nous nous sommes interrogés sur le lien possible entre les hormones stéroïdes sexuelles, la SHBG et les paramètres métaboliques. En effet, les androgènes (testostérone et œstradiol) et la SHBG semblent jouer un rôle important dans l'insulinorésistance mais les mécanismes physiopathologiques sont encore mal connus (6, 7). Ainsi, des variations des concentrations de testostérone libre, d'œstradiol et de SHBG ont été rapportées dans différentes situations d'insulinorésistance (syndrome métabolique, DT2, syndrome des ovaires polykystiques), avec des différences significatives entre les hommes et les femmes (11-13).

Notre deuxième hypothèse de travail était qu'il pourrait y avoir une relation entre les stéroïdes sexuels, la SHBG et les paramètres métaboliques expliquant cette différence de répartition du diabète et de l'obésité chez l'homme et la femme en Guadeloupe.

Avant d'évaluer ces hormones dans cette population Afro-Caraïbienne, nous avons voulu savoir si la SHBG, dont les basses concentrations sont associées à un risque de DT2, pouvait être liée à la graisse viscérale (l'un des critères cliniques du syndrome métabolique), à la graisse intra hépatique et aux hépatokines impliquées dans le métabolisme du glucose (14, 15). L'objectif était de savoir si les concentrations de SHBG pourraient être associées à un profil métabolique à risque cardiovasculaire, par l'intermédiaire d'autres paramètres que les hormones sexuelles. Pour

cela, une étude a été réalisée en collaboration avec les équipes de recherche de Rennes et d'Angers. Les analyses ont été effectuées dans une population Caucasienne de sujets dysmétaboliques, issus de la cohorte NUMEVOX.

Ce travail de thèse est donc présenté en deux parties :

- La première partie concerne nos travaux sur la vitamine D, les polymorphismes génétiques impliqués dans son métabolisme et les paramètres du syndrome métabolique en Guadeloupe. Cette partie du travail a porté sur trois types de population : sujets en insuffisance rénale terminale dialysés, sujets diabétiques de type 2, sujets témoins non diabétiques. Pour mieux comprendre le mode d'action de la vitamine D et les polymorphismes des gènes impliqués dans son métabolisme, un état des lieux du métabolisme de la vitamine D, de ses effets biologiques et de ses facteurs de régulation est réalisé avant d'aborder la description et les résultats de nos travaux.

- La deuxième partie concerne l'évaluation de la SHBG, des stéroïdes sexuels, de la graisse intrahépatique et de l'hépatokine FGF-21 dans une population caucasienne dysmétabolique, issue de la cohorte NUMEVOX et l'analyse de leurs relations avec les paramètres métaboliques.

Les résultats sont présentés dans 4 études :

- Evaluation des concentrations de la 25(OH) vitamine D et de la 1,25(OH) vitamine D chez des sujets Afro-Caribéens dialysés : relation avec les paramètres métaboliques. Ce Travail a été soumis à la revue « Annals of Nutrition and Metabolism ».
- Déficit en vitamine D, polymorphismes du *VDR* (gène codant pour le récepteur de la vitamine D) et facteurs de risque cardiovasculaire chez des sujets Caribéens diabétiques de type 2. Ce travail a été publié dans la revue « Diabetes and Metabolism ».
- Associations entre les polymorphismes des gènes *GC* et *NADSYN1*, le surpoids, la dyslipidémie et le statut vitaminique D chez des sujets Afro-Caribéens non diabétiques. Ce travail a été soumis à la revue « Obesity ».

- Stéroïdes sexuels, graisse intra hépatique et FGF21 dans l'association entre la SHBG et les paramètres dysmétaboliques. Ce travail a été soumis à la revue «Clinical Endocrinology ».

CHAPITRE II :
VITAMINE D

Depuis plus de 30 ans, les chercheurs essaient de trouver de nouveaux paramètres qui pourraient être impliqués de façon directe ou indirecte dans l'augmentation de la prévalence de l'insulinorésistance. Cette situation associée à de nombreuses pathologies métaboliques, est responsable de problèmes majeurs de santé publique comme le diabète et l'obésité.

En Guadeloupe, la population majoritairement d'ascendance africaine, est à haut risque cardiovasculaire. La prévalence du diabète y est deux fois plus élevée qu'en France Hexagonale, estimée à 8,1% (données de l'INVS, 2009), probablement sous-estimée si l'on tient compte des diabétiques qui ignorent leur maladie. Les prévalences de l'obésité et de l'hypertension artérielle en Guadeloupe, ont été évaluées respectivement à 29% et à 22% chez la femme, et 12% et 25% chez l'homme (3). Dans notre région ensoleillée, la recherche orientée vers la vitamine D est cohérente avec le souhait de trouver des marqueurs qui nous permettraient d'effectuer un dépistage et une prise en charge précoce et spécifique des pathologies métaboliques et cardiovasculaires.

II.1 Historique et identification de la vitamine D

C'est en 1865 que le Dr Armand Trousseau recommande dans son manuel de médecine clinique la consommation d'huile de foie de morue car celle-ci posséderait un facteur antirachitique. En 1919, Sir Edward Mellanby confirme que le rachitisme est lié à une carence en une substance liposoluble antirachitique, retrouvé essentiellement dans l'huile de foie de poisson (16). Quelques années plus tard (1922), McCollum et al, découvrent que les vertus antirachitiques de cette huile de foie de morue ne sont pas liées à la vitamine A mais à un deuxième facteur liposoluble appelé "vitamine depositrice de calcium", ce que d'autres équipes confirmeront (17-19).

A cette période, Armand Trousseau, Jdrzej Sniadecki, Huldschinsky puis Hess et Unger mettent en évidence le rôle thérapeutique de l'exposition à la lumière ultraviolette chez les

enfants souffrant de rachitisme (20, 21). Ils ont confirmé chez l'animal, tout comme Harry Steenbock et son équipe, l'induction d'un facteur antirachitique dans la nourriture après irradiation par les ultraviolets (UV) (22, 23).

Portraits des médecins qui ont participé à la découverte de la vitamine D :



Armand Trousseau



Edward Mellanby



Elmer V. McCollum

Par la suite, les analyses de ces substances antirachitiques ont conduit à l'identification structurale de la vitamine D2 ou Ergocalciférol (24). Les premiers cristaux de vitamine D2 et D3 purs ont été isolés respectivement en 1932 et 1936, à partir d'huile de foie de thon (25). En 1952, le docteur Woodward a réalisé la première synthèse de vitamine D3 ce qui lui a valu le prix Nobel de chimie en 1965. En 1964, Norman a mis en évidence l'existence de 3 métabolites de la vitamine D et établit la structure du calcitriol en 1971.

Depuis 1980, les récepteurs de la vitamine D et de ses métabolites ont été identifiés dans de nombreux types cellulaires et les mécanismes d'action de la vitamine D via son récepteur ont pu être déterminés (26-28).

II.2 Généralités

II.2.1 Structure chimique

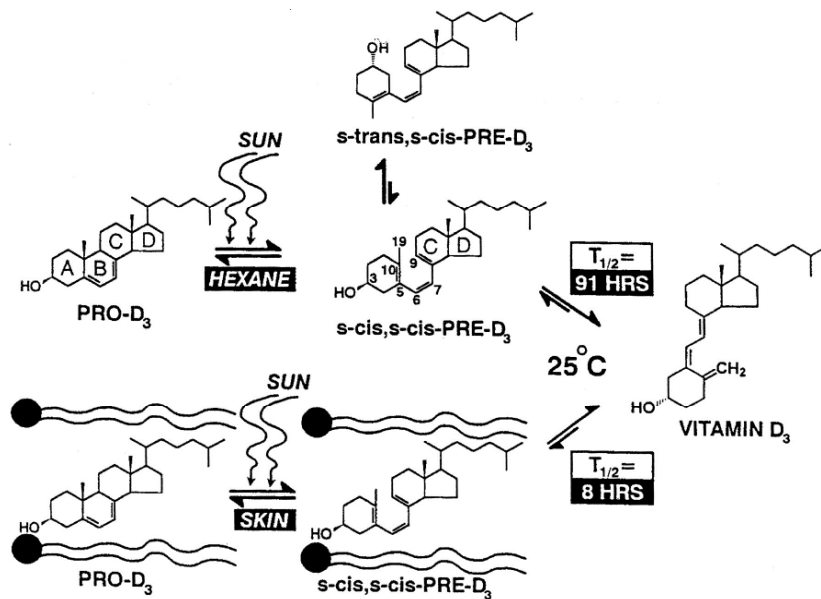
Suite à des travaux de distillation, la vitamine D₂ et la vitamine D₃ ont pu être identifiées comme étant les produits du clivage photolytique des anneaux β de l'ergostérol d'origine végétale et du 7-déhydrocholestérol (7-DHC) de la peau. L'irradiation de la peau chez l'animal entraîne la formation d'un composé dont la structure présente une chaîne latérale de cholestérol (29). Chez l'homme, ce composé appelé Cholécalférol (ou vitamine D₃) était également synthétisé au niveau de la peau, sous l'effet des rayons ultra-violets (UV) de grande longueur d'onde. Il provient de la transformation du 7 déhydrocholestérol (7-DHC) par ces UV (30).

II.2.2 Propriétés chimiques

II.2.2.1. Photoconversion de la 7-DHC en pré-vitamine D₃

Lorsque le 7-DHC absorbe ces UV, cela entraîne différentes modifications structurales : extension de l'orbitale π des carbones 8, 7, 6 et 5 en direction des carbones 10 et 19 et déplacement d'un hydrogène du carbone 19 pour saturer le carbone 9, provoquant l'ouverture du cycle B du noyau (29, 30). Suite au clivage entre les carbones 9 et 10, l'isomérisation de la structure 5,7 diène permet la formation de la forme s-cis de la pré-vitamine D₃, forme énergétiquement instable, d'où la rotation de la structure diène autour des carbones C₅ et C₆ pour former la forme s-trans, s-cis de la pré-vitamine D₃ thermodynamiquement plus stable (29, 31).

Figure 1: Photolyse du 7-DHC en pré-vitamine D3 (32)



II.2.2.2 Conversion de la pré-vitamine D3 en vitamine D3 :

L'isomérisation de la pré-vitamine D3 est la dernière étape de la synthèse de la vitamine D3 (25(OH)D) dans la peau. Cette réaction non enzymatique dépend de la température et entraîne un réarrangement intramoléculaire des molécules d'hydrogène permettant la formation de la vitamine D3 (30).

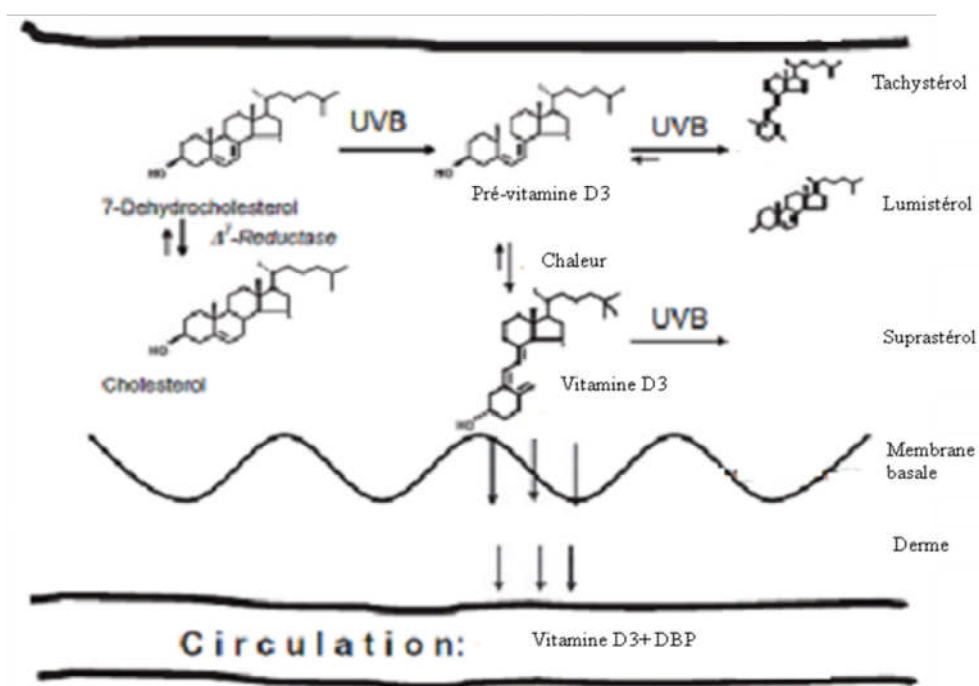
II.2.2.3 Translocation de la peau à la circulation sanguine

La vitamine D3 est ensuite transportée dans les capillaires du derme, sous la jonction derme-épiderme. Les mécanismes impliqués dans ce processus de translocation sont encore mal connus (33).

II.2.2.4 Photo-dégradation et photo-isomères de la vitamine D3

En l'absence de transfert de la vitamine D dans la circulation et en cas d'exposition prolongée de la peau aux rayons du soleil, il n'est pas observé d'accumulation ou d'effet toxique de la vitamine D3. Ce mécanisme est lié à la structure moléculaire de type triène de la vitamine D. Elle favorise l'absorption des UV solaires et la photo-isomérisation de la pré-vitamine D3 et de la vitamine D3 en ses principaux métabolites inactifs (lumistérol, tachystérol, 5,6-D transvitamine D3 et suprastérol 1 et 2). Une partie de la pré-vitamine D3 peut être aussi retransformée en 7-DHC (34, 35).

Figure 2 : Photobiologie de la vitamine D3 au niveau de la peau (36)



II.2.3 Sources et apports nutritionnels conseillés

II.2.3.1 Sources naturelles de vitamine D

La source principale de la vitamine D provient essentiellement de l'exposition de la peau aux rayons solaires UVB dont la longueur d'ondes se situe entre 290 et 315nm (31, 37, 38) mais aussi de certains aliments naturellement pourvus en vitamine D. Les sources classiques de la vitamine D étant les huiles de poissons ou de foie de poissons (morue, thon), certains poissons gras (sardines et maquereaux), le jaune d'œuf, tous naturellement riches en Cholécalciférol (vitamine D3). Certaines levures et certains champignons (type shiitake) contiennent naturellement de l'Ergocalciférol (vitamine D2).

II.2.3.2 Apport complémentaire de vitamine D

Les 50 à 75% de la 25(OH)D qui proviennent de la synthèse cutanée, ne suffisent pas à couvrir les besoins de l'organisme, particulièrement dans les populations peu exposées au soleil (39, 40).

De plus, les habitudes alimentaires qui varient d'une population à l'autre peuvent expliquer les différences de statut vitaminique D dans le Monde. Ainsi, des programmes d'enrichissement en vitamine D de certains aliments ont été mis en place par différents gouvernements afin d'y améliorer la teneur en vitamine D.

En France, des apports nutritionnels conseillés (ANC) en vitamine D ont été établis mais de nombreux experts les trouvent insuffisants : un apport de 5 µg de vitamine D par jour est recommandé chez l'enfant de plus de 3 ans et chez l'adulte (soit 200 UI/J), 10 µg/J chez l'enfant de 1 à 3 ans et la femme enceinte ou en cours d'allaitement (Martin A. Apports nutritionnels conseillés pour la population française, 3^{ème} Edition. TEC et DOC, Paris 2001, pp229-236). Les experts en nutrition ont aussi fixé un seuil de tolérance et d'innocuité de la prise de vitamine D, estimé à 60 µg/J et validé à 50 µg/J (environ 2000 UI) (41, 42).

II.3 Métabolisme et génétique

II.3.1 Métabolisme de la vitamine D

II.3.1.1 Biosynthèse

La biosynthèse de la vitamine D₃, initiée principalement dans la peau est activée grâce à des phénomènes de catalyse par des cytochromes P450 (CYP P450) (43).

Les cytochromes sont des hémoprotéines découvertes en 1925 dans certaines plantes et chez certains animaux. Ils sont formés d'une molécule d'hème fixée au niveau d'une cystéine, avec un atome de fer à l'état ferreux (Fe^{2+}). Cette structure tétrapyrrolique est capable de fixer l'oxygène moléculaire, permettant le passage de l'état ferreux à l'état ferrique (Fe^{3+}). Les cytochromes participent ainsi à de nombreux métabolismes oxydatifs. Leur structure protéique est variable et permet de distinguer plusieurs types de cytochromes classées en familles (44).

Le CYP P450 est localisé dans les cellules hépatiques et rénales (44) mais d'autres cytochromes sont impliqués dans le métabolisme de la vitamine D qui comprend deux étapes principales :

➤ La première étape est la 25 hydroxylation hépatique de la vitamine D₃ conduisant à la formation de la 25-hydroxyvitamine D₃ (25(OH)D₃ ou 25(OH)D), forme de réserve de la vitamine D₃.

L'hydroxylation hépatique implique des CYP situés dans le réticulum endoplasmique ou dans les mitochondries. Les CYP2R1, CYP2J3 et CYP3A4 sont localisés dans les microsomes (45, 46) et le CYP27A1 mitochondrial intervient dans la biosynthèse des acides biliaires (47).

La 25-hydroxylation de la vitamine D est peu régulée. Les taux de 25(OH)D augmentent en proportion de l'apport en vitamine D, c'est pour cela que la mesure des taux plasmatiques de 25(OH)D sont un meilleur indicateur du statut en vitamine D (43, 48, 49). Environ 75% de la vitamine D circulante est hydroxylée en 25(OH)D, après un seul passage dans le foie. Cette forme de la vitamine D a une faible capacité de liaison au récepteur VDR de la vitamine D et ne

permet pas d'obtenir de réponse biologique. Les 25(OH)D₂ et 25(OH)D₃, formes de réserve de la vitamine D sont localisées principalement dans le tissu adipeux, le foie et les muscles (50). La 25(OH)D a une demi-vie d'environ 2 à 4 semaines dans le sang, grâce à sa grande affinité pour sa protéine porteuse, la VDBP ou DBP (vitamin D binding protein) (51, 52).

➤ La deuxième étape correspond à l'hydroxylation de la 25(OH)D₃ en position C1, par la 1-alpha-hydroxylase rénale. Elle permet la formation de la 1,25-dihydroxyvitamine D₃ (1,25(OH)₂ D₃). Cette enzyme est située dans la membrane interne des mitochondries et appartient à la famille des cytochromes P450 mono oxygénases. Elle est aussi appelée CYP27B1 (53, 54). Elle a été clonée à partir de cellules rénales de souris (55), de rat (56) puis isolée à partir de cellules rénales humaines (57).

D'autres sites mineurs de production extrarénale de la 1,25(OH)₂ D₃ ont été identifiés : le placenta, le cerveau, la prostate, les kératinocytes, les ostéoblastes et les macrophages qui expriment aussi le CYP27B1 (58). Le CYP27B1 d'origine extrarénale ne contribuerait pas physiologiquement à la formation de la 1,25(OH)₂D₃ plasmatique, mais participerait à la régulation de sa concentration lors de situations particulières comme la grossesse, l'insuffisance rénale chronique, et dans des pathologies comme la sarcoïdose, la tuberculose, les granulomatoses, et l'arthrite rhumatoïde (58).

Une fois synthétisée, la 1,25(OH)D circule dans l'organisme et après fixation à son récepteur (vitamin D receptor ou VDR), elle agit sur ses principaux organes cibles que sont l'intestin, les os, les reins et les parathyroïdes.

La demi-vie plasmatique de la 1,25(OH)₂D est d'environ quatre heures. Sa production quotidienne est de l'ordre de 0,3 à 1 µg/j, après exposition de 30 % de la surface corporelle (bras ou jambe), de 15 à 20 minutes par jour, à une intensité lumineuse de rayonnement supérieur à 18 mJ/cm² (de Juin à octobre en Amérique et Europe du Nord, entre 10h et 15h) (59) .

II.3.1.2 Transport

La 25(OH)D₃ est faiblement hydrosoluble et hautement liposoluble. Son transport dans le sang est assuré par la protéine porteuse vitamine D binding protein (DBP). Cette protéine de 52000 Da est constituée de 458 acides aminés. En raison d'une forte liaison avec la DBP, dont les concentrations plasmatiques sont élevées (entre 0,3 et 0,5 mg/ml), toutes les molécules de 25(OH)D présentes dans la circulation lui sont liées. Seulement 0,03% de la vitamine D (équivalent à 12,4 -14,5 pmol/l) est sous forme libre (43).

Cette DBP lie plus faiblement la 1,25(OH)D (60). Elle appartient à la famille ALB/AFP/VDBP (Albumine, Alpha-Fœtoprotéine-Afamin, VDBP) dont le gène est localisé sur le chromosome 4 en 4q11-q13 (61). Elle protège les tissus de niveaux toxiques de vitamine D. Par conséquent, lorsque la concentration de la DBP est réduite, comme dans les hépatopathies chroniques, le syndrome néphrotique ou la malnutrition, il existe un risque plus important de surdosage en vitamine D. A l'inverse, dans certaines situations comme la grossesse ou la prise d'œstrogènes, les concentrations de la DPB augmentent en même temps que le risque de déficit en vitamine D (62).

Après filtration par le glomérule, le complexe 25(OH)D-DBP est internalisé dans des lysosomes après endocytose. Plusieurs protéines dont la mégaline et la cubiline interviennent dans ces processus cellulaires (63-65). La mégaline est située à la surface des cellules du tube contourné proximal du rein. Elle facilite l'endocytose du complexe 25(OH)D-DBP (63). Les niveaux cellulaires de la mégaline sont augmentés par la 1,25(OH)D₃, fournissant un mécanisme de feed-forward pour sa propre production (66). Les souris dont le gène codant pour la mégaline a été invalidé (souris knock out), ont une excrétion urinaire élevée de 25(OH)D₃ et de DBP, une carence en vitamine D et une fragilité osseuse sévère (63).

La cubiline est un récepteur endocytique du tubule rénal proximal, impliqué dans la réabsorption de la vitamine D à partir du filtrat glomérulaire mais aussi dans la conversion intracellulaire de la

25(OH)D en 1,25 (OH)D (67). Des protéines de liaison intracellulaires (IDBP ou intra cellular vitamin D binding proteins), homologues des protéines HSP (Heat Shock Proteins) se fixent à la vitamine D et la conduisent jusqu'aux mitochondries où elle va être hydroxylée en 1,25(OH)₂D₃ (68).

L'albumine et les lipoprotéines ont également un rôle majeur dans le transport de la vitamine D. Elles ont une affinité plus faible que la DBP, pour les métabolites de la vitamine D. Les lipoprotéines sont plus efficaces que la DBP pour fournir au foie, la vitamine D₃ synthétisée dans la peau, tandis que les chylomicrons lymphatiques favorisent l'absorption intestinale et hépatique de la vitamine D provenant de l'alimentation. La vitamine D et ses métabolites (25(OH)D et 1,25 (OH)D) sont absorbés au niveau de l'intestin grêle puis complexés aux sels biliaires ou aux acides gras pour leur élimination (43).

II.3.1.3 Catabolisme

La concentration circulante en 1,25(OH)₂D₃ dépend de l'importance de son catabolisme. Les dérivés de la vitamine D sont catabolisés par oxydation de la chaîne latérale en C₂₄ puis en C₂₃ puis par clivage oxydatif de la chaîne latérale. Chaque étape d'oxydation conduit à la perte progressive de l'activité biologique (28, 69). La 24-hydroxylase (CYP24A1) catalyse la conversion de la 1,25(OH)₂D₃ en 1,24,25-trihydroxyvitamine D₃ (1,24,25(OH)₃D₃), première étape dans la voie de dégradation de la vitamine D pour aboutir au produit de clivage final inactif ou acide calcitroïque. Les souris dépourvues du gène codant pour le CYP24A1, ont des taux sériques élevés de 1,25(OH)₂D₃ en raison de la baisse de leur capacité à la dégrader (70).

D'autres voies métaboliques pour le catabolisme de la 1,25(OH)₂D₃ ont été décrites permettant la conversion de la vitamine D en 1,25(R)-(OH)₂D₃-23(S), 26-lactone après hydroxylation au niveau des positions 23(S) et 26 (71). Cette lactone est un métabolite mineur de la 1,25 (OH)₂D₃ dans le sang mais semble pouvoir inhiber l'action de la vitamine D sur la résorption osseuse (72).

II.3.1.4 Rôle biologique de la vitamine D (effets classiques et non classiques)

En dehors du rôle biologique de la vitamine D sur le métabolisme du glucose, détaillé dans un des chapitres suivants, il était nécessaire de préciser les effets classiques et non classiques de la vitamine D. Ces derniers incluent les effets immunomodulateurs de la vitamine D et le contrôle de la différenciation cellulaire qui jouent un rôle important dans le métabolisme et la régulation du glucose.

Le rôle biologique de la vitamine D est assuré par la forme active 1,25(OH)₂D₃ ou calcitriol qui possède des effets génomiques et non génomiques.

II.3.1.4.1. Effets génomiques du calcitriol

Après liaison du calcitriol à son récepteur cytosolique VDR (73), celui-ci est phosphorylé puis recrute le récepteur RXR avec lequel il forme un complexe protéique. Le complexe RXR-VDR-1,25(OH)₂D se lie à des séquences génomiques spécifiques dans la région promotrice du gène appelée éléments de réponse à la vitamine D (VDRE) (74).

Le VDR peut ainsi réguler directement la transcription de certains gènes (exemple du CYP24A1) mais aussi inhiber directement la transcription d'autres gènes comme ceux de la parathormone (PTH) ou de la PTH rp (parathyroid hormone-related peptides) (38).

II.3.1.4.2. Effets non génomiques du calcitriol

Le calcitriol active une variété de systèmes de transduction du signal comme les influx de calcium, la libération du calcium à partir des réserves intracellulaires, la modulation de l'adénylate cyclase ou de la phospholipase C, l'activation des protéines kinases C et D (PKC, PKD), des protéines MAP (Mitogen Activated Protein) et des RAF Kinases.

Les effets non génomiques incluent ainsi la régulation du métabolisme des seconds messagers intracellulaires (phosphoinositide, cyclic guanosine monophosphate ou cGMP). Ils ont été décrits dans de nombreuses cellules comme les kératinocytes, les entérocytes, les cellules musculaires, les ostéoblastes et les chondrocytes. Ces effets impliquent des récepteurs membranaires comme la protéine MARRS (Membrane-Associated Rapid Response Steroid binding protein) (75).

II.3.1.4.3 Effets « classiques » de la vitamine D

Le rôle biologique le mieux connu de la 1,25(OH)₂ D₃ est le maintien de l'homéostasie phosphocalcique via son action au niveau de 3 tissus cibles principaux:

II.3.1.4.3.1 Effet sur l'os

La vitamine D participe au maintien de l'équilibre phosphocalcique. En situation d'hypocalcémie, elle active de façon directe la résorption osseuse en favorisant la différenciation et l'activation des cellules souches mésenchymateuses de l'os en ostéoclastes. Au niveau des ostéoblastes, la 1,25(OH)D₃ stimule la production de RANKL, cytokine qui stimule la résorption osseuse par les ostéoclastes (76). L'influence directe des concentrations de la 1,25(OH)D₃ sur les parathyroïdes explique aussi son effet sur l'os (77). Les parathyroïdes sont des glandes situées au niveau du cou, au contact de la face postérieure de la thyroïde. Elles sécrètent la parathormone (PTH), hormone polypeptidique de 84 acides aminés, dont le facteur stimulant principal est l'hypocalcémie (78).

II.3.1.4.3.2 Effet sur l'intestin

La vitamine D intervient dans la régulation de l'absorption intestinale du calcium alimentaire et des phosphates. Néanmoins, son influence sur l'absorption intestinale du calcium est lente car elle nécessite la synthèse de la protéine de Wasserman ou TRPV6. Dans la cellule intestinale, la 1,25(OH)D favorise la synthèse de cette protéine, transporteur du calcium et encore appelé

CaT1. TRPV6 crée un canal calcique au niveau de la bordure en brosse apicale de l'entérocyte, permettant l'entrée de calcium dans la cellule (79). De plus, la 1,25(OH)D₃ régule aussi l'absorption du magnésium, ion en compétition avec le calcium car ils utilisent tous deux le même mécanisme de transport.

L'absorption intestinale du calcium est aussi favorisée par une protéine cytosolique de 9kDa, possédant deux domaines de liaison au calcium (80, 81). Cette protéine, appelée calbindine 9K est régulée par la 1,25(OH)D₃ (82, 83) La déficience fonctionnelle de la calbindine 9K, en terme d'absorption calcique, peut être compensée par l'activité de TRPV6, sous l'induction de la 1,25(OH)D₃ (84). En parallèle, l'entrée des phosphates dans l'entérocyte est favorisée par des processus de diffusion passive des ions phosphates (79) ou après activation de la protéine Npt2b (co-transporteur sodium-phosphate) (85). Ce mécanisme est prépondérant lorsque les apports calciques ou phosphorés sont faibles, dans certaines conditions physiologiques (comme la croissance ou la grossesse) ou dans certaines pathologies (granulomatoses, hyperparathyroïdie).

II.3.1.4.3.3 Effet sur le rein

La 1,25(OH)D augmente la réabsorption tubulaire du calcium par son action directe sur le canal épithélial calcique (ECaC) (86). Néanmoins, son influence est plus modeste que celle de la PTH, ce qui rend compte de l'hypercalciurie habituellement constatée chez les sujets hypoparathyroïdiens ou pseudohypoparathyroïdiens soumis au traitement vitamino-calcique (87, 88). De plus, en synergie avec la PTH, la 1,25(OH)D augmenterait le nombre de canaux calcium TRPV5 (Transient Receptor Potential channel Vanilloid subtype 5), indispensables à la réabsorption du calcium et des phosphates (89).

II.3.1.4.4 Effets « non classiques » de la vitamine D

À côté de son rôle bien établi dans la régulation de l'homéostasie phosphocalcique, la vitamine D possède d'autres fonctions physiologiques telles que des effets immunomodulateurs ainsi qu'une implication dans le contrôle de la différenciation de nombreux types cellulaires.

II.3.1.4.4.1 Vitamine D et muscles

La 1,25(OH)D a une action directe sur la croissance et la différenciation du muscle squelettique. Ainsi, la fatigue ou l'atrophie des muscles squelettiques associées à des anomalies électrophysiologiques de contraction et de relaxation sont retrouvées dans les néphropathies chroniques, dans les pathologies rachitiques ou l'ostéomalacie liées à une carence en 1,25(OH)D mais aussi dans les pancréatopathies et les situations de malabsorption de la vitamine D (90-92).

La vitamine D aurait un effet génomique direct sur la taille des fibres musculaires et un effet non génomique sur la contraction musculaire par activation de la PKC qui augmente le pool calcique intracellulaire (93).

II.3.1.4.4.2 Vitamine D et système cardiovasculaire

Le statut en vitamine D pourrait jouer un rôle dans la survenue de pathologies cardiovasculaires. Certaines études ont mis en évidence une association significative entre des concentrations basses de vitamine D et la survenue de pathologies cardiovasculaires (8, 94, 95). Les mécanismes impliqués sont encore mal compris mais on sait que les cardiomyocytes et les cellules endothéliales vasculaires expriment le VDR et la 1-alpha hydroxylase. Leur prolifération et leur activité contractile peuvent ainsi être régulées par la 1,25(OH)D (96-100).

D'autres situations telles que l'hypertension artérielle ou l'insuffisance cardiaque seraient également associées à une insuffisance en vitamine D (101, 102).

La 1,25(OH)D interviendrait notamment dans la régulation du système rénine angiotensine, en modulant l'expression du gène de la rénine indépendamment de la calcémie. La relation de causalité n'est pas clairement établie et plusieurs facteurs étiologiques ou confondants ont été évoqués. Les associations décrites entre concentrations de vitamine D et les autres facteurs de risque cardiovasculaire (diabète, obésité, dyslipidémie) amplifient cette association entre vitamine D et risque cardiovasculaire (103-105).

II.3.1.4.4.3 Vitamine D et système immunitaire

La vitamine D intervient dans la régulation du système immunitaire avec un rôle inhibiteur de l'immunité acquise et un rôle activateur de l'immunité innée. Plusieurs cellules du système immunitaire comme les lymphocytes T et B, les macrophages et les cellules présentatrices d'antigène expriment le VDR et la 1-alpha-hydroxylase (106). La prolifération lymphocytaire Th1 et la production de certaines cytokines comme l'IL2 et l'interféron gamma sont ainsi diminuées par la 1,25(OH)D (107).

Différentes études ont rapporté l'effet bénéfique de la 1,25(OH)D sur l'incidence de certaines pathologies auto-immunes comme le diabète de type 1, le lupus, la polyarthrite rhumatoïde, la sclérose en plaques et les thyropathies auto-immunes, d'abord dans des modèles animaux puis chez l'homme (108-114).

Un aspect important des actions immunosuppressives de la 1,25(OH)D est son utilisation thérapeutique dans le contrôle des maladies auto-immunes comme le lupus érythémateux systémique, la polyarthrite rhumatoïde, la sclérose en plaques juvénile (type I), le diabète, l'encéphalomyélite allergique expérimentale chez la souris. La vitamine D diminue à la fois le taux de prolifération et l'activité des cellules T et B, et induit la disponibilité des cellules T suppressseurs (115).

II.3.1.5 Dosage biologique de la vitamine D

Une grande partie de ce travail de thèse porte sur la vitamine D, molécule liposoluble dont le dosage plasmatique a fait l'objet de plusieurs interrogations : quelles sont les techniques de dosage de vitamine D actuellement disponibles ? Quelle est la forme de vitamine D réellement dosée par les dispositifs de dosage?

Une mise au point sur le dosage biologique de la vitamine D est ainsi faite dans ce chapitre.

II.3.1.5.1 Techniques de dosage

C'est le dosage de la 25(OH)D qui permet d'évaluer le statut vitaminique D des individus. Son coût est d'environ 21,60 euros (B80). Dans les situations d'insuffisance en vitamine D, les concentrations de la forme active (1,25(OH)D) peuvent être basses, normales ou élevées et ne reflètent pas le stock de l'organisme en vitamine D (38).

La technique de dosage actuellement la plus utilisée est l'immunodosage. La 25(OH)D étant plus stable dans le sérum que dans le plasma, probablement du fait de sa liaison à la DBP (116, 117) est idéalement dosée sur le sérum. Les techniques de dosage recommandées doivent permettre de doser les 2 formes de vitamine D (25(OH)D₂ et D₃) au risque d'une mauvaise évaluation du statut vitaminique des patients (118).

Le problème actuel est de définir des valeurs de référence de la 25(OH)D qui soient adaptées à la pratique clinique d'autant plus que les concentrations de vitamine D varient en fonction de la latitude, de la saison climatique, de l'altitude, de la pigmentation de la peau et de l'âge (119, 120).

Les normes fixées ont été établies dans des situations extrêmes : norme inférieure (10 nmol/l ou 4 ng/ml) chez des sujets noirs, prélevés en hiver à des latitudes supérieures à 40° et norme supérieure (75 nmol/l ou 30 ng/ml) chez des Caucasiens en zones d'ensoleillement intense. Pour les cliniciens, la situation d'insuffisance ou de déficit en vitamine D est celle qui entraîne des

effets néfastes (notamment sur l'os). Ainsi, les seuils de vitamine D, responsables d'une hyperparathormonémie, peuvent être considérés comme anormaux chez des sujets ayant une fonction rénale normale (121-123). La valeur seuil de 30 ng/ml (75 nmol/l) est ainsi retenue par de nombreux experts (42). Le coefficient de variation analytique (c'est à dire intra ou inter essai) est de 5 à 10% selon les techniques de dosages (124).

Les seuils retenus pour définir le statut vitaminique D correspondent à des concentrations de 25(OH)D < 10 ng/ml (25-30 nmol/l) pour le déficit profond (carence), entre 10 et 20 ng/ml (25-50 nmol/l) pour le déficit modéré et entre 20 et 30 ng/ml (50-75 nmol/l) pour l'insuffisance en vitamine D.

L'AFSSAPS a précisé l'ensemble des dispositifs de dosage de vitamine D disponibles sur le marché français avec leurs spécificités respectives (tableau 1).

Tableau 1: Dispositifs de dosage de la vitamine D en France (AFSSAPS – juillet 2009)

FABRICANT	NOM DU DISPOSITIF	REACTIONS CROISEES
Biosource	25 (OH)-vit D3-RIA CT	25 OH-Vit D3-100% 25 OH-Vit D2-0,6% 1,25 (OH) ₂ -Vit D3-84%*
Diasorin	Liaison 25(OH)-Vitamine D totale 25-Hydroxyvitamin D- ¹²⁵ I RIA kit	25 OH-Vit D2-104% 25 OH-Vit D3-0,6% 1,25 (OH) ₂ -Vit D2-40%* 1,25 (OH) ₂ -Vit D3-17%* 25 OH-Vit D2-100% 25 OH-Vit D3-100% 1,25 (OH) ₂ -Vit D2-11%* 1,25 (OH) ₂ -Vit D3-11%*
IDS	25 Hydroxy vitamin D EIA 25-HydroxyvitaminD RIA	25 OH-Vit D2-75% 25 OH-Vit D3-100% 25 OH-Vit D2-75% 25 OH-Vit D3-100%
Roche diagnostics	Vitamine D3 (25-OH)	25 OH-Vit D2<10% 25 OH-Vit D3-100% 1,25 (OH) ₂ -Vit D3-100%*

* les concentrations des formes 1,25(OH)D sont environ 1000 fois plus basses que les concentrations des formes 25(OH)D

II.3.1.6 Aspects pharmaceutiques de la vitamine D en France

Dans notre hypothèse de travail, la mise en évidence possible d'un déficit important en vitamine D devrait nous conduire à la substitution des sujets étudiés. Il était donc souhaitable de faire une mise au point des recommandations en terme de traitement substitutif de la vitamine D (forme de vitamine D, posologie et durée de traitement).

II.3.1.6.1 Formes pharmaceutiques (d'après le Vidal 2011)

Sont exclues les formes pharmaceutiques de vitamine D en application locale

Cholécalciférol ou vitamine D naturelle (vitamine D3)

- ZYMAD (gouttes de 150 ou 300 UI, ampoules de 80 000 ou 200 000 UI)
- ZYMADUO (gouttes de 300 UI)
- FLUOSTEROL (doses de 800 UI)
- VITAMINE D3 B.O.N (ampoules de 200 000 UI)
- UVEDOSE (ampoules de 100 000 UI)

Ergocalciférol (vitamine D2)

- STEROGYL (gouttes de 400 UI, ampoules de 600 000 UI)
- UVESTEROL (doses de 1500 UI)
- UVESTEROL ADEC (pipette de 1ml)

Dérivés hydroxylés en C25 de la vitamine D3

CALCIFEDIOL (25(OH)D3): DEDROGYL (gouttes de 5µg)

Dérivés hydroxylés en C1 de la vitamine D3

ALFACALCIDOL: UN ALFA

(Gouttes de 0,1-0,25-0,5 ou 1µg ou forme IV)

Dérivés dihydroxylés de la vitamine D3

CALCITRIOL : ROCALTROL (capsules de 0,25µg)

Il existe aussi des formes pharmaceutiques associant 400 à 880 unités de Cholécalférol et 500 à 1200 mg de calcium.

II.3.1.6.2 Quel type de vitamine D choisir?

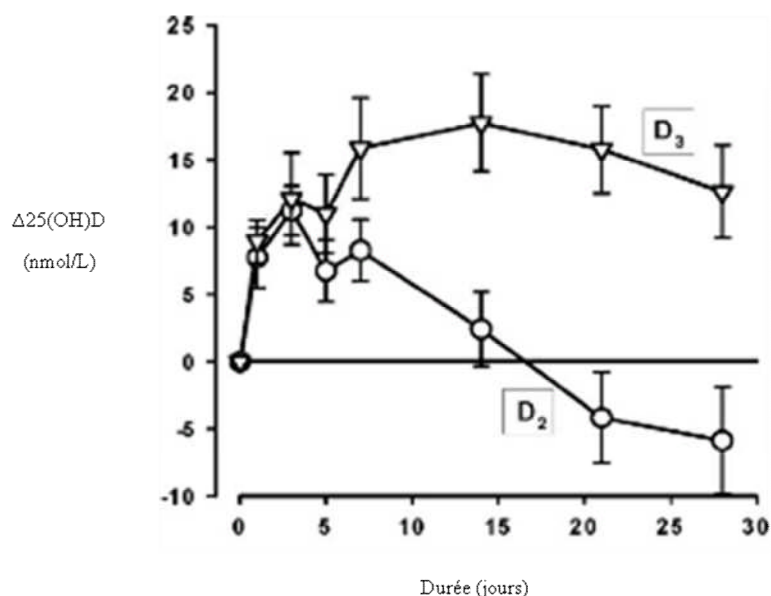
En France, en dehors des compléments alimentaires et des polyvitamines, les vitamines D2 et D3 sont administrées sur prescription médicale et remboursées par la sécurité sociale. Les études sont divergentes sur le choix de la vitamine D à utiliser. Certaines de ces études ont mis en évidence une efficacité similaire de la vitamine D2 et de la vitamine D3 en terme de maintien de l'homéostasie phosphocalcique avec l'obtention de concentrations circulantes appropriées de 25(OH)D (125, 126). D'autres concluent en la moindre efficacité de la vitamine D2 sur le maintien des concentrations sériques de 25(OH)D malgré des posologies élevées de l'ordre de 4000 UI/J pendant 2 semaines. Avec ce schéma thérapeutique, les concentrations de 25(OH)D étaient plus rapidement augmentées avec la vitamine D3 administrée à la même posologie que la vitamine D2 (127).

De même, la vitamine D3 administrée à 50 000 UI en 1 fois augmente et maintient des niveaux de 25(OH)D à un degré trois fois plus élevé que la vitamine D2 administrée à la même dose. Les deux formes permettent d'obtenir des concentrations similaires de 25(OH)D jusqu'au 3^{ème} jour, puis les concentrations sériques de 25(OH)D chutent chez les sujets traités par la vitamine D2 contrairement aux sujets traités par la vitamine D3 (128). Ces résultats sont en accord avec des données antérieures qui suggéraient que la vitamine D2 avait un métabolisme et une clairance plus rapide que la vitamine D3 et que la vitamine D3 avait une plus forte affinité pour la DBP que la forme D2 expliquant sa stabilité (129-132).

Par ailleurs, avec des posologies plus élevées (prise unique de 300 000U), l'effet du Cholécalférol (D3) sur la baisse de la PTH et du turn over osseux est supérieur à celui de l'Ergocalciférol (D2) (133).

En définitive, la majorité des études résumées dans la méta analyse récente de Tripkovic et al (2012) suggèrent une efficacité supérieure de la vitamine D3 comparée à celle de la vitamine D2 (de l'ordre de 30 à 50%), en terme de maintien des concentrations sériques de 25(OH)D (134).

Figure 3: Evolution des concentrations de 25(OH)D après prise de vitamine D2 ou D3 (128)



II.3.1.6.3 Quelle dose de vitamine ? À quel rythme?

Les études sont hétérogènes en terme de posologie de vitamine D administrée, si bien qu'il n'est pas toujours facile de les comparer.

Certains optent pour l'administration de fortes doses de vitamine D en une fois, variant de 50 000 UI à 300 000 UI, espacées de 3 à 6 mois (133) et d'autres pour l'administration quotidienne de la vitamine D avec des posologies entre 1000 UI et 5000 UI/J (135). Un apport de 1000 UI/J de vitamine D pendant au moins 6 mois permettrait d'augmenter la concentration sérique de 25(OH)D de 10 ng/ml (25 nmol/l) (135).

Un apport de vitamine D de 800 à 5000 UI/J assure aussi une qualité normale de l'appareil musculosquelettique (baisse de l'incidence des chutes et des fractures chez le sujet âgé de plus de

65 ans) et une dose cumulée de 600 000 UI administrées de façon fractionnée sur plusieurs semaines permet de rétablir le stock de 25(OH)D en présence d'un déficit initial (136).

Une autre étude, randomisée et contrôlée versus placebo, a mis en évidence une diminution significative du nombre de fractures après 5 ans de suivi chez des sujets traités par la vitamine D3 administrée tous les 4 mois à la dose 100 000 UI.

Devant l'hétérogénéité des schémas thérapeutiques, Van Groningen et al ont proposé une formule pour calculer la dose de Cholécalférol nécessaire pour atteindre une concentration sérique de 25(OH)D3 de 75 nmol/l : $40 \times (75 - [25(OH)D] \text{ sérique}) \times \text{poids du sujet}$ (137).

La prescription de la vitamine D est donc loin d'être consensuelle et doit être adaptée au cas par cas (138). L'avantage de la dose unique est l'obtention d'une meilleure compliance du patient, paramètre majeur d'efficacité de la vitamine D sur la survenue des fractures (139).

En France, la vitamine D naturelle est privilégiée pour la correction des situations de carence ou de déficience en vitamine D. Elle est prescrite sous forme de gouttes en présence d'une insuffisance hépatique ou d'une malabsorption. Les formes métaboliquement actives (alphacalcidol, calcitriol) sont réservées aux situations où est recherché un effet pharmacologique (hypoparathyroïdie, pseudohypoparathyroïdie, insuffisance rénale chronique (140).

Le schéma ci-dessous résume les possibilités thérapeutiques possibles en France :

Situation à risque de carence: mesure de prévention

Sujets âgés (> 65ans)

Uvedose 100 000 UI/3mois

Grossesse : au 6^{ème} mois

Uvedose 100 000UI : 1 ampoule

Hépatopathie ou thérapeutique chronique responsable d'une hypovitaminose D :

Dédrogyl : 5 à 25 µg/j

Surveillance : calcémie et calciurie à

1 ou 3 mois puis annuellement

- Nouveaux-nés jusqu'à 2 ans : 400 à 500 U/J si lait enrichi

- 1 000 à 1500UI/J si allaitement ou lait non enrichi

- Enfants jusqu'à 5ans : Uvedose 100 000 UI l'hiver, à renouveler après 3 mois

Situation de carence ou d'insuffisance en vitamine D

Insuffisance en vitamine D (10-30 ng/ml)

- **Si phosphatémie normale:** Uvedose 100 000 UI répétées à 1 mois et 3 mois puis mesure de prévention

- **Si hypophosphatémie:**

.Uvedose 100 000 UI /mois jusque normalisation des phosphates

.Dosage de la 25(OH)D souhaitable 6 à 12 mois après traitement

Carence en vitamine D

(< 10 ng/ml)

- 2 ampoules d'Uvedose 100 000 UI/mois pendant 2 mois

- **Si hypophosphatémie persistante** : dosage de la 25(OH)D souhaitable 6 à 12 mois après traitement

Rappels des unités et équivalences

1 UI = 25 ng de vitamine D ; 1000 UI = 25 µg de vitamine D

40 000 UI = 1 mg de vitamine D ; 400 U = 10 µg de vitamine D

II.3.1.6.4 Quelle durée de traitement?

La durée de la substitution vitaminique D n'est pas non plus codifiée et dépend de l'objectif du traitement.

Toutes les études citées précédemment ont des durées de traitement variable. Dans tous les cas, l'évaluation de la tolérance clinique du traitement doit être régulière et dans certains cas, il peut être nécessaire de surveiller le bilan phosphocalcique et de contrôler les concentrations sériques de 25(OH)D.

Dans la majorité des études d'intervention, les doses de vitamine D administrées sont bien tolérées, sans majoration des effets physiologiques de la vitamine D (hypercalcémie, hypercalciurie, lithiase ou néphrocalcinose) chez des sujets ayant une fonction rénale normale (135, 141-144).

Même pour des posologies élevées, variant de 4000 UI/J jusque 280 000 UI par semaine, il n'a pas été noté d'effets délétères sur la calcémie et la calciurie chez des sujets sans dysfonction rénale (133, 145-147).

Pour assurer le maintien d'une concentration sérique de 25(OH)D >30 ng/ml, on peut proposer la prise de 100 000 UI de vitamine D3 tous les 2 ou 3 mois, ou des doses journalières de vitamine D3 (800 à 1200 UI selon les experts) si les apports calciques sont insuffisants ou de vitamine D2 (lorsqu'on ne veut pas associer la vitamine D à du calcium).

II.3.2 Régulation

L'étude de la vitamine D nécessite de bien appréhender tous les facteurs impliqués dans sa régulation, et qui peuvent influencer les effets biologiques de la vitamine D en particulier sur les paramètres métaboliques. Ce paragraphe fait un état des lieux de ces différents facteurs.

II.3.2.1 Paramètres environnementaux et physiologiques

La régulation de la 25(OH)D dépend de l'exposition aux UVB, de l'apport alimentaire mais aussi du bon fonctionnement de tous les paramètres impliqués dans la synthèse de la pré-vitamine D3. En plus d'une régulation physiologique, des paramètres environnementaux participent à la régulation des concentrations de 25(OH)D.

II.3.2.1.1 Influence des saisons, de l'altitude et de la latitude

Depuis plus de 50 ans, l'influence des saisons, de l'altitude et de la latitude sur l'incidence du rachitisme a été rapportée. Celle-ci augmente en période hivernale et diminue pendant l'été (148, 149). En effet, le nombre de rayons UVB atteignant la biosphère dépend de l'angle zénithal solaire, de la latitude, de la saison et du moment de la journée. Le rôle de ces facteurs environnementaux dans la production cutanée de vitamine D a été confirmé par plusieurs équipes (37, 148, 150). L'intensité du rayonnement UV doit être supérieure à 18 mJ/cm^2 pour être efficace et cette intensité n'est atteinte qu'entre les mois de Juin et d'Octobre, aux latitudes de 40° - 50° Nord ou Sud, d'où une fluctuation saisonnière importante. La production de 25(OH)D est alors plus faible aux latitudes élevées (148, 151).

II.3.2.1.2 Effets des crèmes solaires et des vêtements

L'utilisation d'écran solaire (agents anti UV) peut diminuer l'effet bénéfique du soleil et la photo conversion du 7-DHC en pré-vitamine D3 (152). Le port de vêtements diminue aussi la transmission des UV à la peau (153) et le type de tissage (vêtements d'été et d'automne) pourrait influencer l'absorption cutanée des UV (154).

II.3.2.1.3 Effets de l'âge

Du fait du vieillissement de la peau, la production de la vitamine D décroît avec l'âge. Dès l'âge de 20 ans et au-delà, l'épaisseur cutanée diminue linéairement (155) associée à une baisse de la concentration épidermique en 7-DHC (156).

II.3.2.1.4 Rôle de la pigmentation cutanée

L'exposition au soleil est le principal déterminant du statut en vitamine D chez l'homme (35). Dans les latitudes nordiques (de novembre à Mars), les rayons UV-B sont insuffisants pour assurer l'apport physiologique nécessaire en vitamine D si bien que la prévalence de l'insuffisance en vitamine D y est importante (125).

Par ailleurs, à exposition solaire égale, plusieurs études ont mis en évidence des différences de statut vitaminiq ue D dans des populations à la peau noire comparées à des populations à la peau blanche (40) confirmant le rôle de la pigmentation de la peau comme barrière à la synthèse de la vitamine D (157, 158).

Les conséquences sur l'os ne sont pas négligeables puisqu'en parallèle, le risque de fracture osseuse et d'ostéoporose est majoré dans les populations à la peau foncée comparées à des populations à la peau plus claire (159, 160).

Les populations vivant ou migrant dans des zones éloignées de l'Equateur ont une pigmentation cutanée qui diminue progressivement si bien qu'elles adaptent leur production de vitamine D3 pour maintenir l'homéostasie osseuse (149, 161). La mélanine située dans les cellules cutanées, absorbe les radiations solaires dont la longueur d'onde est comprise entre 290 et 700 nm. En cas de forte concentration de mélanine au niveau de la peau, la pigmentation augmente et la production cutanée de vitamine D diminue. Ces effets de la pigmentation de la peau sur la synthèse de vitamine D sont bien connus (161-163). D'abord, des expériences in vitro, après exposition solaire de courte durée ont mis en évidence, l'absence de conversion du 7-DHC en pré-vitamine D3 au niveau de cellules de l'épiderme en cas de pigmentation de type 5 (épiderme de peau noire) contrairement au type 2 (épiderme de peau blanche). Ce n'est qu'après une exposition solaire prolongée, que les premières concentrations de pré-vitamine D3 apparaissent au niveau du type de peau 5 (164). Il en est de même pour l'homme chez lequel l'exposition solaire doit être augmentée en cas de peau foncée, pour permettre une synthèse cutanée de pré-vitamine D3 suffisante (161, 163).

II.3.2.1.5 Rôle de la PTH

L'activité de la 1-alpha-hydroxylase rénale est étroitement régulée par la PTH, le calcium, le phosphore et la 1,25(OH)D elle-même (165). L'étape qui limite la bioactivation de la vitamine D est l'alpha hydroxylation rénale par le cytochrome P450c1a (166). Dans certaines tubulopathies génétiques (rachitisme hypophosphatémique liées à l'X, syndrome de Fanconi) ou acquises (déficit autosomique récessive en 1-alpha-hydroxylase dans les rachitismes vitamine D dépendant de type I), cette étape peut être altérée (167, 168).

De même, la parathyroïdectomie s'accompagne d'une baisse de production de la 1,25(OH)D liée à la diminution de l'activité de la 1-alpha-hydroxylase rénale malgré l'hypocalcémie. L'apport de PTH à des animaux parathyroïdectomisés ou sains s'accompagne d'une augmentation de la

production de 1,25(OH)D₃ (169), confirmant le rôle essentiel de l'hormone sur la forme active de la vitamine D. Ces effets de la PTH sont exercés directement sur les cellules tubulaires proximales rénales (170) et sont médiés par l'AMPc (171).

De plus, la PTH diminue l'activité de la 24-hydroxylase et ralentit la dégradation de la 1,25(OH)D₃. Une ancienne étude a montré que le traitement par PTH modifie les niveaux de l'ARNm de la 1alpha-hydroxylase (172).

II.3.2.1.6 Rôle du calcium

Dans l'os, la PTH et la 1,25(OH)D activent la mobilisation du calcium osseux et la réabsorption rénale du calcium des urines vers le sang (173). En situation d'hypocalcémie, le récepteur du calcium situé sur les parathyroïdes active la sécrétion de PTH. Ce récepteur a été identifié et cloné à partir de parathyroïdes bovines (174). Une régulation des taux de 1,25(OH)D par le calcium extracellulaire a été mise en évidence chez des rats après parathyroïdectomie et pourrait permettre de moduler de façon efficace la production et les concentrations de 1,25(OH)D en modifiant l'activité de la 1-alpha hydroxylase rénale (175). Une autre étude a mis en évidence une suppression directe de l'activité de la 1-alpha hydroxylase et de son ARNm par le calcium, dans une lignée humaine de cellules du tubule proximal rénal (176).

II.3.2.1.7 Rôle des phosphates

Le rôle des phosphates en tant que régulateur du métabolisme de la vitamine D est bien établi. La restriction de phosphate alimentaire augmente l'activité de la 1-alpha-hydroxylase rénale et les taux sériques de 1,25(OH)D₃ (177, 178). Le mécanisme impliqué est encore flou, mais il semble être indépendant de la PTH (177) et des modifications de la calcémie (179).

D'autres études ont montré que lors de courtes périodes de privation en phosphate, les niveaux de phosphate corticaux n'étaient pas diminués alors que les taux sériques de 1,25 (OH)₂ D₃ et de 1-alpha hydroxylase étaient élevés (180).

Enfin, des concentrations basses de phosphate diminuent la transcription du gène de la 24 hydroxylase et préviennent le catabolisme de la 1,25(OH)₂D₃ ce qui suggère le rôle d'autres facteurs non encore identifiés dans ces voies du métabolisme de la vitamine D (181).

II.3.2.1.8 Rôle de l'acidose

L'acidose métabolique modifie le métabolisme de la vitamine D par deux mécanismes principaux :

- elle émousse l'action de la PTH sur la 1-alpha hydroxylase du tubule contourné proximal (182)
- elle augmente l'activité de la 24-hydroxylase ce qui majore la dégradation de la 1,25(OH)₂D₃ (183).

Une autre conséquence de l'acidose est l'augmentation du calcium ionisé en raison de la baisse du PH sanguin. Cette augmentation du calcium ionisé pourrait être responsable de l'altération du métabolisme de la vitamine D puisque l'EDTA, chélateur du calcium, bloque l'effet de l'acidose sur les niveaux de calcitriol, sans changer le pH du sang (184). Ainsi l'acidose diminue les niveaux sériques de 1,25(OH)₂D₃ en augmentant le calcium ionisé et en diminuant la réactivité du rein à la PTH.

II.3.2.1.9 Autorégulation de la 1,25(OH)D

Il existe un rétrocontrôle de la 1,25(OH)D₃ sur sa propre synthèse et son catabolisme, ce qui crée une boucle de régulation évitant l'intoxication par la vitamine D. Physiologiquement, la 1,25(OH)D stimule la transcription du gène de la 24-hydroxylase, impliquée dans son catabolisme. Chez l'animal déficient en vitamine D, l'activité de la 1-alpha hydroxylase est maximale alors que celle de la 24-hydroxylase est basse ou indétectable (185).

La 1,25(OH)D₃ stimule aussi le transport du calcium et du phosphore de la lumière intestinale au sérum et participe ainsi au maintien de l'homéostasie phosphocalcique (186).

II.3.2.1.10 Rôle d'autres hormones: insuline, IGF1

D'autres hormones sont impliquées dans la régulation phosphocalcique.

L'hormone de croissance (GH) et l'IGF1 (Insulin Growth Factor-1) interviennent comme médiateurs de la régulation de l'activité de la 1-alpha hydroxylase en réponse à l'hypophosphatémie (187, 188).

La restriction alimentaire en phosphates stimule l'activité de la 1-alpha hydroxylase mais celle-ci est réduite chez les rats après hypophysectomie (189). Après injection d'hormone de croissance et un faible apport phosphaté, la réponse de la 1-alpha hydroxylase est restaurée (190). En parallèle, chez les rats rendus diabétiques par l'apport de streptozotocine et privés de phosphates dans leur alimentation, on observe une baisse de la stimulation de la 1-alpha hydroxylase, réversible après administration d'insuline (191).

D'autres facteurs phosphaturiques appelés phosphotonines sont considérés comme des régulateurs de la 1,25(OH)D, notamment par leur action sur le gène de la 1-alpha-hydroxylase.

Le FGF-23 (fibroblastic growth factor 23) sécrété par les ostéocytes, fait partie de ces facteurs qui inhibent l'hydroxylation rénale et la synthèse de la 1,25(OH)D (192).

II.3.2.1.11 Rôle des enzymes CYP

La régulation du métabolisme de la vitamine D dépend aussi des cytochromes impliqués dans son métabolisme (CYP27A1 et CYP27B1, CYP24A1).

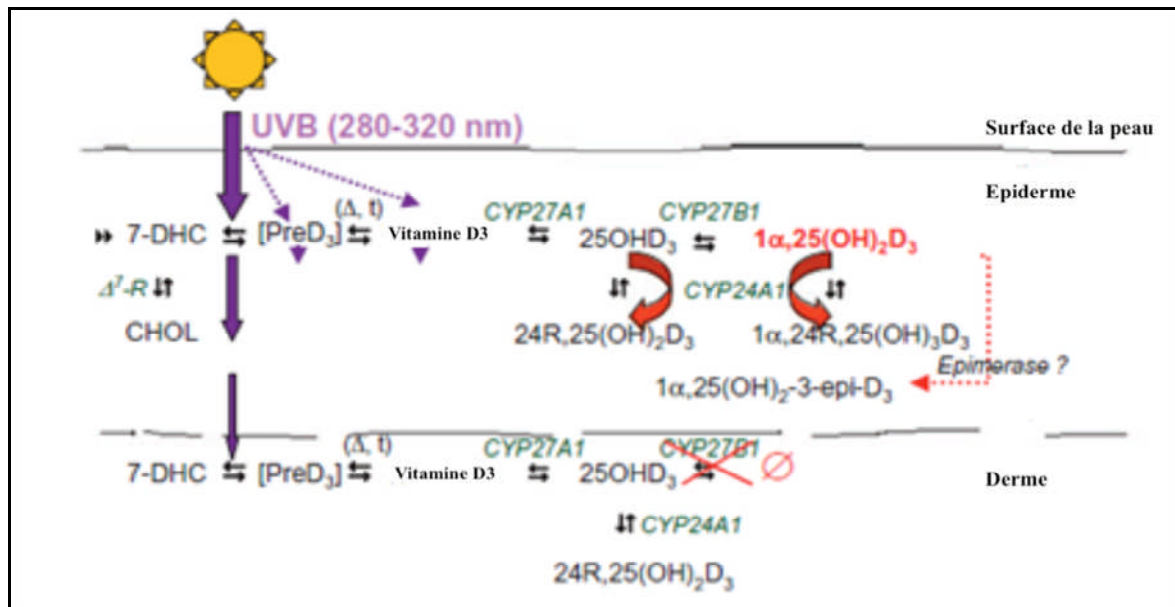
Dans le foie, l'activité du CYP27A1 est modulée à l'étape transcriptionnelle par des récepteurs nucléaires comme PPAR α et γ , dont les ligands sont des acides gras polyinsaturés (193-196).

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 pour le CYP24A1 (197). Ainsi, les médicaments anticonvulsifs, activateurs de PXR, de même que les corticostéroïdes, peuvent conduire à un déficit en vitamine D. Lorsque ces médicaments sont prescrits au long cours, un apport supplémentaire en vitamine D peut s'avérer nécessaire.

Dans le rein, c'est le CYP27B1 qui intervient dans la régulation de la production de la 1,25(OH)D₃ mais les mécanismes moléculaires impliqués sont encore mal connus. L'IGF-1, l'insuline, la calcitonine et le FGF-23 interviennent également dans la régulation de la CYP27B1 (166, 198-200).

Le récepteur VDR de la vitamine D inhiberait aussi l'expression du CYP27B1 dans le rein. Cette répression résulterait de la liaison de l'hétérodimère VDR/RXR à un facteur de transcription de type bHLH (basic helix-loop-helix), capable d'interagir avec un motif consensus (boîte E) présent sur le promoteur de *CYP27B1* (201).

Figure 4: Rôle des cytochromes dans le métabolisme de la vitamine D au niveau de la peau (36)



In vitro, d'autres tissus d'origine extrarénale (placenta, prostate, kératinocytes, macrophages, lymphocytes T, cellules dendritiques, ostéoblastes, cellules cancéreuses du poumon, de prostate et de peau) peuvent convertir enzymatiquement la 25(OH)D en 1,25(OH)D (202-207). Certains de ces tissus comme les kératinocytes possèdent les systèmes nécessaires au métabolisme de la vitamine D, permettant notamment l'inactivation du calcitriol en acide calcitroïque par la CYP24A1(208).

Figure 5: Rôle des différents cytochromes au niveau de la synthèse rénale et extrarénale de la 1,25(OH)D (36)

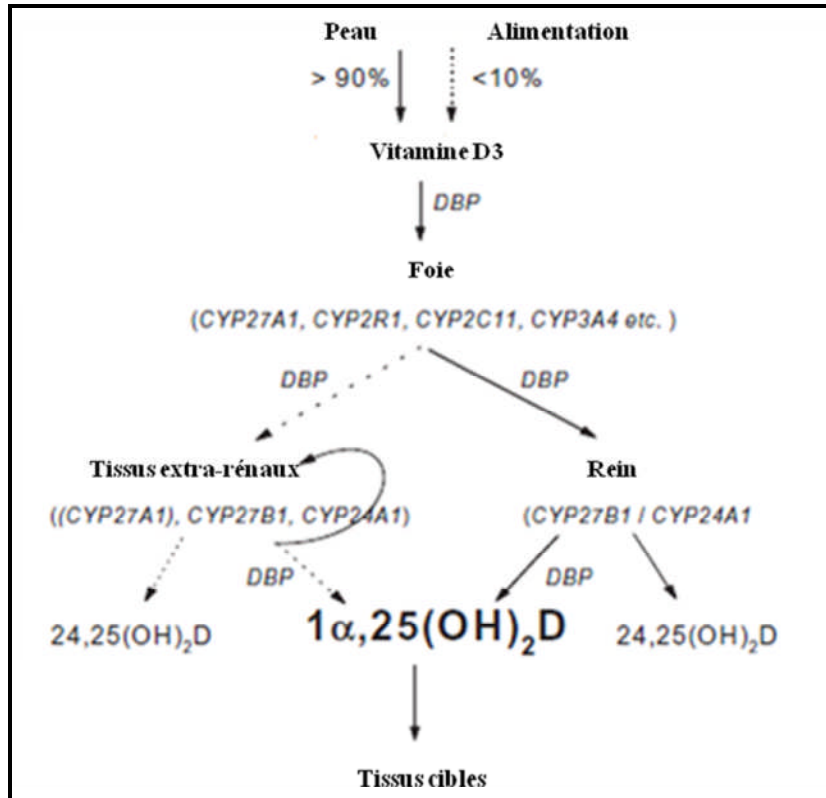
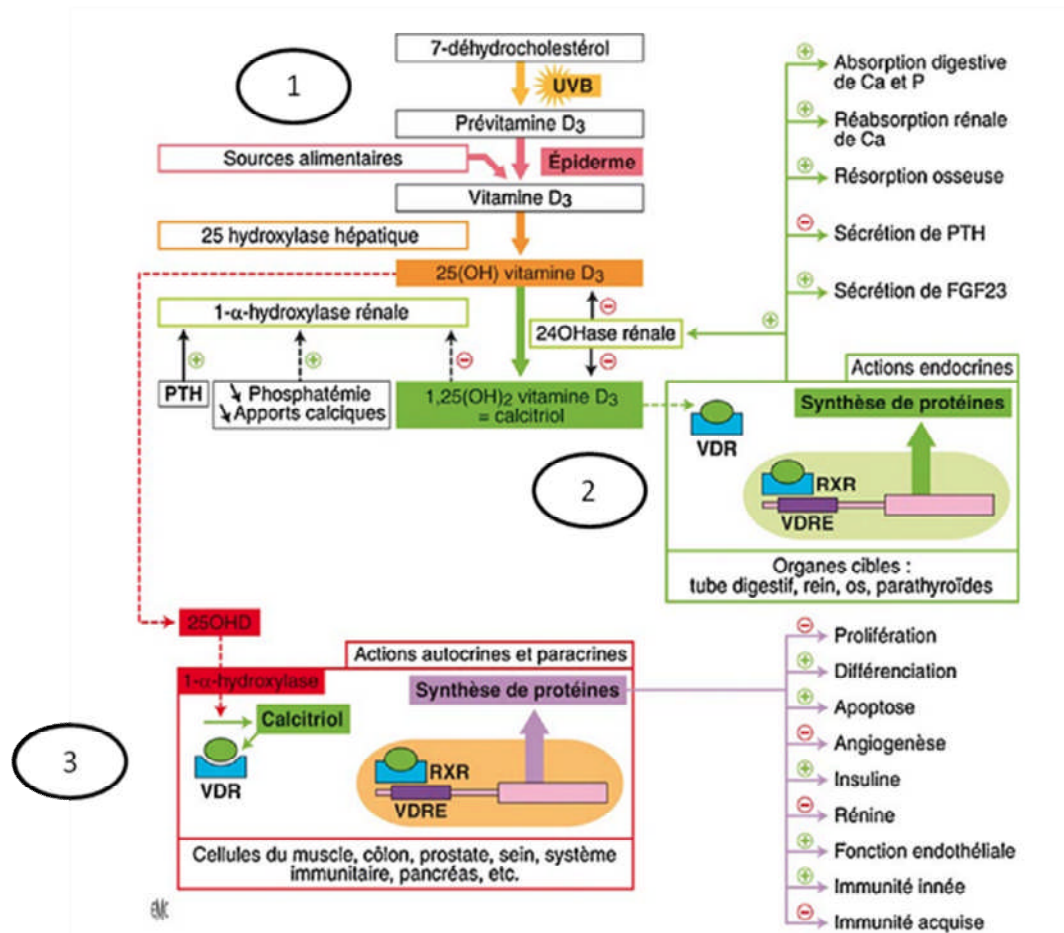


Figure 6 : Étapes de synthèse, effets biologiques et niveaux de régulation de la 1,25(OH)₂D (209)



II.3.2.1.12 Cas particulier de l'insuffisance rénale chronique

L'insuffisance rénale chronique est définie par un déclin progressif de la fonction de filtration glomérulaire, responsable d'un déséquilibre de l'homéostasie phosphocalcique. Plusieurs mécanismes sont impliqués dans l'apparition de ce dysfonctionnement.

D'abord, la conversion de la 25(OH)D en 1,25(OH)D est diminuée en raison de la baisse de la synthèse de la 1-alpha hydroxylase rénale. Il en résulte une hypocalcémie liée à la baisse de l'absorption intestinale du calcium, mécanisme dépendant de la vitamine D (210).

De plus, la baisse de clairance de la créatinine s'accompagne d'une rétention des phosphates responsable d'une hyperphosphatémie. Les concentrations des phosphates sont modulées par la phosphatonine FGF-23, à différentes étapes (211-215) :

- Elle induit une phosphaturie, diminue les concentrations de phosphates et l'activité des co-transporteurs sodium-phosphate Npt2a et Npt2c situés au niveau des tubules proximaux du rein
- Elle diminue aussi la réabsorption tubulaire des phosphates par un mécanisme indépendant de la PTH.

FGF-23 inhibe aussi la transcription du gène codant pour α -klotho, une protéine impliquée dans la régulation de l'activité de différentes protéines de surface cellulaire (216-218). α -Klotho est principalement exprimé au niveau des tubules distaux du rein et joue un rôle de cofacteur essentiel dans la stimulation du récepteur de FGF-23 (219, 220).

Figure 7 : Résumé des effets principaux de FGF-23 au niveau rénal (209)

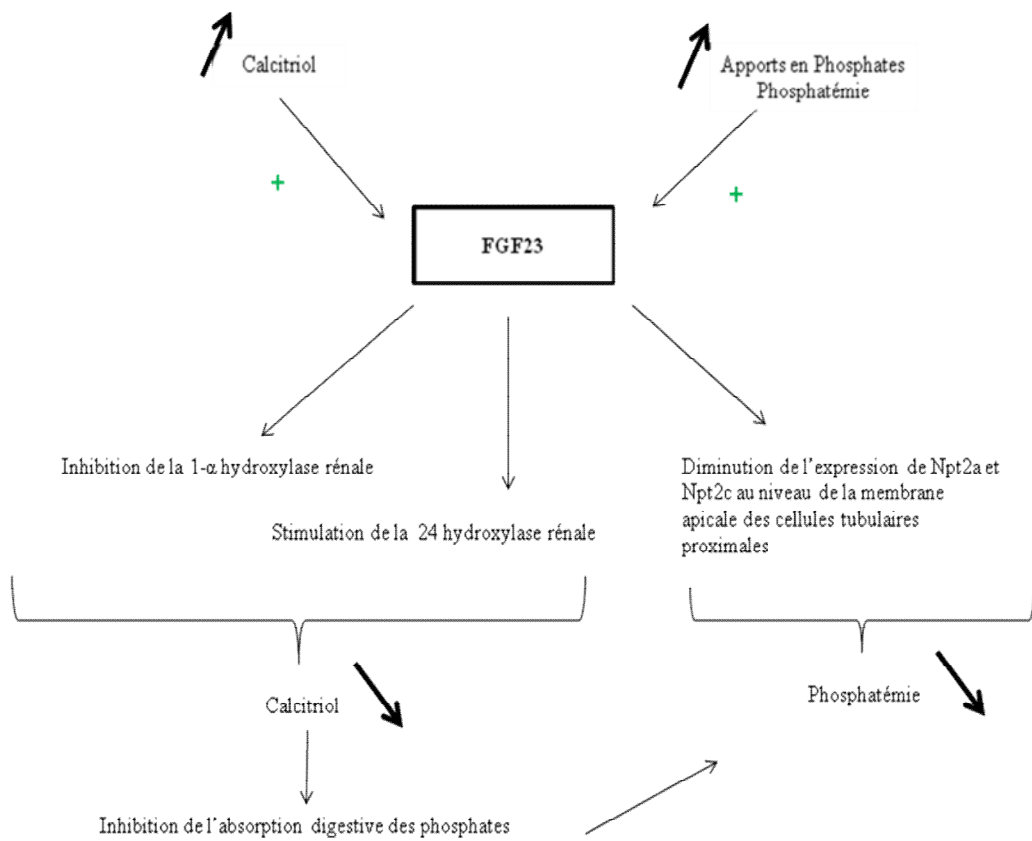
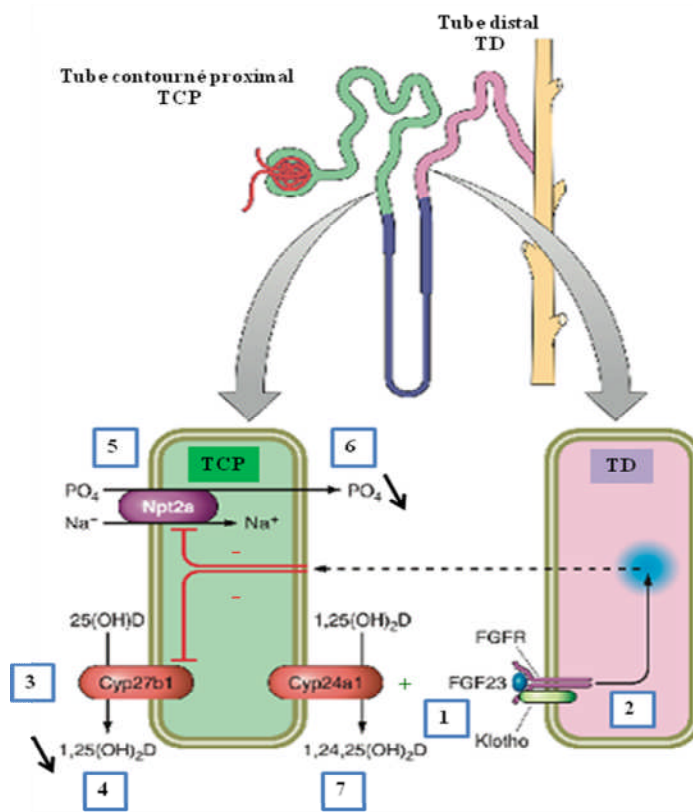
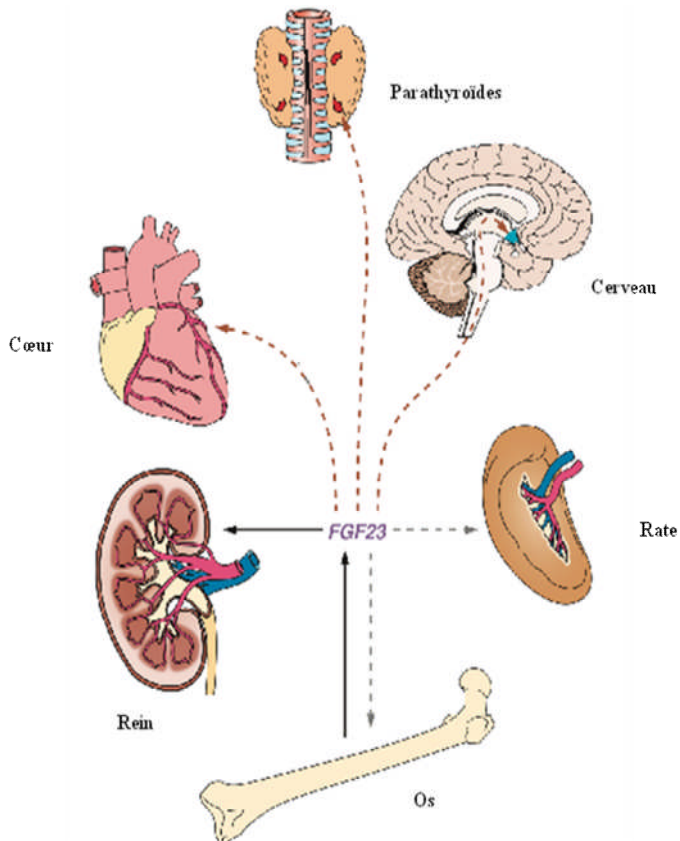


Figure 8: Cibles rénales du FGF-23, lien avec la vitamine D (A) cibles extra-rénales (B) (217)

8A



8B



Dans l'insuffisance rénale chronique, l'hyperphosphatémie stimule la synthèse de la PTH indépendamment de la calcémie (221, 222). L'hyperparathormonémie secondaire est alors responsable de troubles osseux sévères (223). L'ostéite fibrokystique est l'atteinte la plus grave, associée à une altération de la structure osseuse liée à l'augmentation du turn over osseux et à l'accentuation de la résorption osseuse (224-226). Une ostéomalacie peut apparaître selon le degré d'insuffisance rénale ainsi que des phénomènes ostéoporotiques avec risque fracturaire élevé et majoré par la présence d'une carence en vitamine D non corrigée (227-229).

Chez l'insuffisant rénal chronique, l'insuffisance en vitamine D est définie par une concentration de $25(\text{OH})\text{D} \leq 30\text{ng/ml}$ et le déficit par une concentration $\leq 15\text{ng/ml}$ (230).

Au vu des complications possibles dans cette population, le KDIGO (Kidney Disease Improving Global Outcomes) a rédigé des recommandations sur le dépistage, la surveillance et la prise en charge des atteintes osseuses. Les experts ont validé une classification de ces atteintes osseuses (tableau 2) (230).

Tableau 2: Classification des atteintes osseuses chez l'insuffisant rénal d'après le KDIGO (230)

Définition des atteintes osseuses liées à l'insuffisance rénale chronique

Anomalie systémique du métabolisme minéral osseux liée à l'insuffisance rénale avec la présence d'un ou plusieurs des paramètres suivants :

- Anomalies du métabolisme du calcium, du phosphore, de la PTH ou de la vitamine D
- Anomalies du turn over osseux, de la minéralisation ou de la masse osseuse
- Calcifications vasculaires ou des tissus mous

Définition de l'ostéodystrophie rénale

- Altération de la morphologie osseuse chez des sujets en insuffisance rénale chronique
- Anomalie osseuse quantifiée par une histomorphométrie obtenue sur biopsie osseuse

II.3.3 Vitamine D, métabolisme glucidique et risque cardiovasculaire

D'après les données de la littérature exposées dans les paragraphes précédents, il est plus facile de comprendre à quel niveau la vitamine D pourrait être impliquée dans les anomalies du métabolisme glucidique : déficit en vitamine D lié à une insuffisance d'apport d'origine alimentaire ou de synthèse endogène, à des anomalies d'absorption, de stockage ou de transport de la vitamine D ou à des anomalies fonctionnelles de son récepteur VDR ou des cytochromes intervenant dans son métabolisme.

Avant d'exposer le travail de recherche effectué en Guadeloupe sur cette thématique, une revue de la littérature est faite sur la vitamine D et son rôle dans le métabolisme du glucose, dans l'insulinorésistance et son association aux facteurs de risque cardiovasculaire.

II.3.3.1 Vitamine D et diabète

Le diabète est la pathologie principale liée à des anomalies du métabolisme glucidique. Sa prévalence, estimée par l'étude INSTANT, est de 4,57% en 2009 soit un peu plus de 2,5 millions de sujets en France hexagonale (2). En Guadeloupe, elle est de l'ordre de 8,1 % (données de l'INVS) mais ces chiffres sont certainement sous-évalués du fait d'un dépistage ou d'un diagnostic non effectué chez une partie importante de la population diabétique qui ignore sa maladie. Dans plus de 90% des cas, il s'agit d'un diabète de type 2 (DT2). Ce type de diabète est lié à la fois à des facteurs environnementaux ou génétiques responsables d'une résistance des tissus cibles (foie, muscles et tissu adipeux) à l'action de l'insuline (231, 232). Tout comme l'obésité, la dyslipidémie et l'hypertension artérielle, le diabète fait partie des pathologies à haut risque de morbidité ou de mortalité cardiovasculaire (233). L'évolution du DT2 s'accompagne d'une dysfonction des cellules bêta de Langerhans avec une véritable réaction inflammatoire au sein des îlots de Langerhans puis un déficit de l'insulinosécrétion entraînant un DT2 insulino-requérant (234).

Le diabète de type 1 d'origine auto-immune est lié à une insulite impliquant différents types d'anticorps dirigés soit contre la glutamate acide décarboxylase (anti GAD), soit contre une phosphatase membranaire des cellules β (anti-IA2), ou soit contre les anticorps anti-îlots (Islet Cell Antibody ou ICA). Au niveau mondial, sa prévalence au sein du diabète est faible, évaluée à environ 5%, avec une fréquence moins élevée des complications macrovasculaires comparée au DT2 (235, 236). C'est pour cette raison que la problématique majeure de santé publique reste orientée sur la prévention, le dépistage précoce du DT2 et de ses complications cardiovasculaires.

Les chercheurs se sont intéressés au rôle de la vitamine D, d'abord dans les mécanismes physiopathologiques du diabète, puis en tant que facteur prédictif du risque de DT2 ou impliqué directement dans la survenue des complications cardiovasculaires du diabète (125, 237, 238).

La vitamine D pourrait agir dans le métabolisme glucidique soit de façon directe via son récepteur (VDR), soit de façon indirecte en modulant les flux cellulaires de calcium.

Elle pourrait être impliquée à plusieurs niveaux (238, 239) :

- L'insulinosécrétion
- L'insulinorésistance
- La fonction cellulaire bêta des îlots de Langerhans

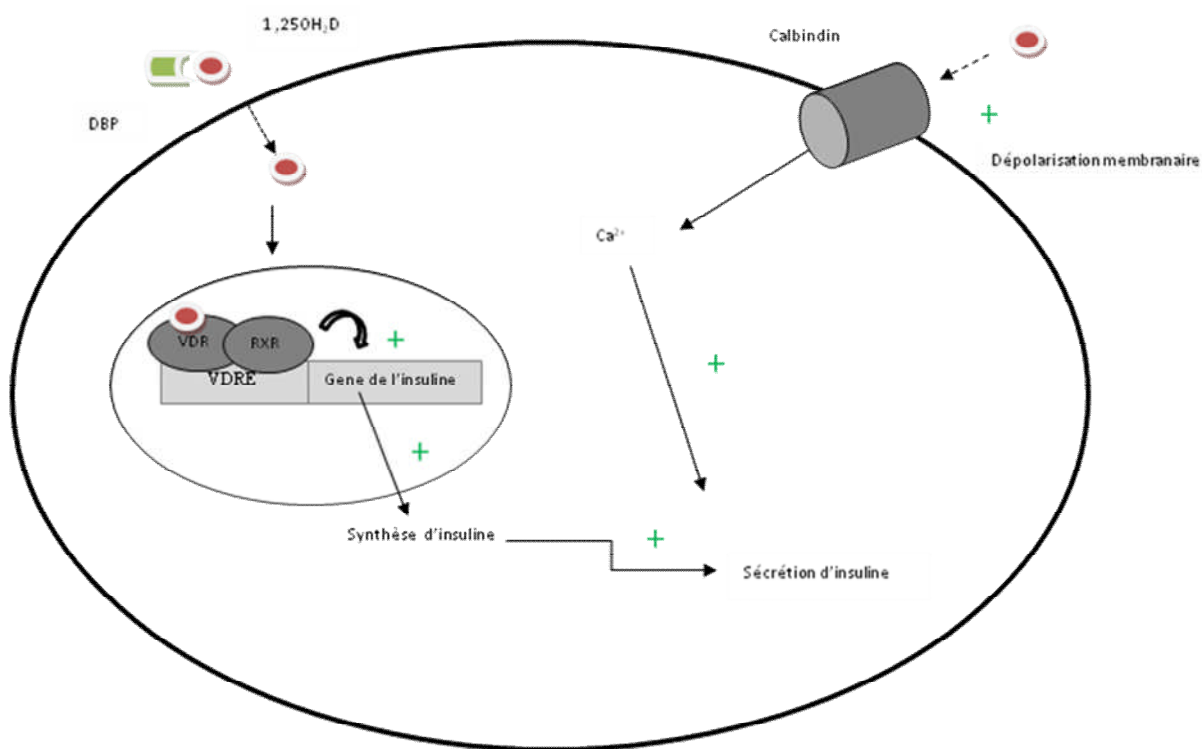
Ces différentes possibilités ont été analysées à partir des données de la littérature et sont résumées dans les paragraphes ci-dessous :

II.3.3.1.1. Vitamine D, fonction cellulaire bêta et insulinosécrétion

Chez l'animal, le déficit en Vitamine D entraîne une altération de la synthèse et de la sécrétion d'insuline par les cellules bêta du pancréas, restaurée en cas de supplémentation vitaminique (240, 241).

L'expression du récepteur VDR de la vitamine D au niveau des cellules bêta, pourrait expliquer ces observations. En effet, les souris invalidées pour le gène *VDR* ont une sécrétion insulinaire bêta altérée (242). De plus, le VDRE, élément de réponse du VDR, est présent au niveau du promoteur du gène de l'insuline humaine et l'activation de la transcription du gène de l'insuline est favorisée par l'apport de la 1,25(OH)₂D (243, 244).

Figure 9: Résumé des mécanismes de l'insulinosécrétion impliquant la vitamine D



II.3.3.1.2. Vitamine D et sensibilité à l'insuline

La vitamine D joue un rôle direct au niveau de la sensibilité des tissus à l'insuline. Elle stimule l'expression des récepteurs de l'insuline situés au niveau des tissus cibles périphériques (243) et active le facteur de transcription PPAR (Peroxisome Proliferator Activated Receptor) gamma, facteur régulateur du métabolisme des acides gras au niveau des tissus adipeux et musculaire (245). En modulant les flux calciques, la vitamine D régule aussi la réponse tissulaire à l'insuline (246).

Elle est impliquée dans l'insulinorésistance par ses interactions avec le système Rénine Angiotensine Aldostérone (RAA). En effet, l'angiotensinogène 2 inhibe l'action de l'insuline sur le tissu vasculaire et le muscle squelettique, ce qui altère le captage du glucose au niveau de ces cellules (247, 248). Par ailleurs, les souris dont le gène du VDR a été invalidé, présentent un déficit en vitamine D et une augmentation de l'expression de la rénine et de la production d'angiotensinogène 2. La correction de ce déficit entraîne une diminution des concentrations de rénine et améliore l'insulinosensibilité des tissus (103).

De nombreuses études, transversales et cas-témoins, ont rapporté une prévalence élevée du déficit en vitamine D en présence d'un diabète ou d'une intolérance au glucose (9, 234, 249, 250). Après ajustement à l'IMC, l'étude NHANES (National Health And Nutrition Examination Survey) a mis en évidence une association inverse entre les concentrations de 25(OH)D et la prévalence du diabète, quelle que soit l'ethnie étudiée (251). Une étude finlandaise a trouvé, une diminution du risque de DT2 chez les sujets qui avaient des concentrations de 25(OH)D élevées, comparés à ceux qui étaient déficitaires en vitamine D (252). D'autres études récentes ont confirmé cette association entre le déficit en vitamine D et l'incidence du DT2 ou du syndrome métabolique (253, 254).

II.3.3.1.3 Vitamine D et cellules bêta pancréatiques

Le rôle de la vitamine D se fait par l'intermédiaire du VDR mais aussi de la 1-alpha hydroxylase (enzyme responsable de la synthèse de la 1,25(OH)D), tous deux exprimés au niveau des cellules bêta du pancréas (242, 255). La vitamine D module les concentrations extracellulaires de calcium et les flux calciques dans la cellule bêta (256). Elle régule l'activité de la calbindine, protéine cytosolique des cellules bêta, qui interfère sur les flux calciques (257-259).

II.3.3.2 Vitamine D et obésité

L'obésité est définie par un indice de Quételet (rapport poids/taille²) supérieur à 30Kg/m² (260). L'impact de l'obésité est majeur en terme de santé publique, avec des conséquences sur la morbidité et la mortalité cardio-vasculaires (261, 262) et cancéreuses (263-265) .

En Guadeloupe, une étude transversale a permis d'évaluer la prévalence de la surcharge pondérale à 58 % chez la femme et 42 % chez l'homme. La prévalence de l'obésité était de 29 % chez la femme et 12 % chez l'homme (3).

En dehors des facteurs environnementaux, responsables de l'obésité, des études récentes ont montré que le déficit en vitamine D était associé à l'obésité ou à la survenue d'un syndrome métabolique (266-268). Les concentrations circulantes de 25(OH)D sont diminuées chez les obèses (269-271) mais aussi chez les sujets dysmétaboliques (272). La réponse à la substitution vitaminique D est également diminuée chez ces sujets obèses et déficitaires en vitamine D. Dans ce contexte, une majoration de la posologie ou la durée du traitement par vitamine D est en général nécessaire (273, 274).

Plusieurs mécanismes ont été évoqués pour expliquer une telle relation entre le statut vitaminique D et l'obésité. Chez l'obèse, la biodisponibilité de la vitamine D3 synthétisée en sous-cutanée ou provenant de l'alimentation, est diminuée en raison de son accumulation dans le

tissu adipeux (271). Après absorption, la vitamine D est séquestrée et stockée dans le tissu adipeux mais aussi dans le tissu musculaire, puis libérée lentement dans la circulation (275). De plus, l'inactivité physique, plus fréquemment observée chez l'obèse, associée à une diminution de l'exposition solaire, aggrave le déficit en vitamine D (271).

Un autre mécanisme possible est la modulation du métabolisme adipocytaire dépendant de l'apport calcique et de la 1,25(OH)D (276).

La 1,25(OH)D régule le métabolisme énergétique en modulant l'expression et la production d'adipokines (277) et serait impliquée dans d'autres mécanismes cellulaires complexes au sein de l'adipocyte : régulation du stress oxydatif et synthèse de ROS (reactive oxygen species) (278), régulation des cytokines de l'inflammation (TNF alpha, IL-6, IL-8) et des concentrations d'adiponectine, toutes impliquées dans la physiopathologie de l'obésité (279). La 1,25(OH)D intervient aussi dans la régulation de l'apoptose adipocytaire de façon dose dépendante. A concentrations basses, la vitamine D inhibe l'apoptose en diminuant l'activité des caspases (enzymes de l'apoptose) et stimule l'activité du facteur antiapoptotique Bcl-2 (280).

En définitive, chez le patient obèse, la 1,25(OH)D intervient dans la régulation du métabolisme et de la fonction adipocytaire par des mécanismes génomiques et non génomiques.

II.3.3.3 Vitamine D et risque cardiovasculaire

Plusieurs études d'observations rapportent une association entre risque cardiovasculaire et concentrations basses de 25(OH)D mais la relation de causalité n'est pas définitivement établie. Certaines de ces études ont confirmé cette association après ajustement aux facteurs confondants comme l'obésité, l'inactivité physique, la consommation d'alcool ou de tabac. Ce point est important car ces facteurs sont associés à un risque cardiovasculaire élevé. De plus, l'obésité et la sédentarité sont aussi associées à des concentrations basses de 25(OH)D (8, 281).

D'après les données de la littérature, la vitamine D pourrait influencer le risque cardiovasculaire en agissant à plusieurs niveaux : système rénine angiotensine aldostérone (RAA), cardiomyocytes et paroi vasculaire.

II.3.3.3.1 Effet sur le système Rénine Angiotensine Aldostérone (RAA)

Des études prospectives ont mis en évidence une association inverse entre les concentrations de la 25(OH)D et l'incidence de l'hypertension artérielle (HTA). Ce résultat était indépendant de l'âge, de l'IMC, de l'activité physique, de l'ethnie et de l'état de ménopause (282, 283). Le rôle de la vitamine D au niveau du système RAA, principal régulateur des niveaux de pression artérielle, a été évoqué. En effet, dans des modèles de souris porteuses d'un *VDR* invalidé, l'expression de la rénine et de l'angiotensine était augmentée et responsable d'une vasoconstriction avec HTA secondaire (103).

Par ailleurs la 1,25(OH)D inhibe la croissance des cellules musculaires lisses vasculaires en culture et pourrait modifier leur contractilité (284).

Des études d'intervention ont montré que l'exposition aux UVB (285) ou la substitution en vitamine D (versus placebo) pouvait réduire significativement la pression artérielle chez des patients hypertendus (101). Après 2 mois, la supplémentation en vitamine D (800 UI/J) et en calcium (1200 mg/J) a permis une baisse de la pression artérielle systolique de 13 mm Hg ($p = 0,02$) et de la diastolique de 6 mm Hg ($p = 0,10$) (101).

II.3.3.3.2 Effet sur la cellule cardiaque

Un effet direct sur le cardiomyocyte a été mis en évidence. Les situations de carence en vitamine D peuvent être associées à une cardiomégalie avec un contrôle de l'hypertrophie des myocytes

cardiaques, une régulation de la synthèse et de la libération du facteur natriurétique auriculaire après apport en 1,25(OH)D₃. Chez les sujets avec une cardiomyopathie et en situation d'insuffisance rénale terminale, l'apport de 1,25(OH)D₃ et de 25(OH)D₃ améliore la fonction ventriculaire gauche (286).

Chez les sujets diabétiques de type 2, le déficit en vitamine D est significativement associé aux cardiopathies ischémiques et aux accidents vasculaires cérébraux (287, 288). Dans une étude récente, un déficit en vitamine D était plus fréquemment retrouvé chez des sujets diabétiques ayant eu un infarctus aigu du myocarde, en situation précaire, et avec un faible niveau d'activité physique. Ces résultats étaient indépendants de l'âge (287, 289).

II.3.3.3 Effet sur la paroi vasculaire (athérosclérose)

D'autres études évoquent un effet anti athéromateux de la vitamine D dont le récepteur VDR est exprimé au niveau du muscle lisse vasculaire (290).

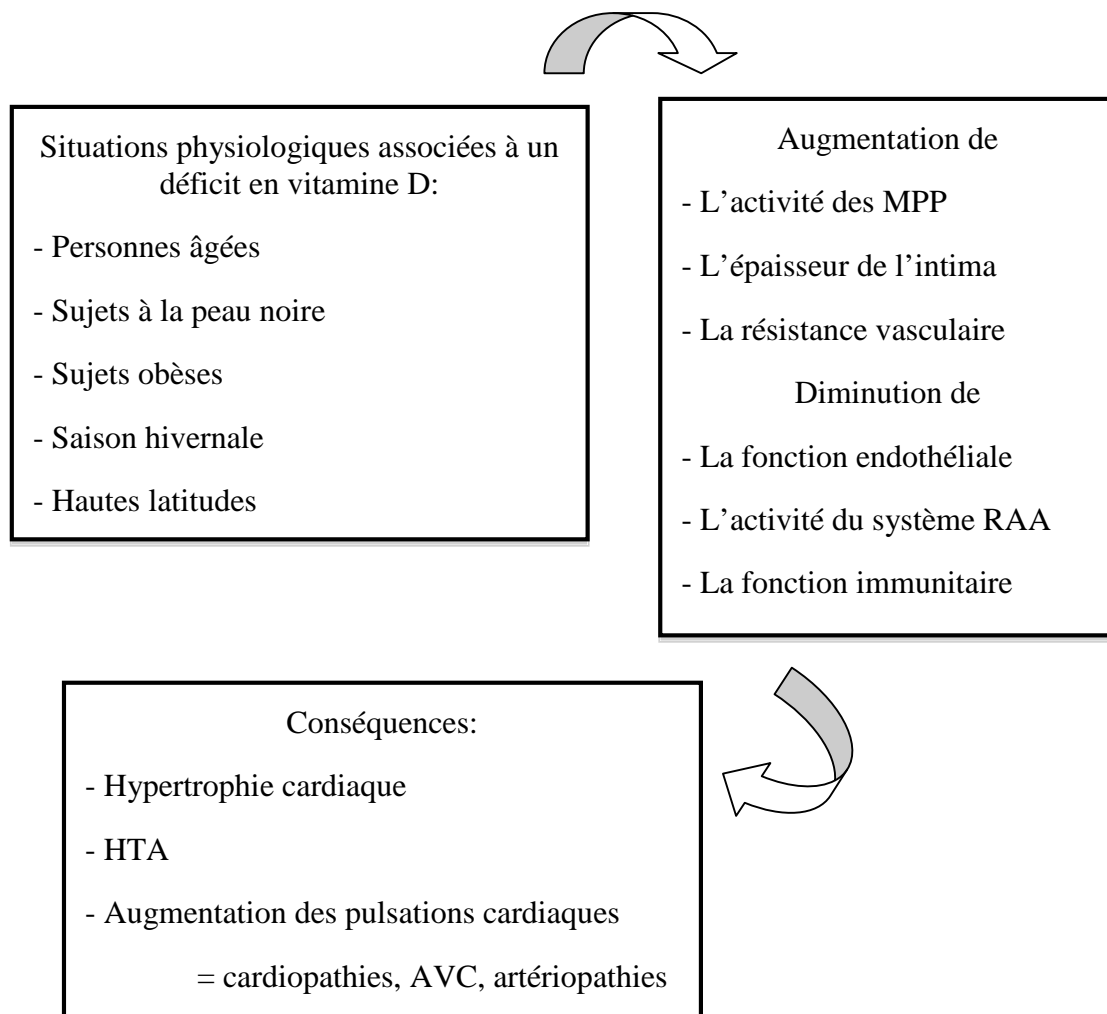
Des études *in vitro* ont montré que l'apport de 1,25(OH)D inhibe l'effet mitogène de l'EGF (Epidermal Growth Factor) sur la prolifération des cellules mésangiales des vaisseaux (291).

Sur le plan épidémiologique, l'effet anti athéromateux potentiel de la vitamine D est soutenu par les résultats récents de la NHANES de 2001 à 2004, où les quartiles de 25(OH)D des plus bas au plus élevés étaient significativement associés à une prévalence décroissante de la maladie artérielle périphérique (8,1- 5,4- 4,9 et 3,7%) (292).

Chez l'homme, l'épaisseur de l'intima-média, marqueur de l'athérome dans le DT2 est aussi associée au déficit en vitamine D (293, 294).

En définitive, le déficit en vitamine D serait associé à une augmentation de l'incidence de l'HTA, des cardiopathies ischémiques et des indices d'athérosclérose, ce qui suggère son rôle possible de facteur de risque cardiovasculaire chez le sujet diabétique.

Figure 10 : Situations d'hypovitaminose D et conséquences vasculaires



II 3.4 Polymorphismes génétiques

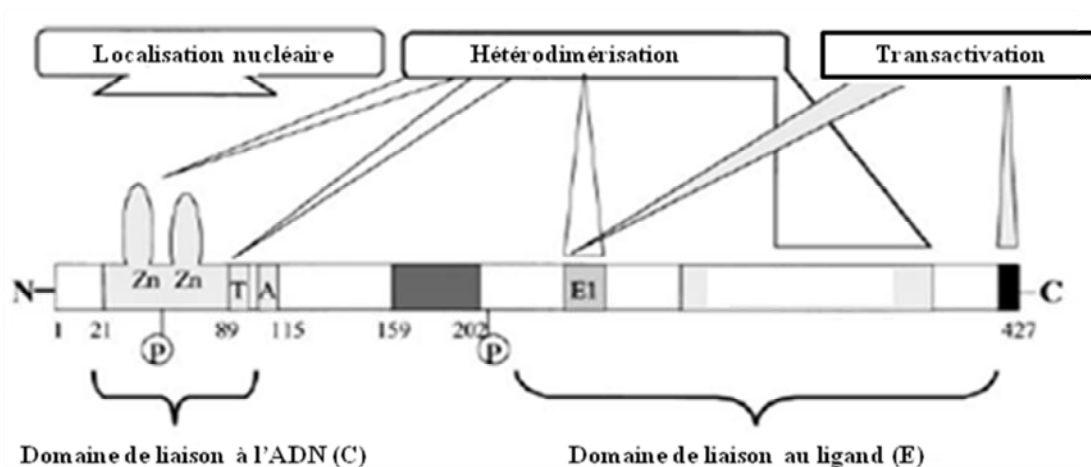
II.3.4.1 Polymorphismes du gène codant pour le récepteur de la vitamine D

II 3.4.1.1. Récepteur VDR

II.3.4.1.1.1 Identification et structure du VDR

L'activité biologique de la 1,25(OH)D est médiée par le VDR (Vitamin D Receptor), récepteur qui lui est spécifique. Les premières descriptions du VDR ont été rapportées dans les années 68 (295). C'est un membre de la superfamille des récepteurs hormonaux nucléaires. Il possède un domaine de liaison à l'ADN (C) et un domaine de liaison à son ligand (E) encore appelé LBD (ligand binding domain) (296). Il est exprimé par les organes cibles classiques de la vitamine D (l'intestin, l'os, le rein et les glandes parathyroïdes) ainsi que par toute une série de tissus non impliqués dans l'homéostasie du calcium (kératinocytes, fibroblastes, cellules de Langerhans, monocytes, les lymphocytes T de la peau, cellules endothéliales, cellules du système immunitaire cutané, cellules musculaires, cellules pancréatiques, cellules des systèmes hématopoïétiques et nerveux) (5, 297, 298).

Figure 11: Domaines fonctionnels du VDR (43)



II.3.4.1.1.2 Gène codant pour le VDR

Le gène codant pour le récepteur humain de la vitamine D est situé sur le chromosome 12, en position 12q13.11 (299). Il mesure 75Kb et code pour une protéine de 50 à 70 KDa. Il est formé de 14 exons dont six exons non traduits, non codants (exons 1A-1F), et plusieurs régions promotrices (300). La région 5' non transcrite du VDR est codée par l'exon 1 composé lui-même de 3 séquences formant les exons 1A, 1B, 1C impliqués dans la synthèse de 4 transcrits différents du VDR (300, 301).

Les motifs en doigt de zinc du domaine de liaison sont codés par les 2 exons 2 et 3, la zone Hinge est codée par les exons 4 et 5 et la région LBD par les exons 5 à 9. Le transcrit de l'ARNm du VDR est composé de 4628 bases et code pour un polypeptide de 427 acides aminés avec une masse moléculaire de 48KDa (296).

II.3.4.1.1.3 Mode d'action et rôle biologique du VDR

Après liaison de son ligand (1,25(OH)D), le VDR se fixe à une courte séquence nucléotidique de l'ADN appelée éléments de réponse à l'hormone (VDRE) où il agit comme facteur de transcription. L'analyse de l'expression de l'ADN complémentaire du VDR a permis d'analyser sa structure et sa fonction mais aussi de comprendre les mécanismes cellulaires impliqués dans les voies de signalisation cellulaire déclenchées par la liaison de son ligand (302).

Trois étapes principales conduisent à la régulation de la transcription des gènes sous le contrôle du complexe VDR/vitamine D :

1/ la fixation du ligand:

La vitamine D activée (1,25(OH)D₃) est soit dégradée par la 24-hydroxylase mitochondriale (CYP24), soit liée à son récepteur cytosolique VDR.

Le domaine de liaison du ligand (LBD), situé dans la partie carboxy-terminale de la molécule VDR, est responsable de la forte affinité de liaison pour la 1,25(OH)D₃. Cette région du VDR a une fonction d'activation ligand-dépendante, appelé AF2 (303).

La 25(OH)D₃ et la 24,25(OH)₂D₃ se lient au VDR avec une affinité 100 fois plus faible que la 1,25(OH)₂D₃. Après fixation du ligand, le VDR cytoplasmique est transféré rapidement vers le noyau le long des microtubules (304).

Deux signaux de localisation nucléaire ont été identifiés au sein de la molécule VDR. L'un est un signal bipartite composé d'un cluster de résidus basiques à chaque extrémité de la séquence entre les acides aminés 79 et 105, le deuxième est une séquence basique de sept acides aminés (résidus 49-55), identifiée entre les deux structures en doigts de zinc. Des mutations ponctuelles dans ces deux séquences altèrent la translocation du VDR vers le noyau et sont responsables de rachitisme vitamine D résistant de type 2 (305). Ce type de rachitisme, lié à des anomalies fonctionnelles du récepteur VDR est à distinguer du rachitisme vitamine D résistant de type 1, responsable d'un déficit en alpha hydroxylation et lié à des mutations du gène codant pour la 1 α hydroxylase (CYP27B1) (306, 307).

2/ Hétérodimérisation avec le RXR

Le complexe 1,25 (OH) 2D₃-VDR s'hétérodimérise avec le récepteur de l'acide rétinoïque RXR. Les surfaces de dimérisation de RXR dans le VDR sont situées dans le 1^{er} motif en doigt de zinc, dans la région COOH-terminale du 2^{ème} motif en doigt de zinc et dans le motif structural correspondant à une séquence répétée en tandem de sept acides aminés situé dans le LBD.

L'acide aminé asparagine (Asn37) situé dans le 1^{er} motif en doigt de zinc, la lysine (Lys 91) et la glutamine (Glu92) situées dans la T-box du 2^{ème} motif en doigt de zinc, et deux des acides aminés de la séquence tandem du domaine LBD sont essentiels à l'association sélective entre le

VDR et son partenaire protéique, RXR. L'hétérodimérisation du VDR activé avec le RXR induit une modification de conformation du VDR, essentielle pour sa fonction de transactivation.

3/ Liaison de l'hétérodimère VDR-RXR au VDRE

L'hétérodimère VDR / RXR se lie aux séquences VDRE spécifiques dans les régions promotrices des gènes cibles. L'hétérodimère lié à l'ADN attire les composants du complexe de pré-initiation de la transcription ou ARN polymérase II (Pol II) et les co-activateurs nucléaires transcriptionnels, régulant ainsi la transcription des gènes dont l'expression sera activée ou inhibée.

Le rôle biologique du VDR est médié par sa liaison à la 1,25(OH)D et similaire à celui de la 1,25(OH)D, incluant les effets génomiques et non génomiques de celle-ci (308).

En résumé, le VDR agit soit comme un facteur de transcription nucléaire régulant la transcription des gènes exprimant le VDRE, soit comme un récepteur membranaire régulant l'activité des kinases et des phosphatases (309).

II.3.4.1.1.4 Régulation de l'activité du VDR

L'activité du VDR peut être régulée au niveau des différentes étapes de son métabolisme à savoir l'accessibilité du ligand au VDR, le contenu cellulaire en VDR, les modifications post translationnelles du récepteur et la disponibilité des co-activateurs nucléaires (310).

Les concentrations de VDR dans une cellule cible sont régulées par les concentrations de 1,25(OH)D et de ses métabolites (régulation homologue) mais aussi par d'autres hormones ou facteurs de croissance qui ne se lient pas au VDR (up-régulation hétérologue) (311-315).

Ces deux modes de régulation sont impliqués dans le contrôle de la transcription du gène codant pour le VDR, dans la stabilisation de son ARNm et dans l'altération de sa vitesse de dégradation qui dépend des tissus et des cellules qui lui sont spécifiques (316). Ainsi, la 1,25(OH)₂D₃ stimule l'ARNm du VDR dans les glandes parathyroïdes et le rein, mais pas dans l'intestin (317).

Enfin, les facteurs qui interviennent dans le catabolisme du VDR régulent également celui-ci. Une régulation directe du VDR par SUG1 (composant du protéasome, intervenant dans l'ubiquitination et la protéolyse du VDR) a été mise en évidence. Ainsi, l'utilisation d'inhibiteurs du protéasome a permis de ralentir la dégradation du VDR par cette voie (318).

Dans des régions codantes ou non d'un gène, il peut y avoir une substitution d'une paire de bases par un nucléotide appelée Single Nucleotide Polymorphism (SNP). Différents SNPs influencent le statut en vitamine D. Ils peuvent concerner les gènes codant pour les enzymes intervenant soit dans la synthèse ou soit dans le catabolisme de la 25(OH)D et de la 1,25(OH)D, et peuvent ainsi influencer les concentrations sériques de vitamine D.

Les SNP les plus fréquemment étudiés concernent les gènes du VDR, de CYP27B1, de DBP (GC) et récemment de la NADSYN1.

II. 3.4.1.2 Polymorphismes du gène *VDR*

II.3.4.1.2.1 Techniques de génotypage

L'ADN génomique est généralement analysé à partir des leucocytes du sang périphérique. 1ml de sang permet en général l'obtention de 30 à 50 µg d'ADN. L'extraction chimique nécessite un prélèvement initial sur tube EDTA. L'héparine inhibe la Taq Pol utilisée pour l'amplification de l'ADN par PCR. Les prélèvements sont congelés à -20° jusqu'à utilisation. L'extraction et la purification de l'ADN sont facilitées par l'utilisation de kits de dosage comme le kit QIAGEN (utilisé pour nos différentes études).

Après dénaturation, hybridation et polymérisation par PCR, l'analyse de l'ADN permet de détecter des modifications de séquences qui n'affectent pas le nombre de copies (analyse qualitative), notamment des polymorphismes. Les polymorphismes ou variants génétiques sont secondaires à des modifications de la séquence d'ADN. On distingue les SNP (Single Nucleotide Polymorphism) qui correspondent à la substitution d'un nucléotide par un autre, les délétions d'ADN répétitifs (séquences répétées en tandem ou microsatellite) et les insertions-délétions de bases. Parmi ces polymorphismes, les SNPs sont les plus fréquents (90%) et sont mieux adaptés à la recherche du fait de leur stabilité. Les SNP sont majoritairement bi-alléliques. Ils permettent de différencier 3 génotypes : l'homozygote fréquent, l'hétérozygote et l'homozygote rare. Si les sites alléliques sont très proches physiquement ou s'ils sont situés dans une région qui combine peu, il peut y avoir déséquilibre de liaison, c'est-à-dire que des allèles situés à deux loci ne se transmettent pas de façon indépendante. Le déséquilibre de liaison est lié à un nombre d'haplotype observé dans une population inférieur au nombre théorique évalué par le PIC (Polymorphism Information Content) qui correspond au pourcentage d'homozygotes pour chaque allèle étudié (319-322).

II.3.4.1.2.2 Description des polymorphismes étudiés

L'analyse des séquences d'ADN révèle des polymorphismes génétiques qui expliquent en partie, les différences d'un individu à l'autre. Ainsi, plusieurs polymorphismes du gène *VDR* ont été identifiés. Ils sont secondaires à des variations alléliques dans les sites de clivage d'enzymes de restriction. Leur signification fonctionnelle et les effets potentiels sur la susceptibilité aux maladies ont été largement étudiés (300, 323-326). Les polymorphismes du *VDR* les plus fréquemment analysés correspondent aux sites de clivage d'endonucléases *ApaI*, *BsmI*, *FokI*, et *TaqI*.

Le polymorphisme *FokI* est localisé au niveau de l'exon 2 et consiste en une transition T/C. Il s'agit d'une substitution d'un nucléotide T (Thymine) en C (Cytosine) au niveau des deux sites

potentiels d'initiation de la traduction (296, 325). Il en résulte une protéine VDR plus courte de trois acides aminés. Ce polymorphisme a un rôle fonctionnel majeur dans l'activation transcriptionnelle du gène du VDR (327).

Le polymorphisme BsmI est localisé au niveau de l'intron 8 et consiste en une substitution d'un nucléotide A (Adénine) en G (Guanine) (328).

Le polymorphisme TaqI est localisé au niveau de l'exon 9 et consiste en une substitution d'un nucléotide T en C au niveau du codon 352 mais ce SNP ne modifie pas la séquence de VDR (328).

Le polymorphisme ApaI est localisé au niveau de l'intron 8 et consiste en une substitution d'un nucléotide en A/C (329).

Les polymorphismes ApaI, BsmI et TaqI pourraient influencer l'expression du VDR en altérant la stabilité de l'ARNm (330). Ils sont situés dans la région 3' du gène *VDR* avec un fort déséquilibre de liaison ce qui explique qu'ils sont parfois étudiés ensemble en analyse d'haplotypes (328).

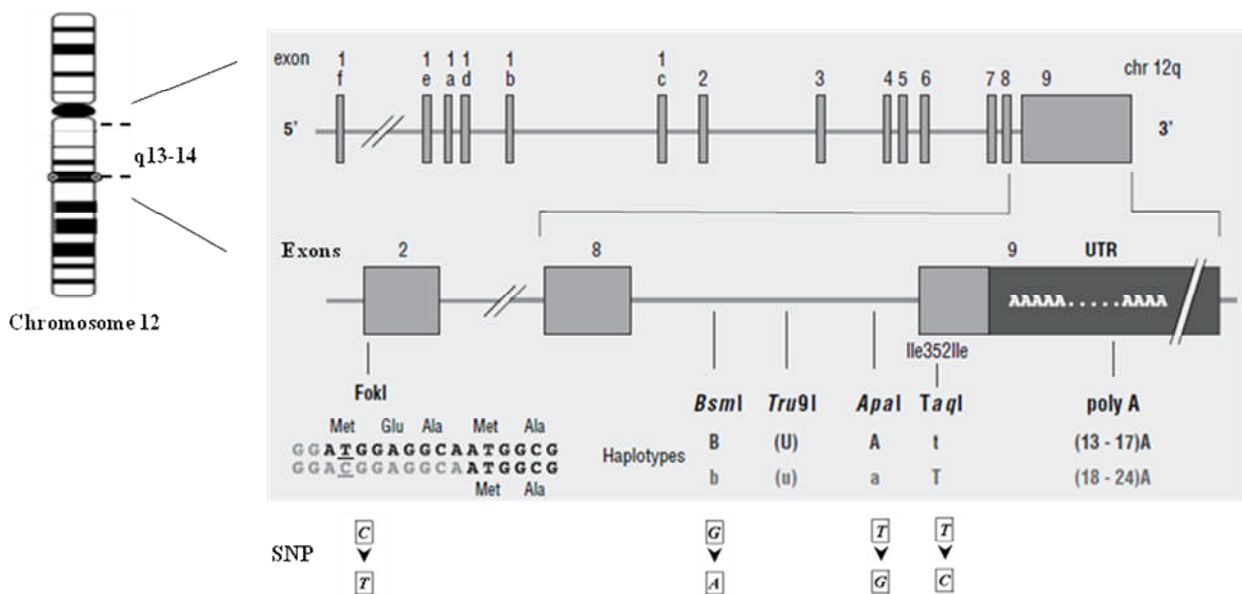
La mesure du déséquilibre de liaison décrit l'association d'allèles de polymorphismes adjacents, les uns avec les autres (331).

Les polymorphismes BsmI et FokI, ont été décrits comme étant associés aux concentrations de la 25(OH)D et également à l'activité du VDR (332, 333). Ces polymorphismes du *VDR* varient en fonction des ethnies et pourraient expliquer pourquoi certaines populations sont plus à risque de déficit en vitamine D ou de pathologies dépendantes de la vitamine D, que d'autres. Hustmyer a mis en évidence une différence de fréquence de certains polymorphismes du VDR chez les Caucasiens, les Afro-Américains et les Asiatiques (334). Dans une étude récente, certains haplotypes du VDR étaient associés à l'ascendance européenne ou amérindienne des sujets étudiés, mais non à l'ascendance africaine, suggérant d'adapter les études d'association entre

variants génétiques et pathologies chroniques selon l'ethnie (335, 336).

En définitive, les polymorphismes génétiques du *VDR* constitueraient un facteur important de susceptibilité individuelle aux effets biologiques de la vitamine D.

Figure 12 : Sites des polymorphismes principaux du gène codant pour le VDR (337)



II.3.4.1.2.3 Polymorphismes du *VDR* et diabète

Des études chez des rats rendus diabétiques (C57BL/KsJ-db/db) ont mis en évidence une diminution de l'expression du *VDR* au niveau intestinal et rénal, associée à des variations des concentrations de vitamine D (338). Par la suite, des études *in vitro* ont rapporté l'effet du glucose sur l'activité du *VDR* et le métabolisme de la vitamine D (339) puis des études *in vivo* ont confirmé la présence du *VDR* au niveau des cellules bêta du pancréas (298).

Au vu de ces données, plusieurs études chez l'homme se sont intéressées aux polymorphismes du *VDR*, d'abord dans des pathologies osseuses chez le diabétique (340, 341) puis dans des situations d'insulinorésistance ou de syndrome métabolique (332, 342).

Le risque de DT2 varie en fonction des combinaisons génétiques possibles chez les individus et dépendrait des groupes ethniques étudiés. En effet, une étude cas-contrôle réalisée en Inde n'a pas mis en évidence d'association significative entre les polymorphismes rs2228570 (SNPs de FokI), rs1544410 (SNP de BsmI) et rs731236 (SNP de TaqI) entre les 2 groupes de sujets. Par contre, après combinaison de ces variants génétiques, une augmentation du risque de DT2 était retrouvée chez les sujets porteurs du génotype FfBbTt (343).

La sécrétion insulinaire, régulée par la vitamine D, varie en fonction de certains polymorphismes du VDR. Ainsi, une association entre les polymorphismes ApaI, BsmI TaqI et l'insulinosécrétion a été décrite dans des populations indiennes, indépendamment du statut vitaminique D (255, 344, 345).

De plus, après charge orale de glucose, les SNPs ApaI, BsmI et TaqI influenceraient la sécrétion d'insuline. Les génotypes aa (ApaI), bb (BsmI) ou TT (TaqI) sont en particulier associés à une baisse des taux d'insuline, à l'inverse des génotypes AA, BB ou tt (ApaI, BsmI et TaqI respectivement). Le polymorphisme FokI est aussi associé à un profil clinique particulier chez des sujets non diabétiques, avec une insulino-résistance chez les porteurs de l'allèle F (FF/ Ff) (332). Cette association est également retrouvée avec les polymorphismes de TaqI (346). Chez les sujets non diabétiques, le génotype aa (SNP ApaI) est aussi associé à un profil d'intolérance au glucose avec une diminution de l'insulinosensibilité et est plus fréquent chez les sujets diabétiques, ce qui suggère une association entre les polymorphismes de ApaI et DT2 (342).

II.3.4.1.2.4 Polymorphismes du VDR et obésité

Hormis son association avec les concentrations de vitamine D (270, 347), l'incidence de l'obésité est aussi liée aux polymorphismes du VDR (348, 349).

L'étude de Filus et al, rapporte une association entre les polymorphismes BsmI et l'IMC avec un IMC plus élevé chez les sujets porteurs du génotype BB (332).

Une autre étude réalisée dans une population chinoise a mis en évidence une association significative entre le polymorphisme rs7975232 (ApaI) et l'IMC chez des femmes en post ménopause (350).

Toutes les études ne confirment pas cette relation entre les facteurs anthropométriques et les 4 polymorphismes les mieux connus du VDR. D'autres polymorphismes comme cdx2 seraient aussi associés au tour de taille et à l'IMC (351, 352).

Finalement, il n'y a aucune donnée sur la relation de causalité entre ces polymorphismes du VDR et l'IMC en dépit de l'association de ces deux paramètres avec les concentrations de vitamine D.

II.3.4.1.2.5 Polymorphismes du VDR et risque cardiovasculaire

Le récepteur VDR et certaines enzymes du métabolisme de la vitamine D, sont exprimés au niveau du tissu cardiaque et pourraient être impliqués dans la survenue des pathologies cardiovasculaires (105, 353). Dans des situations d'hypertrophie cardiaque, l'expression du VDR est augmentée (354) et chez l'animal, il a été récemment mis en évidence une association inverse entre l'expression du VDR au niveau des parois artérielles et l'épaisseur de l'athérome qui s'y développait (355).

A partir des modèles animaux, invalidés pour le gène *VDR*, l'implication du VDR dans le risque cardiovasculaire a été confirmée, avec une augmentation de la pression artérielle et l'apparition secondaire d'une hypertrophie ventriculaire gauche (356, 357).

Chez l'homme, le risque cardiovasculaire peut être évalué grâce au score de Framingham qui inclut le sexe, l'âge, les concentrations de cholestérol total, de LDL-CT et de HDL-CT, les niveaux de PA systoliques et diastoliques, la présence d'un diabète et la consommation de tabac (358).

En dehors de ces facteurs de risque cardiovasculaire classiques, des polymorphismes génétiques du *VDR* semblent associés à des profils cardiovasculaires différents d'un individu à l'autre. Toutefois, les études sont peu nombreuses et toujours rapportées au déficit en vitamine D lié à ces polymorphismes génétiques.

Ainsi, F.J. Van Schooten évoque le rôle prédictif des polymorphismes de *BsmI* dans la survenue d'une cardiopathie, avec une baisse des concentrations de la 25(OH)D associée à ce polymorphisme. En dépit du faible échantillon étudié, il a trouvé une association entre le génotype *bb* et la présence d'une cardiopathie sévère (359).

Les travaux de Kammerer suggèrent un lien possible entre les polymorphismes de *BsmI* et le risque d'athérosclérose mais à l'inverse des résultats de Van Schooten, ce sont les femmes porteuses du génotype *BB* qui avaient une épaisseur augmentée de l'intima média, comparées aux femmes non porteuses de ce génotype (360).

Dans une autre étude menée chez des Caucasiens, le génotype *BB* était aussi associé à des concentrations élevées de 25(OH)D et à une densité minérale osseuse fémorale augmentée laissant supposer un rôle protecteur de ce génotype contre le déficit en vitamine D (361).

Ortlepp et al ont rapporté une association entre le génotype *BB* et l'existence d'une coronaropathie chez 293 sujets à haut risque cardiovasculaire (362) mais ces données n'ont pas été confirmées dans l'échantillon de plus de 3000 sujets germaniques dans une autre étude menée par la même équipe (363).

D'autres études, plus récentes, n'ont pas trouvé d'association entre les polymorphismes du *VDR* et la présence d'une coronaropathie, dans des populations de taille plus importante que celle de Van Schouten mais d'origine ethnique asiatique (364, 365).

Toutes ces études confirment la disparité des polymorphismes du *VDR* selon les ethnies et la difficulté d'établir un lien de causalité directe entre ces polymorphismes et le risque cardiovasculaire.

II.3.4.2 Polymorphismes de gènes codant pour les protéines du métabolisme de la vitamine D (cytochrome CYP27B1, protéine de transport de la vitamine D ou DBP, enzyme Nicotinamide Adénine Dinucléotide synthétase ou NADSYN1)

II. 3.4.2.1 Description des polymorphismes

La production rénale de 1,25(OH)₂ D₃ est possible grâce au CYP27B1 dont le gène est situé sur le chromosome 12 (12q13.1-q13.3) et n'a été cloné qu'en 1997 (55, 366). CYP27B1 appartient à la superfamille des cytochromes P450. Trois SNPs du gène *CYP27B1* ont été identifiés: le rs10877012, situé dans la région 5' (C>A), le rs4646536 situé au niveau de l'intron 6 (T>C) et le rs8176345 situé au niveau de l'exon 5 (A>G). Dans la population Afro-Américaine, d'ascendance proche de la majorité de la population Guadeloupéenne, c'est le rs10877012 qui semble être le polymorphisme le plus fréquemment associé aux concentrations de vitamine D (10).

La DBP, protéine principale de transport de la 25(OH)D et de ses métabolites, est aussi appelée globuline GC (Group Component) (367). C'est une alpha-globuline de 58KDa, synthétisée par le foie et composée de 458 acides aminés après clivage d'un signal peptidique de 16 aminoacides (368). Contrairement à la vitamine D, les concentrations plasmatiques de la DBP ne varient pas selon les saisons (369). Par contre, elles peuvent influencer les concentrations libres plasmatiques de la vitamine D et de ses métabolites en modulant leur disponibilité et leur clairance métabolique (370).

La protéine GC est composée de 3 domaines :

- le domaine 1 est formé de 10 hélices alpha,
- le domaine 2 en comprend 9
- le domaine 3 en comprend 4 ce qui renforce sa stabilité (371) .

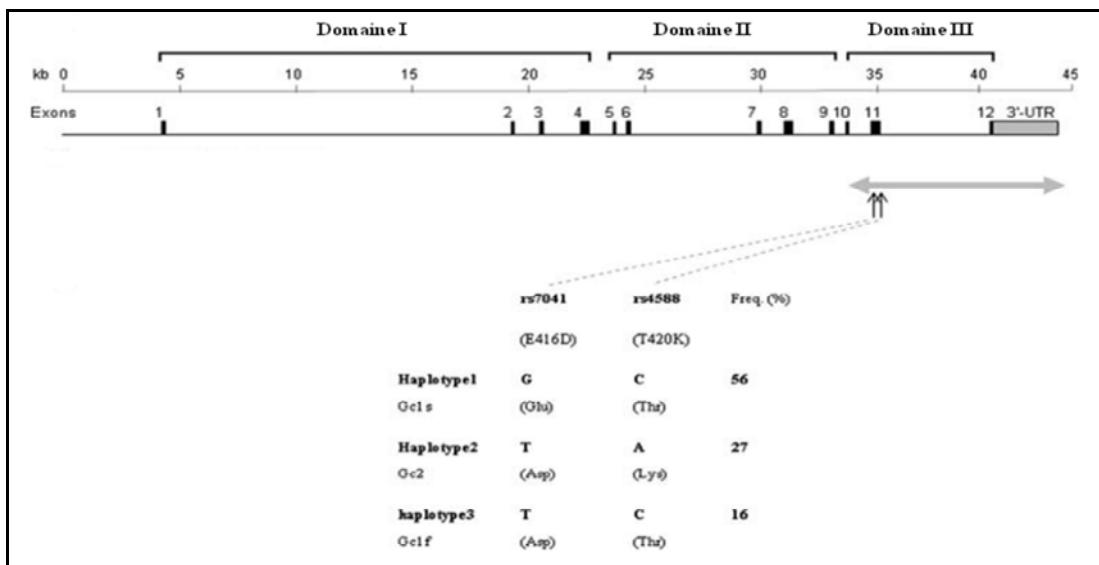
Cette protéine, découverte il y a plus de 40 ans (372-374) est codée par le gène *GC*, situé sur le bras long du chromosome 4 (4q12–q13). Ce gène de 35Kb comprend 12 exons et 1690 nucléotides (375, 376). Les polymorphismes de *GC* ont été précocement identifiés par immunoélectrophorèse (377) et de nombreux variants génétiques ont été rapportés dans la littérature (378, 379). Leur fréquence varie en fonction de l'ethnie à laquelle appartiennent les populations étudiées (380). Les deux variants génétiques les plus fréquemment analysés chez les Caucasiens sont le rs7041 (G>A) et le rs4588 (C>A). Ils codent pour les protéines Gc1F, Gc1S et Gc2 (51, 381). Les mécanismes de liaison avec la vitamine D varient en fonction de ces isoformes de *GC* d'affinité différente pour la 25(OH)D et la 1,25(OH)D (51, 382).

Dans les populations Afro-Américaines, ce sont les variants rs2298849 et rs2282679 qui sont les plus fréquemment trouvés (10).

Ces polymorphismes de *GC* seraient associés aux anomalies du métabolisme glucidique, à l'hyperinsulinisme (344), et à l'obésité (383).

Les mécanismes physiopathologiques impliqués sont encore mal connus mais on peut supposer que cette relation puisse être liée au déficit en vitamine D fréquemment associé à ces anomalies métaboliques.

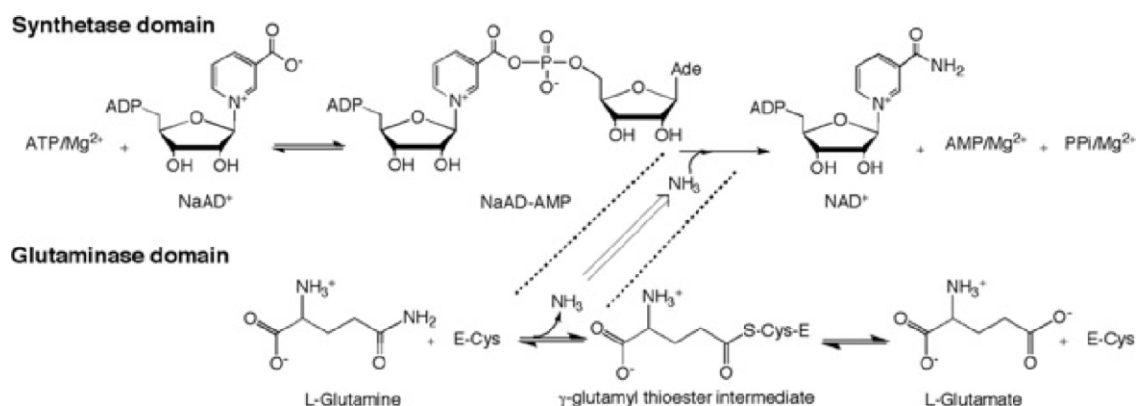
Figure 13: Structure du gène *GC* et exemple de variants analysés dans une population caucasienne (Gc1F, Gc1S et Gc2) (384)



*Domaines fonctionnels de la protéine GC: le domaine I est le domaine de liaison à la vitamine D et ses métabolites, les domaines II et III sont les domaines fonctionnels de la protéine.

La NADSYN1 est une Nicotinamide adénine di nucléotide (NAD⁺) synthétase, dépendante de la glutamine, qui catalyse la dernière étape de la biosynthèse du NAD⁺ de façon ATP dépendante (385, 386). Cette protéine appartient à la famille des glutamines aminotransférases (GAT), enzymes qui catalysent deux réactions couplées se produisant à deux sites actifs distants mais reliés par un tunnel d'ammoniac (387).

Figure 14: Réaction catalysée par la NADSYN1 (388)



Le NAD est un coenzyme qui agit comme précurseur de nombreuses protéines du signal de transduction intracellulaire et qui participe à de nombreuses réactions d'oxydoréduction dans la cellule. Le NAD est soit sous une forme d'agent oxydant (NAD⁺) qui accepte des électrons provenant d'autres molécules, soit sous une forme réduite (NADH), qui peut être utilisée comme un agent réducteur et donner des électrons. C'est un cofacteur essentiel à la synthèse des lipides et à la production du cholestérol (385).

Le gène codant pour la NADSYN1 est le *NADSYN1*. Il est situé sur le chromosome 11 en 11q13.4. Il est localisé à proximité du gène *DHCR7* qui code pour la 7-déhydrocholestérol réductase. Cette enzyme convertit le 7-déhydrocholestérol en cholestérol dans l'étape initiale de synthèse de la pré-vitamine D3 (389). Des polymorphismes de *NADSYN1* ont été décrits comme étant associés aux concentrations de 25(OH)D, particulièrement le rs12785878 qui correspond à un SNP (G>T) localisé en position intronique (NM_018161.4.). Ces polymorphismes de gènes codant pour des protéines du métabolisme de la vitamine D peuvent expliquer les variations de concentrations de la vitamine D et la prédisposition de certaines populations à des pathologies chroniques liées à la baisse de la vitamine D.

II 3.4.2.2 Vitamine D et polymorphismes génétiques de CYP27B1,

GC, et NADSYN1

3 études récentes du génome mettent en évidence l'association des polymorphismes de *CYP27B1*, *GC* et *NADSYN1* avec le statut en vitamine D de certaines populations.

La première étude réalisée chez 16125 sujets Européens a mis en évidence une association significative entre les concentrations de la 25(OH)D et les polymorphismes du gène codant pour le cytochrome CYP2R1, pour l'enzyme DHCR7 et pour la protéine de transport GC. Dans cette population, le risque d'insuffisance en vitamine D était élevé chez les sujets porteurs de variants génétiques de *GC* (390).

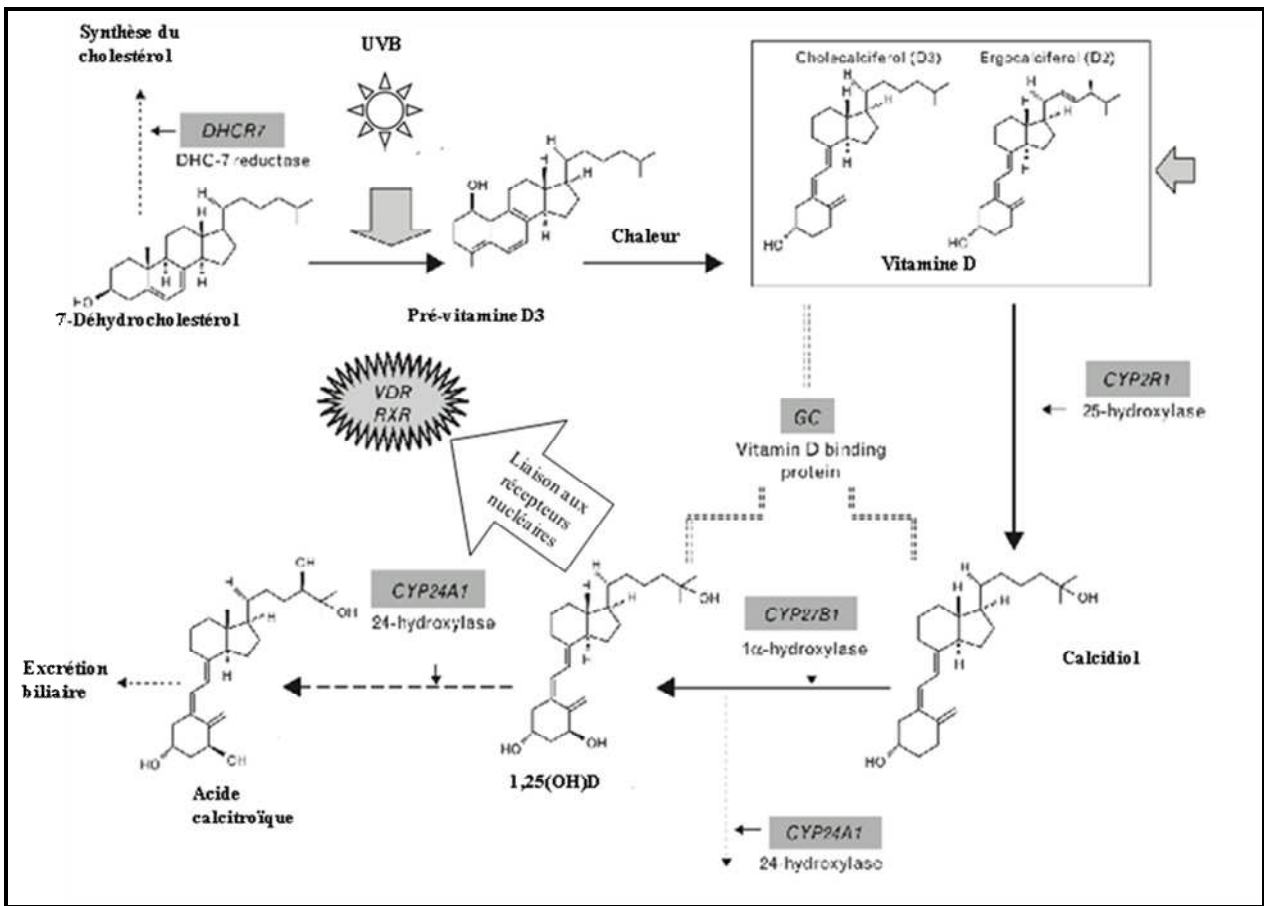
La deuxième étude a analysé les résultats de 5 études de cohortes (dont 3 études cas-contrôles) concernant des populations caucasiennes. Elle a mis en évidence une association significative entre les variants génétiques de *GC*, *NADSYNI* et *CYP2R1* et les concentrations de 25(OH)D (391).

La troisième étude a analysé les mêmes paramètres, à partir des données de l'étude transversale « Insulin Resistance Atherosclerosis Family Study » qui incluait des populations originaires d'ethnies différentes (Hispanique et Afro-Américaine). Des variants génétiques de *GC* étaient associés à la 25(OH)D et à la 1,25(OH)D dans ces groupes ethniques différents (392).

Ces travaux réalisés dans une population de petite taille n'ont pas été confirmés par Robien et al dans sa population de plus de 500 sujets d'origine asiatique (393). Ces résultats divergents semblent liés à la taille des échantillons étudiés (plus importante dans l'étude de Robien) mais aussi au non ajustement des résultats en fonction de la latitude, des saisons, de l'IMC ou de l'apport alimentaire en vitamine D, paramètres variables d'une étude à l'autre.

En définitive, bien qu'elles soient peu nombreuses, les études rapportées jusqu'ici ont mis en évidence une association significative entre les concentrations de la 25(OH)D et certains SNPs de *CYP27B1*, de *GC* et de *NADSYNI* (394, 395).

Figure 15 : Métabolisme de la vitamine D et place des variants génétiques (395)



CHAPITRE III.

PRÉSENTATION DES TRAVAUX DE RECHERCHE SUR LA VITAMINE D ET LES POLYMORPHISMES GENETIQUES (*VDR, GC, CYP27B1, NADSYN1*)

III.1 Évaluation des concentrations de 25(OH)D et de 1,25(OH)D chez des sujets insuffisants rénaux chroniques dialysés en Guadeloupe

En Guadeloupe, dans notre pratique quotidienne, nous sommes souvent sollicités pour la prise en charge du diabète chez les sujets insuffisants rénaux dialysés. Dans cette population, les perturbations du métabolisme glucidique sont fréquentes. Par contre, du fait d'un ensoleillement continu dans notre département, l'association possible entre l'existence d'un déficit en vitamine D et la survenue de ces anomalies métaboliques ne semblait pas évidente. En effet, l'absence d'hydroxylation de la 25(OH)D par la 1-alpha hydroxylase rénale, non fonctionnelle dans l'insuffisance rénale chronique ne devrait pas modifier le statut vitaminique D, évalué par le dosage de la 25(OH)D.

Compte tenu du climat ensoleillé en Guadeloupe, il était habituel de penser que l'exposition continue aux rayons solaires était un facteur protecteur pour le déficit en vitamine D et que l'insuffisance en vitamine D ne pouvait être un problème majeur de santé publique. De même, sur le plan thérapeutique, la vitamine D (ou ses analogues) était avant tout prescrite pour prévenir les complications osseuses, sources de morbi-mortalité chez le patient dialysé mais l'association possible du déficit en vitamine D avec les paramètres métaboliques ou les facteurs de risque cardiovasculaire n'était pas évoquée.

Au vu des connaissances actuelles sur la vitamine D, en particulier chez les sujets à la peau foncée, il nous semblait important d'analyser dans une population de sujets dialysés, les concentrations de 25(OH)D et de 1,25(OH)D, témoin de l'effet biologique réel de la vitamine D.

Il pourrait y avoir des relations entre les deux formes de vitamine D et les paramètres métaboliques dans ces situations de dialyse. Les études analysant, de manière simultanée les deux métabolites de la vitamine D sont rares.

Notre étude réalisée en collaboration avec les néphrologues, est la première abordant cette thématique dans la population des Antilles françaises. Avant nos travaux sur la vitamine D chez les patients dialysés (et donc avant 2011), le dosage de la 25(OH)D ne faisait pas partie du bilan systématique, annuel, des patients en insuffisance rénale chronique terminale en Guadeloupe. En effet, l'ensoleillement continu dans notre département, paraissait suffisant et protecteur du déficit en vitamine D.

Notre hypothèse de travail était que les associations identifiées avec les paramètres métaboliques (incluant le diabète, la dyslipidémie et l'obésité) seraient différentes pour la 25(OH)D et la 1,25(OH)D. Notre objectif était d'évaluer ces associations. Pour apprécier l'état du turn-over osseux, nous avons aussi recherché une relation entre ces 2 métabolites de la vitamine D, les paramètres phosphocalciques et les concentrations de PTH et de phosphatases alcalines chez ces sujets.

Cette étude a été conduite dans un des centres de dialyse du département de Guadeloupe (centre de dialyse AUDRA). Il s'agit d'un centre indépendant du CHU de Pointe-à-Pitre mais situé dans ses locaux (Hôpital RICOU). Environ 600 patients en insuffisance rénale chronique sont dialysés dans le département. Cette étude porte sur 209 patients, environ un tiers de la population totale des dialysés.

Notre étude est transversale et a été réalisée en janvier 2012. Les données recueillies incluaient l'âge, l'ancienneté en dialyse, les paramètres anthropométriques, la pression artérielle (en pré-dialyse), les facteurs de risque et complications cardiovasculaires (coronaropathie, accident vasculaire cérébral, artériopathie des membres inférieurs). Dans cette population, les patients traités recevaient uniquement de l'alphacalcidol. Le dosage sanguin de la 25(OH)D et de la 1,25(OH)D a été réalisé de façon systématique chez les 209 sujets qui ont accepté de participer à l'étude.

La population finale était âgée de 61 ± 14 ans et était majoritairement masculine (57%). La prévalence de la carence en vitamine D ($25(\text{OH})\text{D} < 15\text{ng/ml}$) était de 14,4% et celle de la déficience en vitamine D ($25(\text{OH})\text{D} < 30\text{ng/ml}$) de 62,2%. Comparés aux sujets ayant des concentrations de vitamine D normales, les sujets déficitaires en vitamine D avaient plus fréquemment des antécédents d'infarctus du myocarde et les sujets insuffisants en vitamine D, des antécédents d'accidents vasculaires cérébraux. Que les sujets soient traités ou non par la vitamine D, aucune association entre les concentrations de $25(\text{OH})\text{D}$ et de $1,25(\text{OH})\text{D}$ n'était trouvée.

Avec la régression linéaire multivariée, nous avons noté que le sexe féminin (Beta -4.63), le diabète (Beta -4.2) et l'indice de masse corporelle (Beta -0.4) étaient significativement associés aux concentrations de $25(\text{OH})\text{D}$. Ces paramètres expliquaient chacun 4 à 5% de la variation de la concentration en $25(\text{OH})\text{D}$. A l'inverse, les paramètres métaboliques n'étaient pas associés à la concentration en $1,25(\text{OH})\text{D}$. Seul le traitement par alphacalcidol était associé aux concentrations de $1,25(\text{OH})\text{D}$ et expliquait 5% de la variation de la $1,25(\text{OH})\text{D}$. Ainsi, en présence de ce traitement, une augmentation moyenne de 12ng/ml était notée pour la $1,25(\text{OH})\text{D}$ (Beta 12).

Malgré le climat ensoleillé, la prévalence de l'insuffisance en vitamine D reste encore élevée chez les patients hémodialysés (62,5%). En effet, plus de 90% des besoins en vitamine D proviennent de l'exposition aux rayons solaires. Mais, tous les patients de notre étude, d'origine Afro-Caribéenne, avaient une pigmentation cutanée foncée, et on sait que ces pigments mélaniques de l'épiderme sont responsables d'une diminution de l'absorption des UVB par la peau.

Cette prévalence élevée de l'insuffisance en vitamine D dans notre population de patients dialysés, est nettement inférieure à celles rapportées dans les études chez les Africains-Américains (85% à 100%) (396, 397). Pour ces patients Africains-américains, le climat tempéré

et l'existence d'une saison hivernale pourrait expliquer en partie ces taux élevés d'insuffisance en vitamine D.

Notre étude montre aussi la nécessité de prendre en compte certains paramètres métaboliques tels que le diabète ou l'obésité au cours de la prise en charge thérapeutique de l'insuffisance en vitamine D chez les dialysés.

Nos travaux ont contribué à une modification des protocoles thérapeutiques localement. La vitamine D native qui agit sur le PTH mais aussi sur le taux de 25 (OH)D (398) est ainsi plus fréquemment prescrite depuis ce travail.

Cette étude a fait l'objet d'un article intitulé « *Evaluation of 25(OH)D and 1,25(OH)D in Afro-Caribbean patients undergoing hemodialysis* ». Cet article a été soumis à publication à la revue « *Annals of Nutrition and Metabolism* ».

Evaluation of 25(OH) and 1,25(OH) vitamin D in Afro-Caribbean patients undergoing haemodialysis.

Running head: 25(OH)D and 1,25(OH)D in haemodialysis.

Fritz-Line Vélayoudom-Céphise^{1,2}, Jacques Ducros^{3,4}, Henri Mérault^{3,4}, Larbi Harrami⁴, Lydia Foucan^{1,5}.

1. Research group Clinical Epidemiology and Medicine, University of Antilles and Guyane, Guadeloupe, France.
2. Endocrinology Department, University Hospital, Pointe-à-Pitre, Guadeloupe, France.
3. AUDRA dialysis center, Ricou Hospital. Pointe-à-Pitre, Guadeloupe, France.
4. Nephrology Department, University Hospital, Pointe-à-Pitre Guadeloupe, France.
5. Public Health Department. University Hospital, Guadeloupe, France.

Correspondence: Dr Lydia Foucan, Département de Santé Publique. CHU de Pointe-à-Pitre. 97159 Pointe-à-Pitre Guadeloupe. France.

Tel: (590) 590 89 15 34. Fax: (590) 590 89 15 95.

e-mail: lfoucan@yahoo.fr, lydia.foucan@chu-guadeloupe.fr

Keywords: 1,25(OH) vitamin D; 25(OH) vitamin D; diabetes; dyslipidemia; alphacalcidol treatment; haemodialysis

Disclosures:

The authors declare no financial support and no conflict of interest.

Abstract

Background: We investigated the association between 25(OH)D, 1,25(OH)D and metabolic factors in Afro-Caribbean patients undergoing haemodialysis (HD).

Methods : Cross-sectional study of 209 patients. Statistical methods included χ^2 , ANCOVA adjusted for age, sex, and body mass index and linear regression.

Results : Obesity, dyslipidemia and diabetes concerned 20%, 30% and 37% of subjects respectively. Mean 25(OH)D and 1,25(OH)D levels was 28 ng/mL and 47 pmol/L respectively. Alphacalcidol treatment was prescribed for 56% of the subjects. We found no correlation between 25(OH)D and 1,25(OH)D levels. No relationship was found between 1,25(OH)D level and diabetes, dyslipidemia or obesity whereas a significant relationship was found for 25(OH)D level, only with diabetes ($P = 0.01$).

In linear regression and after adjustment for variables of interest, female (Beta -4.3; $P = 0.01$), diabetes (Beta -4.2; $P = 0.02$) and BMI (Beta -0.4; $P = 0.02$) were associated with 25(OH)D levels. For serum 1,25(OH)D levels, significant association was noted only with alphacalcidol treatment (Beta 12; $P = 0.002$).

Conclusions : Our results confirm the importance of obesity, diabetes, cardiovascular risk factor and female sex in evaluating the vitamin D status of HD patients, and the absence of correlation between 25(OH)D and 1,25(OH)D concentrations.

Introduction

Haemodialysis (HD) reflects the final stage of kidney failure, and is associated with 1,25 hydroxyvitamin D (1,25(OH)D) deficiency which is predominantly explained by a decline in renal 1-alpha-hydroxylase activity (1, 2). This enzyme designated CYP27B1, converts 25 hydroxyvitamin D (25(OH)D), the storage form, into 1,25(OH)D called “calcitriol”, the active form of vitamin D (3). Previous studies confirmed the existence of extra-renal sources of 1,25(OH)D, which explains why calcitriol levels are always detectable in patients with terminal chronic renal failure (4-6). Patients with chronic kidney disease (CKD) have a high risk of secondary hyperparathyroidism (SHPT) and bone turnover disease, as a result of vitamin D insufficiency (7, 8). In addition, cardiovascular risk factors are commonly found in these patients. The biological evaluation of vitamin D supplementation does not include the routine measurement of 1,25(OH)D concentrations, even in patients undergoing HD (9). Studies of both 25(OH)D and 1,25(OH)D concentrations are scarce. In our previous study of HD patients, we evaluated the vitamin D status and found a frequency of 60% of vitamin D insufficiency (25(OH)D < 30 ng/ mL) (10) but 1,25(OH)D was not measured.

We aimed to investigate simultaneously 25(OH)D and 1,25(OH)D concentrations in Afro-Caribbean HD patients and to determine the clinical and biological factors associated with these metabolites.

Subjects and methods

We performed a cross-sectional study of 209 haemodialysis patients in one of the five units of the “AUDRA Dialysis Center” in the island of Guadeloupe. All the patients were Caribbean, with dark skin. We measured 25(OH)D and 1,25(OH)D concentrations during January 2012. The others collected data included age, sex, time on HD, anthropometric parameters, history of cardiovascular risk factors, and vitamin D treatment. A fasting blood sample was obtained to measure serum lipids, calcium, phosphate, creatinine, glucose, and serum intact parathyroid

hormone (PTH). Serum concentrations of 25(OH)D were measured with a chemiluminescence assay (DiaSorin SA, Antony, France) evaluating both 25(OH)D₂ and 25(OH)D₃. A radioimmunoassay method was used to measure the serum concentrations of 1,25(OH)D (IDS 1,25-Dihydroxy Vitamin D EIA Kit, Immunodiagnostic Systems France, SA) with a detection threshold of 8 pmol/L. The PTH levels were measured with the ADVIA Centaur XP chemiluminescence system (Siemens Health Care Diagnostics Inc., Tarrytown, NY). The normal range of values for the assay was 14–72 pg/mL.

Statistics: Data are presented as percentages for categorical variables and as means \pm standard deviations (SD) for continuous variables. The patients were categorized in three groups according to 25(OH)D levels (<15 ng/mL; ≥ 15 - < 30 ng/mL and ≥ 30 ng/mL). Statistical methods included the χ^2 , ANCOVA adjusted for age, sex, and body mass index (BMI), and the Pearson's correlation test. We used linear regression analysis to study the associations between clinical and biological parameters, PTH above 300 pg/mL, alphacalcidol treatment as independent variables with levels of 25(OH)D and of 1,25(OH)D as dependent variables. The effects of the independent variables were assessed by the values of regression coefficients (Beta and their standard error (SE)) corresponding to the non-standardized regression coefficients.

In the multivariate models, adjustments were performed with all significant covariates at the level of $P=0.2$ in the univariate analysis. The IBM SPSS statistics 19 was used for data analysis. P values were two-sided and considered significant at a level < 0.05 .

Results

A total of 209 patients on HD were enrolled in the study. The sample comprised 90 (43%) women. The mean age of the study population was 61 ± 14 years, mean 25(OH)D levels was 28 ± 13 ng/mL and mean 1,25(OH)D was 47 ± 28 pmol/L. We noted prevalence of 14.4% for

vitamin D deficiency [25(OH)D < 15 ng/mL] and of 62.2% for vitamin D insufficiency [25(OH)D < 30 ng/mL].

Of the total subjects, 117 (56%) were receiving alphacalcidol as single intake of vitamin D (and most of them 0.5 µg / day), 160 (77%) received phosphate binders, 92 (44%) received a calcimimetic drug (cinacalcet) (30 to 180 mg / day) and 29 (14 %) had undergone parathyroidectomy. Characteristics of the study population are shown in table 1.

Significant differences were found between subjects in the three classes of 25(OH)D levels for frequencies of obesity, diabetes, history of myocardial infarction, history of stroke, use of phosphate binders, alphacalcidol treatment and parathyroidectomy (table 1).

We found no correlation between 25(OH)D and 1,25(OH)D levels in patients receiving alphacalcidol ($r = 0.10$, $P = 0.28$) or in the untreated patients ($r = 0.03$, $P = 0.77$). No significant differences were noted in the biological profiles of patients treated or not treated with alphacalcidol in terms of serum calcium, phosphate, PTH or alkaline phosphatase levels (data not shown). Serum 1,25(OH)D levels was significantly higher in patients receiving alphacalcidol than in the others (52.7 ± 32 vs 39.8 ± 21 ; $P < 0.001$).

Table 2 presents the distribution of the vitamin D metabolites according to the metabolic parameters. Vitamin D deficiency [25(OH)D < 15 ng/mL] was associated with diabetes, dyslipidemia and obesity whereas vitamin D insufficiency [25(OH)D < 30 ng/mL] was not associated with dyslipidemia. No significant relationship was noted between serum 1,25(OH)D level and the three metabolic parameters and a significant relationship was noted only between serum 25(OH)D level and diabetes.

Table 3 presents the results of the linear regressions for serum 25(OH)D and for serum 1,25(OH)D levels.

After univariate analysis for serum 25(OH)D levels, considering separately each independent variable, significant associations were noted with female, diabetes and BMI. After multivariate analysis, female ($P = 0.01$), diabetes ($P = 0.02$) and BMI ($P = 0.02$) remained

significant. This multivariate model accounted for 13% ($r^2 = 0.13$) of the variation in 25(OH)D levels.

For serum 1,25(OH)D levels, in the univariate analysis a statistically significant association was noted only with alphacalcidol treatment. In the multivariate analysis, alphacalcidol treatment remained significant ($P = 0.002$). This multivariate model accounted for 6% ($r^2 = 0.06$), of the variation in 1,25(OH)D levels.

Discussion

This is the first study of 25(OH)D and 1,25(OH)D levels in a HD Caribbean population having about 60% of vitamin D insufficiency (10). Serum levels of 25(OH)D reflect dietary intake and UV-B exposure and are used to define vitamin D deficiency whereas 1,25(OH)D is considered to be the active form of vitamin D (11). No significant relationship was found between diabetes, dyslipidemia and obesity with 1,25(OH)D levels but, a significant relationship was found between 25(OH)D levels and diabetes. Furthermore, vitamin D deficiency was associated with the three metabolic factors.

In our study sample, we noted 62% for vitamin D insufficiency (25(OH)D < 30 ng/mL) whereas in a study conducted in 372 African-American HD patients, the authors reported a 88% of vitamin D insufficiency at the initiation of HD before administration of any exogenous activated vitamin D (9). This difference might be explained by the benefit effect of the continually sunny climate in our island with a high and constant intensity of UV-B radiation (10).

In our study and as described in previous studies (1, 12), women, diabetic, patients with previous cardiovascular events and obese patients had more frequently low levels of 25(OH)D. That could be explained, in obese by the storage of 25(OH)D in adipose tissue (13, 14). Diabetes was also associated with low values of 25(OH)D. Vitamin D has been shown to be involved in the pathogenesis of type 1 and type 2 diabetes (15) and with insulin sensitivity

reduction and glucose intolerance (16). Consistent with this, in a recent study of Afro-Caribbean non-HD patients with diabetes, we reported the prevalence of vitamin D deficiency to be 42.6% ($25(\text{OH})\text{D} < 20 \text{ ng/mL}$) (17). Metabolic syndrome (MetS), a cluster of several cardiovascular risk factors (including hypertension, dyslipidemia, abdominal obesity and hyperglycemia) is commonly found in patients with end stage renal disease. The MetS components are associated with low $25(\text{OH})\text{D}$ concentrations which could be linked to malnutrition in patients undergoing dialysis (18).

We found no significant differences, in terms of serum calcium, phosphate, PTH, $25(\text{OH})\text{D}$ levels, between patients receiving or not receiving alphacalcidol treatment. In CKD, reduced levels of $1,25(\text{OH})\text{D}$ and the lack of renal phosphate excretion are responsible for low levels of plasma calcium and high levels of phosphate, which cause increased synthesis and secretion of PTH (19) leading to bone remodelling (20, 21). The vitamin D analogs cannot increase $25(\text{OH})\text{D}$ levels and restore the stored form of vitamin D in HD patients but increase $1,25(\text{OH})\text{D}$. So they are recommended mainly because of their effectiveness in the treatment of SPTH (22).

With multivariate linear regression, we noted that female (Beta -4.63), diabetes (Beta -4.2) and BMI (Beta -0.4) were associated with a decrease in $25(\text{OH})\text{D}$ levels. These parameters explained each, 4% to 5% in the variation of $25(\text{OH})\text{D}$ levels. Conversely, alphacalcidol treatment alone (Beta 12) was associated with an increase in $1,25(\text{OH})\text{D}$ levels and this treatment explain 5% in the variation of this vitamin D metabolite.

We found no correlation between $25(\text{OH})\text{D}$ and $1,25(\text{OH})\text{D}$ in patients not receiving alphacalcidol treatment. Reports of this association are controversial. A positive association between both vitamin D forms was reported in non-diabetic and non-dialysis CKD patients living in a sunny country (23). In other studies, this association was not found in non-dialysed CKD patients (3, 24). Some authors evaluated $1,25(\text{OH})\text{D}$ deficiency ($< 25 \text{ pg/mL}$) and $25(\text{OH})\text{D}$ deficiency ($< 15 \text{ ng/mL}$) at baseline and after 12 months of follow-up (25). They

found that new isolated 1,25(OH)D deficiency was more frequent than new 25(OH)D deficiency in patients with 25(OH)D sufficiency at baseline. Their first hypothesis to explain this result was a reduction in renal hydroxylation in CKD although extra-renal sources of 1,25(OH)D exist (26). These authors posed the question of the measurement of both vitamin D metabolites. We must nevertheless taking in mind the short half-life of 1,25(OH)D in circulation leading to a variability in its concentrations. It has been previously reported that in vitamin D deficiency, 1,25(OH)D may be normal, high or low (11).

In the present study, our HD patients received alphacalcidol, as other teams have done before us according to the KDOQI guidelines (22, 27) in which native vitamin D was advised for non-dialysed CKD patients. Presently, according to KDIGO guidelines, we supplement our HD patients with native vitamin D since monthly administration of Cholecalciferol to HD patients increases 25(OH)D (28, 29). This treatment also increases 1,25(OH)D levels and reduces PTH and bone markers levels (30).

Our study had some limitations, including its cross-sectional design. There was also no validated threshold by which to define 1,25(OH)D insufficiency/deficiency, and the optimal concentration of this form of vitamin D has not yet been established. We also made only a single measurement of each form of vitamin D and we did not measure non-traditional bone markers, which could have clarified our results.

Nevertheless, in this study, we analysed 25(OH)D and 1,25(OH)D simultaneously, taking into account alphacalcidol treatment. We have thus provided significant information about Caribbean HD patients, for whom this kind of study is rare. This study has also allowed us to improve our HD patients care.

Our study confirms the importance of obesity, diabetes, history of cardiovascular events and female sex in evaluating the vitamin D status of HD patients, and the absence of correlation between 25(OH)D and 1,25(OH)D concentrations.

Acknowledgements. We would like to acknowledge the physicians of the AUDRA haemodialysis center and all individuals who participated in this study. We also thank Dr Mujahid Nyahuma and Dr Tahiya Nyahuma (Health Link International) for their contribution.

References

1. Bhan I, Burnett-Bowie SA, Ye J, Tonelli M, Thadhani R. Clinical measures identify vitamin D deficiency in dialysis. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2010 Mar;5(3):460-7.
2. Patel TV, Singh AK. Role of vitamin D in chronic kidney disease. *Semin Nephrol.* 2009 Mar;29(2):113-21.
3. Ishimura E, Nishizawa Y, Inaba M, Matsumoto N, Emoto M, Kawagishi T, et al. Serum levels of 1,25-dihydroxyvitamin D, 24,25-dihydroxyvitamin D, and 25-hydroxyvitamin D in nondialyzed patients with chronic renal failure. *Kidney Int.* 1999 Mar;55(3):1019-27.
4. Lambert PW, Stern PH, Avioli RC, Brackett NC, Turner RT, Greene A, et al. Evidence for extrarenal production of 1 alpha ,25-dihydroxyvitamin D in man. *J Clin Invest.* 1982 Mar;69(3):722-5.
5. Jean G, Terrat JC, Vanel T, Hurot JM, Lorriaux C, Mayor B, et al. Evidence for persistent vitamin D 1-alpha-hydroxylation in haemodialysis patients: evolution of serum 1,25-dihydroxycholecalciferol after 6 months of 25-hydroxycholecalciferol treatment. *Nephron Clin Pract.* 2008;110(1):c58-65.
6. Dusso AS, Finch J, Brown A, Ritter C, Delmez J, Schreiner G, et al. Extrarenal production of calcitriol in normal and uremic humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 1991 Jan;72(1):157-64.
7. Lips P. Vitamin D deficiency and secondary hyperparathyroidism in the elderly: consequences for bone loss and fractures and therapeutic implications. *Endocr Rev.* 2001 Aug;22(4):477-501.
8. Khan S. Vitamin D deficiency and secondary hyperparathyroidism among patients with chronic kidney disease. *Am J Med Sci.* 2007 Apr;333(4):201-7.
9. Wolf M, Betancourt J, Chang Y, Shah A, Teng M, Tamez H, et al. Impact of activated vitamin D and race on survival among haemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol.* 2008 Jul;19(7):1379-88.
10. Foucan L, Ducros J, Merault H. Vitamin D status in dark-skinned patients undergoing haemodialysis in a continually sunny country. *J Nephrol.* 2012 Jan 17:0.
11. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med.* 2007 Jul 19;357(3):266-81.
12. Jean G, Charra B, Chazot C. Vitamin D deficiency and associated factors in haemodialysis patients. *J Ren Nutr.* 2008 Sep;18(5):395-9.
13. Bell NH, Epstein S, Greene A, Shary J, Oexmann MJ, Shaw S. Evidence for alteration of the vitamin D-endocrine system in obese subjects. *J Clin Invest.* 1985 Jul;76(1):370-3.
14. Wortsman J, Matsuoka LY, Chen TC, Lu Z, Holick MF. Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. *Am J Clin Nutr.* 2000 Sep;72(3):690-3.

15. Reis AF, Hauache OM, Velho G. Vitamin D endocrine system and the genetic susceptibility to diabetes, obesity and vascular disease. A review of evidence. *Diabetes Metab.* 2005 Sep;31(4 Pt 1):318-25.
16. Nazarian S, St Peter JV, Boston RC, Jones SA, Mariash CN. Vitamin D3 supplementation improves insulin sensitivity in subjects with impaired fasting glucose. *Transl Res.* 2011 Nov;158(5):276-81.
17. Velayoudom-Cephise FL, Larifla L, Donnet JP, Maimaitiming S, Deloumeaux J, Blanchet A, et al. Vitamin D deficiency, vitamin D receptor gene polymorphisms and cardiovascular risk factors in Caribbean patients with type 2 diabetes. *Diabetes Metab.* 2011 Dec;37(6):540-5.
18. Fouque D, Kalantar-Zadeh K, Kopple J, Cano N, Chauveau P, Cuppari L, et al. A proposed nomenclature and diagnostic criteria for protein-energy wasting in acute and chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2008 Feb;73(4):391-8.
19. Slatopolsky E, Brown A, Dusso A. Pathogenesis of secondary hyperparathyroidism. *Kidney Int Suppl.* 1999 Dec;73:S14-9.
20. Brandi L. 1 α (OH)D₃ One-alpha-hydroxy-cholecalciferol--an active vitamin D analog. Clinical studies on prophylaxis and treatment of secondary hyperparathyroidism in uremic patients on chronic dialysis. *Dan Med Bull.* 2008 Nov;55(4):186-210.
21. Peters BS, Moyses RM, Jorgetti V, Martini LA. Effects of parathyroidectomy on bone remodeling markers and vitamin D status in patients with chronic kidney disease-mineral and bone disorder. *Int Urol Nephrol.* 2007;39(4):1251-6.
22. Maheut H, Chevriot F, Marty H, Lavaud S, Kazes I, Chanard J, et al. [Why and how correct calcidiol deficiency in haemodialysis patients?]. *Nephrol Ther.* 2009 Nov;5(6):542-9.
23. Cuppari L, Carvalho AB, Draibe SA. Vitamin D status of chronic kidney disease patients living in a sunny country. *J Ren Nutr.* 2008 Sep;18(5):408-14.
24. Urena-Torres P, Metzger M, Haymann JP, Karras A, Boffa JJ, Flamant M, et al. Association of kidney function, vitamin D deficiency, and circulating markers of mineral and bone disorders in CKD. *Am J Kidney Dis.* 2011 Oct;58(4):544-53.
25. Levin A, Le Barbier M, Er L, Andress D, Sigrist MK, Djurdjev O. Incident isolated 1,25(OH)₂D₃ deficiency is more common than 25(OH)D deficiency in CKD. *J Nephrol.* 2011 Jun 16.
26. Zehnder D, Bland R, Williams MC, McNinch RW, Howie AJ, Stewart PM, et al. Extrarenal expression of 25-hydroxyvitamin d(3)-1 alpha-hydroxylase. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 Feb;86(2):888-94.
27. Martin CJ, Reams SM. The renal dietitian's role in managing hyperphosphatemia and secondary hyperparathyroidism in dialysis patients: a national survey. *J Ren Nutr.* 2003 Apr;13(2):133-6.
28. KDIGO clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD). *Kidney Int Suppl.* 2009 Aug(113):S1-130.
29. Jean G, Terrat JC, Vanel T, Hurot JM, Lorriaux C, Mayor B, et al. Daily oral 25-hydroxycholecalciferol supplementation for vitamin D deficiency in haemodialysis patients: effects on mineral metabolism and bone markers. *Nephrol Dial Transplant.* 2008 Nov;23(11):3670-6.
30. Jean G, Vanel T, Terrat JC, Hurot JM, Lorriaux C, Mayor B, et al. Treating mineral metabolism disorders in patients undergoing long haemodialysis: a search for an optimal strategy. *Hemodial Int.* 2009 Oct;13(4):526-32.

Table 1: Characteristics of patients undergoing haemodialysis according to 25(OH)D levels.

Variables	25 OH D				P
	All	< 15 ng/mL	≥ 15 - < 30 ng/mL	≥ 30 ng/mL	
	N = 209	n = 30	n = 100	n = 79	
Age (years)	62 ± 14	63 ± 12	62 ± 14	61 ± 15	0.77
Sex (female)	43%	50%	48%	34%	0.13
Duration of dialysis (years)	7.2 ± 5	8.4 ± 6	7.0 ± 5	6.9 ± 6	0.78
Waist circumference (cm)	94 ± 15	100 ± 17	95 ± 15	91 ± 14 ^{††}	0.38
BMI (kg/m ²)	25 ± 5.4	27 ± 6.5	26 ± 5.0 ^{***}	24 ± 4.9 ^{††}	0.009
Obesity	20%	37% [*]	23% ^{***}	10% ^{**}	0.005
Diabetes (%)	37%	53% [*]	39% ^{***}	28% ^{**}	0.04
Hypertension (%)	90%	92%	90%	89%	0.74
Dyslipidaemia (%)	30%	48% [*]	27%	29%	0.10
History of myocardial infarction (%)	7%	13% [†]	2% ^{†††}	11% ^{**}	0.02
History of stroke (%)	8%	10%	13% ^{†††}	1.3% ^{**}	0.02
Parathyroidectomy (%)	14%	23% [†]	18% ^{†††}	5%	0.01

Cinacalcet	44%	37%	52% ^{***}	38%	0.08
Phosphate binders	77%	67%	87% ^{†††}	67%	0.003
Alphacalcidol treatment (%)	56%	57%	64% ^{***}	46%	0.04
Serum calcium (mmol/L)	2.2 ± 0.3	2.2 ± 0.3	2.2 ± 0.3	2.2 ± 0.2	0.88
Serum phosphate (mmol/L)	1.5 ± 0.6	1.6 ± 0.7	1.5 ± 0.6	1.5 ± 0.6	0.66
Serum PTH (pg/mL)	484 ± 464	373 ± 426	539 ± 512	458 ± 407	0.19
Serum 25(OH)D (ng/mL)	28 ± 13	—	—	—	—
Serum 1,25(OH)D (pmol/L)	47 ± 28	46 ± 25	48 ± 31	46 ± 25	0.84

For comparison of group 25(OH)D < 15 ng/mL vs group ≥ 15 - < 30 ng/mL: * p < .05, † p < .01, ‡ p < .001.

For comparison of group 25(OH)D < 15 ng/mL vs group ≥ 30 ng/mL : ** p < .05, †† p < .01, ††† p < .001.

For comparison of group 25(OH)D ≥ 15 - < 30 ng/mL vs group ≥ 30 ng/mL: *** p < .05, ††† p < .01, †††† p < .001.

Table 2 : Distribution of vitamin D metabolites according to Diabetes, Dyslipidemia and Obesity in patients undergoing haemodialysis.

	Diabetes			Dyslipidemia			Obesity		
	YES	NO	<i>P</i>	YES	NO	<i>P</i>	YES	NO	<i>P</i>
	n = 77	n = 132		n = 63	n = 146		n = 42	n = 167	
Serum 25(OH)D (ng/mL)*	25.3 ± 12	29.3 ± 30	0.01	27.1 ± 13	28.2 ± 13	0.35	26.1 ± 9	28.3 ± 3	0.45
Serum 25(OH)D < 30 (ng/mL)	71%	57%	0.04	65%	61%	0.57	81%	58%	0.005
Serum 25(OH)D < 15 (ng/mL)	21%	11%	0.03	22%	11%	0.03	26%	11%	0.01
Serum 1,25(OH)D (pmol/L)*	44 ± 23	49 ± 31	0.16	45 ± 23	48 ± 30	0.55	43 ± 21	48 ± 30	0.72
Alphacalcidol treatment	48%	61%	0.08	59%	55%	0.60	55%	62%	0.39

*ANCOVA adjusted for age, sex, BMI, alphacalcidol treatment.

Table 3: Linear regression for 25(OH) vitamin D and for 1 25(OH) vitamin D levels.

Variables	25 (OH) D (ng/mL)					1-25 (OH) D (pmol/L)				
	Univariate			Multivariate*		Univariate			Multivariate**	
	Beta (SE)	<i>P</i>	<i>r</i> ²	Beta (SE)	<i>P</i>	<i>P</i>	<i>r</i> ²	Beta (SE)	<i>P</i>	
Sex (female)	- 5.6 (1.7)	0.01	0.05	-4.3 (1.7)	0.01	0.78 (3.9)	0.84	<0.001	—	—
Age	- 0.06 (0.06)	0.33	0.005	—	—	- 0.11 (0.14)	0.43	0.003	—	—
Duration of dialysis	0.008 (0.10)	0.96	<0.001	—	—	- 0.12 (0.36)	0.43	0.74	—	—
Diabetes	- 5.1 (1.8)	0.004	0.04	-4.2 (1.8)	0.02	- 6.2 (4.0)	0.12	0.01	-4.6 (3.9)	0.24
Hypertension	0.22 (3.0)	0.94	<0.001	—	—	- 2.7 (6.6)	0.68	0.001	—	—
BMI	-0.51 (0.2)	0.002	0.05	-0.38 (0.2)	0.02	0.07 (0.36)	0.84	<0.001	—	—
Serum calcium	-0.38 (3.1)	0.90	<0.001	—	—	-1.1 (6.9)	0.86	<0.001	—	—
PTH > 300 pg/mL	2.9 (1.7)	0.10	0.01	2.9 (1.7)	0.08	1.7 (3.9)	0.65	0.001	—	—
Alphacalcidol	- 2.6 (1.8)	0.14	0.01	- 2.6 (1.7)	0.13	13 (3.8)	0.01	0.05	12 (3.8)	0.002

- $R^2 = 13\%$ for the multivariate model of 25(OH) . ** $R^2 = 6\%$ for the multivariate model of 1.25(OH)

III.2 Étude du déficit en vitamine D, des polymorphismes du VDR et de leur association aux facteurs de risque cardiovasculaire dans une population de diabétiques de type 2 d'origine Afro-Caribéenne.

D'après les données de la littérature précisées dans les chapitres précédents, le déficit en vitamine D pourrait être considéré comme un facteur de risque supplémentaire des anomalies du métabolisme glucidique et des pathologies cardiovasculaires. Il est associé au diabète de type 2, aux situations d'insulinorésistance, à l'obésité et aux cardiopathies ischémiques.

Nous avons émis l'hypothèse que dans la population Afro-Caribéenne de Guadeloupe, le déficit en vitamine D pourrait être associé au profil anthropométrique et aux facteurs de risque cardiovasculaire dans cette même population où la prévalence de l'obésité et des pathologies cardiovasculaires est en augmentation.

Par ailleurs, comme il a été rappelé dans les chapitres précédents, les effets biologiques de la vitamine D ne sont possibles qu'après activation du complexe VDR-RXR-VDRE. Des polymorphismes du gène codant le VDR ont été identifiés et leur association avec le statut en vitamine D ou avec le risque de pathologies cardiovasculaires a été rapportée dans des populations d'origine ethnique différente.

Une autre de nos hypothèses de recherche, dans cette population Afro-Caribéenne, était que les polymorphismes génétiques du VDR pourraient être associés au déficit en vitamine D et à un profil métabolique à risque cardiovasculaire.

Pour cela, nous avons réalisé une étude transversale chez 277 sujets diabétiques de type 2, recrutés dans le service de diabétologie du CHU de Pointe-à-Pitre. Tous les sujets avaient signé le consentement éclairé avant inclusion dans l'étude.

Les objectifs de cette étude étaient les suivants :

- Évaluer la prévalence du déficit et de l'insuffisance en vitamine D chez ces sujets Afro-Caribéens diabétiques
- Analyser les relations entre le statut vitaminique D et les différents facteurs de risque cardiovasculaire (obésité, dyslipidémie, HTA)
- Analyser les relations entre le statut vitaminique D et les principaux polymorphismes du *VDR*.
- Évaluer l'association entre le déficit en vitamine D, les polymorphismes du *VDR* et les facteurs de risque cardiovasculaire.

Dans la population étudiée, 72,6% des diabétiques étaient d'origine Afro-Caribéenne et 27,4% étaient des descendants de migrants indiens. 36% des sujets étaient obèses.

La prévalence du déficit en vitamine D ($25(\text{OH})\text{D} < 20\text{ng/ml}$) et de l'insuffisance en vitamine D ($25(\text{OH})\text{D} < 30\text{ng/ml}$) a été évaluée respectivement à 42,6 et 89,9% dans l'ensemble de la population.

Nous avons aussi évalué le statut vitaminique D en fonction de l'IMC. Le déficit en vitamine D était retrouvé chez 52,5% des sujets obèses versus 37,1% des non obèses ($p=0,02$). Dans l'ensemble de la population, après régression logistique, les concentrations de $25(\text{OH})\text{D}$ étaient inversement corrélées à l'IMC ($r = -0,15$; $p=0,01$). L'odds ratio (OR) de l'obésité était de 0,94 (0,90-0,98); $p=0,02$ pour la vitamine D après ajustement pour l'âge, le sexe et le groupe ethnique (tableau ci-dessous).

<i>Paramètres</i>	Sujets obèses	Sujets non obèses	<i>p</i>
N	99 (36%)	178	
Sexe : hommes	27,3%	43,8%	0,007
femmes	72,7%	56,2%	
Sujets Afro-Caribbéens	79,8%	68,5%	0,04
Sujets d'origine indienne	20,2%	31,5%	
Age (années)	62,4 (13,62)	64,8 (10,22)	0,05
IMC (Kg/m²)	34,6±4,99	25,8±2,73	0,001
Tour de taille (cm)	97 (11)	101 (13)	0,05
HDL-CT (mmol/L)	1,35±0,35	1,33±0,46	0,70
Log TG	0,05 (0,21)	0,01 (0,23)	0,06
25 OH vit D (ng/mL)	19,8 (0,67)	21,6 (0,5)	0,001
Déficit en Vit D <20ng/ml	52,5%	37,1%	0,02

Les résultats de ces analyses ont été présentés en communication orale, au congrès de la MSDA (Metabolic Syndrome, Type II Diabetes and Atherosclérosis Congress) en 2010.

Par ailleurs, nous avons évalué le profil métabolique et cardiovasculaire des sujets en fonction de l'existence ou non d'un déficit en vitamine D.

Nous n'avons pas trouvé de différence significative en termes d'âge, de PA systolique, de concentrations de LDL-CT ou d'HbA1C dans les 2 groupes. L'IMC était significativement plus élevé en cas de déficit vitaminique D (29,8 vs 28,3 Kg/m²).

Le déficit en vitamine D était significativement associé à une PA diastolique et des concentrations de triglycérides (TG) plus élevées et à un HDL-CT plus bas ($p < 0,05$).

En analyse univariée, après régression logistique, le déficit en 25(OH)D était significativement associé à l'obésité (OR=1,88 [1,14-3,10]; $P=0,01$) et aux taux de HDL-CT et de TG. Hormis le

HDL-CT, cette association persistait en analyse multivariée. En conclusion, dans cette population de DT2, le déficit en vitamine D est associé à un profil à risque cardiovasculaire: IMC élevé et hypertriglycémie.

Ces résultats ont été présentés au congrès de la SFD (Société Francophone du diabète) en 2011, sous l'intitulé «Prévalence du déficit en vitamine D dans une population caribéenne de diabétique de type 2 : association aux facteurs de risque cardiovasculaire ».

Afin d'étayer notre hypothèse sur le lien possible entre polymorphismes du VDR, statut en vitamine D et facteurs de risque cardiovasculaire, nous avons analysé 4 SNPs du VDR dans cette population : ApaI, BsmI, FokI et TaqI et distingué les sujets déficitaires en vitamine D des sujets non déficitaires. Nous avons utilisé le test chi-2 pour analyser la relation entre les variables catégorielles et le test ANCOVA (analyse de la covariance) pour analyser l'effet de notre variable catégorielle (déficit en vitamine D puis polymorphismes) sur les variables continues (paramètres cliniques et biologiques). Nous avons ajusté les résultats pour de potentiels facteurs de confusion : l'âge, le sexe et l'IMC. Nous avons réalisé, dans un premier temps, une régression logistique univariée puis nous avons introduit dans l'analyse multivariée toutes les variables ayant une valeur de $p < 0,20$ dans l'analyse univariée, ainsi que les facteurs de confusion (âge, sexe, BMI).

Une première analyse nous a permis de constater que la répartition des génotypes pour le polymorphisme FokI, était fonction de la présence d'une obésité. Aucune association n'était retrouvée en fonction de l'ascendance Indienne ou Afro-Caribéenne (tableau ci-dessous).

Répartition du polymorphisme FokI du VDR:

CC: 3%, TC: 37%, TT: 60% en présence d'une obésité

CC: 9%, TC: 34%, TT: 57% en absence d'une obésité

Les porteurs du génotype CC (CC vs TC/TT) pour FokI avaient un risque significativement diminué d'obésité (OR=0,25 [0,07 – 0,96]; p=0,04).

Ce travail a été présenté en communication orale au congrès de la MSDA et aux 11^{ème} journées thématiques de Biologie Médicale de la Guadeloupe en 2010.

Une deuxième analyse nous a permis d'évaluer l'influence des polymorphismes du VDR sur les concentrations de vitamine D chez ces sujets diabétiques.

Dans notre étude, les concentrations de 25(OH)D étaient plus basses chez les sujets avec le génotype bb (SNP BsmI) comparés aux sujets avec le génotype BB/Bb (18,9 v 21,2 ng/l, p=0,02).

La prévalence du déficit en vitamine D était plus basse en présence du génotype aa (SNP ApaI) comparé au génotype AA/Aa génotype (28% v 46%, p=0,02). Un résultat similaire était retrouvé chez les sujets porteurs de l'allèle f c'est à dire du génotype Ff ou ff (SNP FokI) comparés aux sujets porteurs du génotype FF (33% v 49%, p = 0,02).

Après analyse multivariée, persistait l'association du déficit en vitamine D avec l'obésité (OR : 2,31, p =0,004), les concentrations de triglycérides (OR : 1,44, p =0,05) mais aussi avec la présence du génotype aa du SNP ApaI SNP (OR : 0,46, p =0,05) et de l'allèle f du SNP FokI (OR : 0,52, p =0,02).

Ce travail a fait l'objet d'un article original intitulé « Vitamin D deficiency, vitamin D receptor gene polymorphisms and cardiovascular risk factors in Caribbean type 2 diabetic subjects », publié dans la revue Diabetes and Metabolism (399).



ELSEVIER
MASSON

Available online at
ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com/en

Diabetes
& Metabolism

Diabetes & Metabolism 37 (2011) 540–545

Original article

Vitamin D deficiency, vitamin D receptor gene polymorphisms and cardiovascular risk factors in Caribbean patients with type 2 diabetes[☆]

F.-L. Vélayoudom-Céphise^a, L. Larifla^a, J.-P. Donnet^b, S. Maimaitiming^c, J. Deloumeaux^a,
A. Blanchet^a, C. Massart^d, N. Munoz-Bellili^c, S. Merle^a, R. Chout^a, F. Bonnet^e, L. Foucan^{a,*}

^a Research Group, Clinical Epidemiology and Medicine, University Hospital of Guadeloupe, University of Antilles and Guyane, France

^b Unit of Endocrinology-Diabetology, University Hospital of Guadeloupe, France

^c Inserm, U695, Faculty of Medicine Xavier-Bichat, Paris, France

^d Unit of Hormonology, University Hospital Pontchaillou, Rennes, France

^e Unit of Endocrinology-Diabetology and nutrition, University Hospital South, Rennes, France

Received 1st December 2010; received in revised form 30 May 2011; accepted 31 May 2011

Available online 18 July 2011

Abstract

Aim. – The prevalence of diabetes in the French West Indies is three times higher than in mainland France. We aimed to assess the associations between vitamin D deficiency, vitamin D receptor (*VDR*) gene polymorphisms and cardiovascular risk factors in Caribbean patients with type 2 diabetes (T2D).

Methods. – In this cross-sectional study of 277 patients, 25-hydroxyvitamin D was measured by radioimmunoassay. *FokI*, *BsmI*, *ApaI* and *TaqI* single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the *VDR* gene were genotyped. Analysis of covariance and logistic regression were performed.

Results. – The study included 76 patients of Indian descent and 201 patients of African descent. The prevalence of vitamin D deficiency (<20 ng/mL) was 42.6%. When patients were classified into groups with (G1) and without (G2) vitamin D deficiency, there were no significant differences in age, systolic blood pressure, low-density lipoprotein cholesterol and HbA_{1c}, although body mass index was significantly higher in G1. Vitamin D deficiency was significantly associated with increased diastolic blood pressure and triglyceride levels, and reduced high-density lipoprotein cholesterol ($P < 0.05$). Prevalence of vitamin D deficiency was decreased in patients carrying the f allele of *FokI* (OR: 0.52; $P = 0.02$) and the aa genotype of *ApaI* (OR: 0.46; $P = 0.05$). *BsmI* and *TaqI* SNPs were not associated with vitamin D deficiency.

Conclusion. – The rate of vitamin D deficiency was high in our T2D patients, and was associated with the *VDR* gene *FokI* and *ApaI* polymorphisms and cardiovascular risk profile. Measurements of vitamin D may help to detect T2D patients with cardiovascular risk, and *VDR* polymorphisms might explain why vitamin D deficiency is so frequently seen in some T2D patients.

© 2011 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Cardiovascular risk factors; Type 2 diabetes; Vitamin D deficiency; Vitamin D receptor gene polymorphisms

Résumé

Carence en vitamine D, polymorphismes du gène du récepteur de la vitamine D et facteurs de risque cardiovasculaire chez des diabétiques de type 2 aux Antilles.

La prévalence du diabète aux Antilles françaises est trois fois plus élevée qu'en France métropolitaine.

Objectif. – Évaluer l'association entre carence en vitamine D, polymorphismes du gène du récepteur de la vitamine D (*VDR*) et facteurs de risque cardiovasculaire chez des caribéens diabétiques de type 2 (DT2).

Méthodes. – Étude transversale chez 277 DT2 volontaires. Recueil des données cliniques et métaboliques. 25-hydroxyvitamine D dosée avec un Kit RIA. Quatre polymorphismes du gène *VDR* étudiés: *FokI*, *BsmI*, *ApaI*, *TaqI*. Analyse statistique: régression logistique et test Ancova.

[☆] This work was supported by the University Hospital of Guadeloupe.

* Corresponding author. Département d'Information Médicale et Santé Publique, CHU de Pointe-à-Pitre, 97159 Pointe-à-Pitre, Guadeloupe, French West Indies. Tel.: +590 590 89 15 34; fax: +590 590 89 15 95.

E-mail address: lfoucan@yahoo.fr (L. Foucan).

Résultats. – La prévalence de la carence vitaminique D (<20 ng/mL) était de 42,6 %. Chez les patients classés en deux groupes selon le statut carencé G1 ou non G2 en vitamine D, il n'était noté aucune différence significative selon l'âge, la pression artérielle systolique, le LDL-cholestérol, l'HbA_{1c}. L'IMC était significativement plus élevé dans le groupe G1. La carence vitaminique D était significativement associée à une pression artérielle diastolique et des triglycérides élevés, un HDL-cholestérol bas ($P < 0,05$). La prévalence de la carence en vitamine D était plus faible en présence de l'allèle f (SNP *FokI* OR 0,52 ; $P = 0,02$) et du génotype aa (SNP *ApaI* OR 0,46 ; $P = 0,05$). Il n'a pas été mis en évidence d'association significative entre le statut vitaminique D et les polymorphismes *BsmI* ou *TaqI* du gène *VDR*.

Conclusion. – La carence en vitamine D est fréquente chez les caribéens diabétiques de type 2, chez qui elle est associée à un profil à risque cardiovasculaire (diminution du HDLc, augmentation de l'IMC et des triglycérides). Le dosage systématique de la vitamine D permettrait de détecter les DT2 à risque cardiovasculaire élevé. L'étude des polymorphismes du gène *VDR* pourrait expliquer pourquoi cette carence est plus fréquente chez certains diabétiques.

© 2011 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Risque cardiovasculaire ; Diabète de type 2 ; Vitamine D ; Polymorphismes du gène du récepteur de la vitamine D ; Antilles françaises

1. Introduction

In the island of Guadeloupe (French West Indies), the overall prevalence of diabetes is high; it was estimated to be 8.1% in 2009 [1,2]. Type 2 diabetes (T2D), obesity and dark skin are associated with a high risk of vitamin D deficiency [3–8]. This deficiency is now considered a public-health matter because it has been associated with greater risks of other morbidities, such as cardiovascular disease and cancer [9,10]. Vitamin D is activated after binding to its specific cytosolic/nuclear receptor (VDR) [11]. The *VDR* gene is located on chromosome 12q12-q14 in humans [12], and four adjacent restriction fragment length polymorphisms for *BsmI*, *ApaI*, *FokI* and *TaqI* at the 3' end of *VDR* have been previously identified. Their associations with vitamin D levels and several diseases have also been investigated [13–16]. However, the prevalence of vitamin D deficiency and its relationship to *VDR* polymorphisms in Caribbean patients with T2D is not well known. The aim of the present study was to assess the prevalence of vitamin D deficiency in Caribbean T2D patients, and the associations between vitamin D deficiency, *VDR* polymorphisms and cardiovascular risk factors in such a population.

2. Patients and methods

Our cross-sectional study included 277 T2D patients with dark skin, and was conducted in the diabetes department of the University Hospital of Guadeloupe. Exclusion criteria included patients with a previous history of kidney or inflammatory disease, pregnant women and those taking vitamin D replacement therapy. The study was approved by the regional ethics committee. All patients gave their written informed consent to take part in this study of cardiovascular and metabolic risks.

2.1. Measurements

The patients were interviewed by physicians who followed a standard questionnaire. Height, weight and waist circumference (WC) were measured. Body mass index (BMI) was calculated as weight/height² (kg/m²), and obesity was defined

as a BMI ≥ 30 kg/m². Systolic blood pressure (SBP) and diastolic blood pressure (DBP) were estimated using automated sphygmomanometers. Blood samples were obtained from all participants after overnight fasting. Low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), triglyceride (TG) levels, fasting blood glucose (FBG) and glycated haemoglobin (HbA_{1c}) were evaluated. Plasma concentrations of 25-hydroxyvitamin D (25OHD) were measured using a direct radioimmunoassay (DiaSorin SA, Antony, France). Vitamin D deficiency was defined as plasma 25OHD levels less than 20 ng/mL. Participants were then classified into two groups according to whether they were vitamin-D-deficient (group G1) or not (group G2).

Genomic DNA was extracted from peripheral blood samples using a QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany). Four single nucleotide polymorphisms (SNPs) in exon 2 (*FokI*), exon 9 (*TaqI*) and intron 8 (*ApaI* and *BsmI*) of *VDR* were analyzed by a polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism (PCR–RFLP) method.

2.2. Statistical analysis

Data for categorical variables are presented as numbers (percentages) and data for continuous variables as means (standard deviations). Associations with cardiovascular risk factors (hypertension [SBP and DBP], BMI, WC, FBG, HDL-C and LDL-C, TG levels), demographic factors (age, gender, obesity) and allele frequencies of the four SNPs were estimated. Each polymorphism was tested for departures from the Hardy–Weinberg equilibrium using the chi-square test. Subjects were classified into groups G1 and G2 according to the presence and absence, respectively, of vitamin D deficiency (defined as 25OHD < 20 ng/mL). Statistical methods included the Chi² test and analysis of covariance (ANCOVA, adjusted for age, gender and BMI when indicated) for comparisons between groups. Adjusted logistic regressions were performed for all covariates that were significant ($P < 0.20$) in the univariate and multivariate analyses. SPSS version 18.0 statistical software (SPSS Inc, Chicago, IL) was used for the analyses.

Table 1
Vitamin D status of the whole study population.

	Vitamin D (25OHD) concentrations			Vitamin D deficiency and insufficiency			
	<i>n</i>	ng/mL (SD)	<i>P</i> *	<20 ng/mL (%)	<i>P</i>	<30 ng/mL (%)	<i>P</i>
<i>Ethnicity</i>							
African descent	201	21.70 (6.9)	0.87	42.8	0.99	89.1	0.13
Indian descent	77	21.10 (6.1)		42.1		92.1	
<i>Age</i>							
≥60 years	180	21.24 (6.8)	0.24	45.6	0.20	91.1	0.41
<60 years	97	22.24 (6.4)		37.1		87.6	
<i>Gender</i>							
Male	105	22.90 (7.5)	0.04	41.0	0.71	81.9	0.001
Female	172	20.79 (6.0)		43.6		94.8	
<i>Obesity</i>							
Yes	99	19.80 (6.0)	0.001	52.5	0.02	94.9	0.04
No	179	22.50 (6.8)		37.1		87.1	
<i>Dyslipidaemia</i>							
Yes	152	21.06 (6.5)	0.27	48.7	0.03	91.4	0.42
No	125	22.20 (6.9)		35.2		88.0	
<i>CV complications</i>							
Yes	107	20.00 (7.0)	0.001	48.6	0.13	91.6	0.54
No	170	22.50 (6.4)		38.8		88.8	

Data are expressed as means (SD) unless otherwise stated.

25OHD: 25-hydroxyvitamin D; CV: cardiovascular.

*P**: by ANCOVA adjusted for age, gender, body mass index, CV complications and ethnicity

3. Results

A total of 277 patients with T2D and a mean age of 64 ± 11 years were studied; 62.1% were women. Average BMI was 28.9 ± 5.6 kg/m² with a WC of 75.9 ± 13 cm. In this population, 76 patients (27.4%) were of South Indian (Indian) descent and 201 (72.6%) were of African (Afro-Caribbean) descent. Antidiabetic treatment was prescribed in 97.5% of these T2D patients, and the mean HbA_{1c} was $7.26 \pm 1.69\%$. The prevalence of preexisting cardiovascular disease (coronary disease, stroke, peripheral artery disease) in the study population was 31%, while the prevalence of vitamin D deficiency was 42.6% and, for vitamin D insufficiency (vitamin D levels <30 ng/mL), 89.9%. Taking the study population as a whole, 25OHD levels were inversely correlated with BMI ($r = -0.15$; $P = 0.01$). Considering only those who were obese (37.5%), 25OHD levels were significantly decreased (21.6 ng/mL) vs. 19.8 ng/mL in the rest of the sample population ($P = 0.001$), and vitamin D deficiency was recorded in 52.5%.

The vitamin D status of all patients according to their clinical characteristics is summarized in Table 1, and the clinical characteristics of groups G1 and G2 are compared in Table 2. BMI was higher in G1 than in G2 (29.8 vs. 28.3 kg/m², respectively; $P = 0.02$). There was no significant difference between the two groups in terms of gender, age, SBP, FBG, LDL-C or HbA_{1c}. Vitamin D deficiency was significantly associated with higher DBP and TG levels, and lower HDL-C levels ($P < 0.05$). The results of *VDR* genotyping were available for 270 patients. Carrying the aa genotype of the *ApaI* SNP or the f allele of the *FokI* SNP was significantly associated with a low risk of vitamin D deficiency (Table 3), whereas the *BsmI* and *TaqI* allelic variants were not significantly associated with vitamin D deficiency status.

25OHD levels differed depending on the *VDR* polymorphism: vitamin D levels were significantly lower in the presence of the bb genotype of the *BsmI* SNP compared with the BB or Bb genotypes (18.9 vs. 21.2 ng/L, respectively; $P = 0.02$). Also, the prevalence of vitamin D deficiency was significantly lower in patients with the aa genotype of the *ApaI* SNP compared with the AA/Aa genotypes (28% vs. 46%, respectively; $P = 0.02$) and in carriers of the f allele of the *FokI* SNP (Ff or ff genotype) compared with the FF genotype (33% vs. 49%, respectively; $P = 0.02$; Table 4).

In the univariate analysis, vitamin D deficiency was significantly associated with obesity (odds ratio [OR]: 1.88; $P = 0.01$), HDL-C (OR: 0.54; $P = 0.05$) and TG (OR: 1.48; $P = 0.02$). In the multivariate analysis, the variables introduced into the model were age, obesity, DBP, HDL-C, TG and *VDR* polymorphisms. The adjusted ORs for vitamin D deficiency were significant for obesity (OR: 2.31; $P = 0.004$), TG (OR: 1.44; $P = 0.05$), and carrying the f allele of the *FokI* SNP (OR: 0.52; $P = 0.02$) or the aa genotype of the *ApaI* SNP (OR: 0.46; $P = 0.05$; Table 3).

4. Discussion

Vitamin D insufficiency, defined as vitamin D levels less than 30 ng/mL (75 nmol/L), leads to increases in parathormone levels, and in bone disease and fractures. Cardiovascular risks appear to be associated with vitamin D levels less than 20 ng/mL, defined as vitamin D deficiency [17,18]. To assess cardiovascular risk in our T2D patients, we analyzed the groups with vitamin D levels greater to and less than 20 ng/mL. To our knowledge, this is the first such study to analyse the prevalence of vitamin D deficiency in Caribbean subjects with T2D, as well as the distribution of *VDR* polymorphisms in relation to vitamin D deficiency and cardiovascular risk factors. The results of the

Table 2
Characteristics of the study patients according to vitamin D deficiency status.

Characteristics	Vitamin D deficiency (<20 ng/mL)		P
	Yes = 118 patients	No = 159 patients	
Gender (female)	64%	61%	0.71
Age (years)	65.4 (13.0)	62.9 (10.0)	0.09
BMI (kg/m ²)	29.8 (6.5)	28.3 (4.8)	0.02
SBP (mmHg)	133 (16.0)	130 (15.0)	0.18
DBP (mmHg)	76 (11.0)	74 (9.0)	0.04
HDL-C (mmol/L)	1.3 (0.3)	1.4 (0.5)	0.03
LDL-C (mmol/L)	2.7 (0.9)	2.6 (0.8)	0.38
TG (mmol/L)	1.4 (1.1)	1.1 (0.5)	0.04
HbA _{1c} (%)	7.4 (1.8)	7.1 (1.6)	0.16
FBG (mmol/L)	7.6 (3.0)	7.2 (2.5)	0.22
Vitamin D levels (ng/mL)	15.7 (3.5)	25.9 (4.9)	0.001
<i>FokI</i> rare allele (ff/Ff vs FF)	34%	49%	0.02
<i>BsmI</i> bb genotype	14%	8%	0.11
<i>TaqI</i> rare allele (tt/Tt vs TT)	43%	49%	0.32
<i>ApaI</i> aa genotype	11%	22%	0.02

Data are expressed as means (SD) unless otherwise stated.

BMI: body mass index; SBP: systolic blood pressure; DBP: diastolic blood pressure; HDL-C: high-density lipoprotein cholesterol; LDL-C: low-density lipoprotein cholesterol; TG: triglyceride; FBG: fasting blood glucose

present study are of interest because they highlight, for the first time, a high prevalence of vitamin D deficiency (42.6%) in a diabetic population living in a sunny climate. In a control group of 280 subjects, vitamin D deficiency was estimated at 6.8% and vitamin D insufficiency at 54.6% (unpublished data). These values are lower than those in our present diabetic population, suggesting that diabetic patients are at greater risk of vitamin D deficiency.

The risk factors for vitamin D deficiency include extreme age, female gender, dark skin pigmentation, winter season, malnutrition, lack of sun exposure, a covered-up style of clothing and obesity [7]. The patients in the present study all had high levels of skin pigmentation. The melanin pigment in human skin competes for and absorbs the ultraviolet B photons responsible for the photolysis of 7-dehydrocholesterol to previtamin D₃. Studies have reported lower mean 25OHD levels in Africans than

in other ethnic groups [16]. Indeed, a previous study showed that, compared with white Americans, healthy Afro-Americans at most latitudes in North America fail to achieve optimal 25OHD concentrations at any time of year [19]. Furthermore, data from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) III showed that 53–76% of non-Hispanic blacks in the United States had vitamin D levels less than 50 nmol/L compared with only 8–33% of non-Hispanic whites [20]. In our present study, there was no light-skinned control group because, although the prevalence of T2D is high in Afro-Caribbeans living in Guadeloupe and other Caribbean islands [21], the prevalence of T2D in the Caucasian population of Guadeloupe is very low.

As in previous studies in non-diabetic subjects, lower levels of 25OHD and a greater frequency of vitamin D deficiency were noted in obese compared with non-obese subjects [21,22]. In fact, a high prevalence of obesity was previously found in the

Table 3
Distribution of 25-hydroxyvitamin D (25OHD) and of vitamin D deficiency according to *VDR* polymorphisms.

<i>ApaI</i> (n = 272)	AA (n = 83)	Aa (n = 142)	aa (n = 47)	P	AA/Aa (n = 225)	aa (n = 47)	P
25OHD (ng/L)	21.2 (5.7)	21.3 (7.4)	23.1 (6.2)	0.22	21.2 (6.8)	23.1 (6.2)	0.08
Vitamin D deficiency	45%	47%	28%	0.06	46%	28%	0.02
<i>BsmI</i> (n = 270)	BB (n = 123)	Bb (n = 118)	bb (n = 29)		BB/Bb (n = 241)	bb (n = 29)	
25OHD (ng/L)	21.4 (6.4)	22.2 (6.9)	18.9 (6.6)	0.05	21.2 (6.7)	18.9 (6.6)	0.02
Vitamin D deficiency	42%	42%	59%	0.23	42%	59%	0.11
<i>FokI</i> (n = 270)	FF (n = 156)	Ff (n = 95)	ff (n = 19)		FF (n = 156)	Ff/ff (n = 114)	
25OHD (ng/L)	21.3 (7.0)	21.6 (6.1)	22.5 (7.0)	0.74	21.3 (7.0)	21.8 (6.2)	0.60
Vitamin D deficiency	49%	35%	32%	0.04	49%	33%	0.02
<i>TaqI</i> (n = 262)	TT (n = 140)	Tt (n = 103)	tt (n = 19)		TT (n = 140)	Tt/tt (n = 122)	
25OHD (ng/L)	20.9 (6.2)	22.0 (6.9)	21.1 (7.2)	0.48	22.0 (6.9)	21.9 (6.2)	0.23
Vitamin D deficiency	46%	39%	42%	0.58	46%	40%	0.32

Data are expressed as means (SD) unless otherwise stated, and are derived by ANCOVA, adjusted for age, body mass index and gender.

Table 4
Logistic regression of vitamin D deficiency, cardiovascular risk factors and *VDR* polymorphisms.

Covariates	Univariate analysis (n = 277)		Multivariate analysis (n = 270)	
	Adjusted OR	P	Adjusted OR	P
Gender (female)	1.11 (0.68–1.82)	0.66	–	
10-year increase in age	1.14 (0.93–1.42)	0.19	1.25 (0.98–1.59)	0.07
Ethnicity	0.97 (0.57–1.66)	0.92	–	
Obesity	1.88 (1.14–3.10)	0.01	2.31 (1.31–4.05)	0.004
SBP (mmHg)	1.01 (0.99–1.02)	0.11	1.01 (0.98–1.03)	0.59
DBP (mmHg)	1.02 (0.99–1.04)	0.06	1.03 (0.99–1.06)	0.14
HDL-C (mmol/L)	0.54 (0.29–1.01)	0.05	0.64 (0.31–1.31)	0.22
LDL-C (mmol/L)	1.12 (0.84–1.49)	0.44	–	
TG (mmol/L)	1.48 (1.06–2.08)	0.02	1.44 (1.08–2.09)	0.05
HbA _{1c} (%)	1.10 (0.95–1.28)	0.21	–	
FBG (mmol/L)	1.06 (0.97–1.16)	0.21	–	
CV complications	1.49 (0.91–2.43)	0.11	–	
<i>FokI</i> rare allele (ff/Ff vs FF)	0.53 (0.32–0.88)	0.01	0.52 (0.30–0.90)	0.02
<i>BsmI</i> bb genotype	1.96 (0.90–4.29)	0.09	1.65 (0.68–3.96)	0.26
<i>TaqI</i> rare allele (tt/Tt vs TT)	0.77 (0.47–1.27)	0.31	–	
<i>ApaI</i> aa genotype	0.45 (0.22–0.89)	0.02	0.46 (0.21–0.99)	0.05

Data are expressed as means (SD) and percentages.

OR: odds ratio; SBP: systolic blood pressure; DBP: diastolic blood pressure; HDL-C: high-density lipoprotein cholesterol; LDL-C: low-density lipoprotein cholesterol; TG: triglyceride; FBG: fasting blood glucose; CV: cardiovascular.

Caribbean population [23]. In our island, the increased adoption of Westernized lifestyles and diets, along with reduced energy expenditure such as physical activity, are contributing to obesity that, in turn, raises the risk of T2D.

The bioavailability of vitamin D in obesity is decreased because of its storage in adipose tissue [24]. Obesity is also associated with cardiovascular risk factors. In our present study population, the prevalence of obesity was 37.5%, which might explain why vitamin D deficiency was so common. Vitamin D has also been suggested to be an important mediator of cardiovascular disease [25–27]. A recent multinational, placebo-controlled, double-blind trial showed that paricalcitol, a selective activator of VDR, lowers albuminuria in patients with T2D nephropathy, a population with a high risk of cardiovascular disease. These results suggest the potential role of vitamin D deficiency in both renal and progressive vascular disease [28].

Low vitamin D levels can be associated with hypertension, atherosclerosis and diabetes, and may predispose to cardiovascular diseases with an increased risk of mortality [29]. According to our present results, vitamin D deficiency is indeed associated with a clinical profile of cardiovascular risk. However, no records of lifestyle factors (smoking habits, physical activity and alcohol consumption) were taken to allow confirmation of such a finding. Moreover, there was an inverse association between vitamin D levels and DBP. A previous study had reported that vitamin D replacement could improve DBP [29]. Our T2D patients with vitamin D deficiency had lower HDL-C and higher TG levels than those with normal 25OHD levels. However, unlike our findings, no association was found between lipid profiles and vitamin D levels in Iranians; thus, discrepancies are still found in the relationship between lipid profiles and vitamin D deficiency status [30,31].

Vitamin D is activated after binding to VDR. Recently, a genome-wide association study showed that *VDR* polymorphisms could contribute to the variability of 25OHD levels, but this did not appear to be linked to skin pigmentation [32]. The gene encoding for VDR is located on the 12q12-q14. A direct effect of vitamin D on adipocyte differentiation and metabolism is a possible mechanism for such an effect, as VDR is expressed in preadipocytes [33]. It has also been suggested that the underlying mechanism of the relationship between vitamin deficiency and chronic disease is the presence of VDR in several tissues and cells, including pancreatic beta cells and adipocytes [33,34]. In addition, an association between *VDR* polymorphisms and body weight and insulin secretion has also been reported [6,13]. In our present study population, the genotypes at *FokI* and *ApaI* SNPs of *VDR* were associated with vitamin D deficiency. Also noted were significant relationships between 25OHD levels and allelic variants of *FokI* and *BsmI* SNPs. Carrying the f allele of the *FokI* SNP or the aa genotype of the *ApaI* SNP might be protective against vitamin D deficiency: an earlier study found that they can affect circulating levels of vitamin D [35] and may also influence cardiovascular risk.

One limitation of our present investigation is that the study was cross-sectional and, therefore, cannot determine whether the decrease in 25OHD preceded the occurrence of cardiovascular risk factors. Nevertheless, our study has important clinical implications by highlighting the high frequency of vitamin D deficiency in Afro-Caribbean patients with T2D, despite sun exposure, that is further increased in obese T2D patients. Thus, preventing, screening for and treating vitamin D deficiency and its health consequences need to be a priority in such a population.

In conclusion, *VDR* allelic variations and certain cardiovascular risk factors are associated with vitamin D deficiency in our Afro-Caribbean T2D patients. However, the mecha-

nisms through which these relationships arise require further investigation.

Disclosure of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest concerning this article.

Acknowledgements

We are very grateful to Mrs Netty Alice and to the physicians who participated in our investigation. We thank Dr Giberto Velho and Dr Nadir Cheurfa for useful discussions on VDR genotyping.

References

- [1] Institut de Veille Sanitaire, Bulletin épidémiologique hebdomadaire (9 novembre 2010/n° 42–43), p. 425–31.
- [2] Costagliola D, Delaunay C, Moutet JP, Kankambega P, Demeulemeester R, Donnet JP, et al. The prevalence of diabetes mellitus in the adult population of Guadeloupe as estimated by history or fasting hyperglycemia. *Diabetes Res Clin Pract* 1991;12:209–16.
- [3] Hey H, Stokholm KH, Lund B, Lund B, Sorensen OH. Vitamin D deficiency in obese patients and changes in circulating vitamin D metabolites following jejunoileal bypass. *Int J Obes* 1982;6:473–9.
- [4] Bell NH, Epstein S, Greene A, Shary J, Oexmann MJ, Shaw S. Evidence for alteration of the vitamin D-endocrine system in obese subjects. *J Clin Invest* 1985;76:370–3.
- [5] Parikh SJ, Edelman M, Uwaifo GI, Freedman RJ, Semega-Janneh M, Reynolds J, et al. The relationship between obesity and serum 1,25-dihydroxy vitamin D concentrations in healthy adults. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:1196–9.
- [6] Reis AF, Hauache OM, Velho G. Vitamin D endocrine system and the genetic susceptibility to diabetes, obesity and vascular disease. A review of evidence. *Diabetes Metab* 2005;31:318–25.
- [7] Takiishi T, Gysemans C, Bouillon R, Mathieu C. Vitamin D and diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2010;39:419–46.
- [8] Arabi A, El Rassi R, El-Hajj Fuleihan G. Hypovitaminosis D in developing countries—prevalence, risk factors and outcomes. *Nat Rev Endocrinol* 2010;6:550–61.
- [9] Garland CF, Comstock GW, Garland FC, Helsing KJ, Shaw EK, Gorham ED. Serum 25-hydroxyvitamin D and colon cancer: eight-year prospective study. *Lancet* 1989;2:1176–8.
- [10] Pilz S, Marz W, Wellnitz B, Seelhorst U, Fahrleitner-Pammer A, Dimai HP, et al. Association of vitamin D deficiency with heart failure and sudden cardiac death in a large cross-sectional study of patients referred for coronary angiography. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:3927–35.
- [11] Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 1995;83:835–9.
- [12] Szpirer J, Szpirer C, Riviere M, Levan G, Marynen P, Cassiman JJ, et al. The Sp1 transcription factor gene (SP1) and the 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor gene (VDR) are colocalized on human chromosome arm 12q and rat chromosome 7. *Genomics* 1991;11:168–73.
- [13] Hitman GA, Mannan N, McDermott MF, Aganna E, Ogunkolade BW, Hales CN, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms influence insulin secretion in Bangladeshi Asians. *Diabetes* 1998;47:688–90.
- [14] Van Schooten FJ, Hirvonen A, Maas LM, De Mol BA, Kleinjans JC, Bell DA, et al. Putative susceptibility markers of coronary artery disease: association between VDR genotype, smoking, and aromatic DNA adduct levels in human right atrial tissue. *FASEB J* 1998;12(13):1409–17.
- [15] McDermott MF, Ramachandran A, Ogunkolade BW, Aganna E, Curtis D, Boucher BJ, et al. Allelic variation in the vitamin D receptor influences susceptibility to IDDM in Indian Asians. *Diabetologia* 1997;40(8):971–5.
- [16] Pani MA, Knapp M, Donner H, Braun J, Baur MP, Usadel KH, et al. Vitamin D receptor allele combinations influence genetic susceptibility to type 1 diabetes in Germans. *Diabetes* 2000;49:504–7.
- [17] Forman JP, Giovannucci E, Holmes MD, Bischoff-Ferrari HA, Tworoger SS, Willett WC, et al. Plasma 25-hydroxyvitamin D concentrations and risk of incident hypertension. *Hypertension* 2007;49:1063–9.
- [18] Wang TJ, Pencina MJ, Booth SL, Jacques PF, Ingelsson E, Lanier K, et al. Vitamin D deficiency and risk of cardiovascular disease. *Circulation* 2008;117:503–11.
- [19] Brazerol WF, McPhee AJ, Mimouni F, Specker BL, Tsang RC. Serial ultraviolet B exposure and serum 25 hydroxyvitamin D response in young adult American blacks and whites: no racial differences. *J Am Coll Nutr* 1988;7:111–8.
- [20] Looker AC, Dawson-Hughes B, Calvo MS, Gunter EW, Sahyoun NR. Serum 25-hydroxyvitamin D status of adolescents and adults in two seasonal subpopulations from NHANES III. *Bone* 2002;30:771–4.
- [21] Ferguson TS, Tulloch-Reid MK, Wilks RJ. The epidemiology of diabetes mellitus in Jamaica and the Caribbean: a historical review. *West Indian Med J* 2010;59(3):259–64.
- [22] Winters SJ, Chennubhatla R, Wang C, Miller JJ. Influence of obesity on vitamin D-binding protein and 25-hydroxy vitamin D levels in African American and white women. *Metabolism* 2009;58:438–42.
- [23] Liel Y, Ulmer E, Shary J, Hollis BW, Bell NH. Low circulating vitamin D in obesity. *Calcif Tissue Int* 1988;43:199–201.
- [24] Foucan L, Hanley J, Deloumeaux J, Suissa S. Body mass index (BMI) and waist circumference (WC) as screening tools for cardiovascular risk factors in Guadeloupean women. *J Clin Epidemiol* 2002;55:990–6.
- [25] Wortsman J, Matsuoka LY, Chen TC, Lu Z, Holick MF. Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. *Am J Clin Nutr* 2000;72:690–3.
- [26] Meems LM, van der Harst P, van Gilst WH, de Boer RA. Vitamin D biology in heart failure: molecular mechanisms and systematic review. *Curr Drug Targets* 2010;12:29–41.
- [27] Dobnig H, Pilz S, Scharnagl H, Renner W, Seelhorst U, Wellnitz B, et al. Independent association of low serum 25-hydroxyvitamin d and 1,25-dihydroxyvitamin d levels with all-cause and cardiovascular mortality. *Arch Intern Med* 2008;168:1340–9.
- [28] de Zeeuw D, Agarwal R, Amdahl M, Audhya P, Coyne D, Garimella T, et al. Selective vitamin D receptor activation with paricalcitol for reduction of albuminuria in patients with type 2 diabetes (VITAL study): a randomised controlled trial. *Lancet* 2010;376:1543–51.
- [29] Witham MD, Nadir MA, Struthers AD. Effect of vitamin D on blood pressure: a systematic review and meta-analysis. *J Hypertens* 2009;27:1948–54.
- [30] John WG, Noonan K, Mannan N, Boucher BJ. Hypovitaminosis D. is associated with reductions in serum apolipoprotein A-I but not with fasting lipids in British Bangladeshis. *Am J Clin Nutr* 2005;82:517–22.
- [31] Bonakdaran S, Varasteh AR. Correlation between serum 25 hydroxy vitamin D3 and laboratory risk markers of cardiovascular diseases in type 2 diabetic patients. *Saudi Med J* 2009;30:509–14.
- [32] Wang TJ, Zhang F, Richards JB, Kestenbaum B, van Meurs JB, Berry D, et al. Common genetic determinants of vitamin D insufficiency: a genome-wide association study. *Lancet* 2010;376:180–8.
- [33] Shi H, Norman AW, Okamura WH, Sen A, Zemel MB. 1alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 modulates human adipocyte metabolism via nongenomic action. *FASEB J* 2001;15:2751–3.
- [34] Schuch NJ, Garcia VC, Martini LA. Vitamin D and endocrine diseases. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2009;53:625–33.
- [35] Howard G, Nguyen T, Morrison N, Watanabe T, Sambrook P, Eisman J, et al. Genetic influences on bone density: physiological correlates of vitamin D receptor gene alleles in premenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:2800–5.

Les concentrations de la vitamine D ne varient pas seulement en fonction des polymorphismes du *VDR*. Des SNPs de gènes codant pour les protéines GC, CYP27B1 et NADSYN1 impliquées dans le métabolisme de la vitamine D sont aussi associés au statut vitaminique D des populations.

Nos travaux antérieurs chez le diabétique, nous ont permis de mettre en évidence une prévalence élevée du déficit en vitamine D chez les sujets Afro-Caribéens, son association à certains facteurs de risque cardiovasculaire et certains polymorphismes du *VDR* (399). Du fait d'une prévalence élevée de l'obésité et du surpoids en Guadeloupe, nous avons émis l'hypothèse que chez des sujets non diabétiques, par conséquent avec un déficit en vitamine D moins important que chez le diabétique, le profil métabolique pourrait être associé aux polymorphismes des gènes codant le transporteur de la vitamine D (*GC*), le CYP27B1 et la NADSYN1 impliqués dans le métabolisme de la vitamine D.

Les polymorphismes récemment décrits dans les populations Afro-Américaines et associés aux concentrations de la vitamine D (rs10877012 pour *CYP27B1*, rs2282679 et rs2298849 pour *GC* et rs12785878 pour *NADSYN1*) ont été retenus pour ce travail. L'analyse de ces polymorphismes a fait l'objet de l'étude présentée ci-dessous.

III.3. Associations entre les polymorphismes des gènes *GC* et *NADSYN1*, le surpoids, la dyslipidémie et le statut vitaminique D chez des sujets Afro-Caribéens non diabétiques

Nous avons mené une étude transversale chez 323 sujets non diabétiques, en bonne santé apparente, d'origine Afro-Caribéenne, recrutés au centre d'Examens de Santé de Guadeloupe. Ce centre réalise des bilans de santé systématiques (clinique, biologiques, para-cliniques) pour les individus volontaires ou d'autres, adressés au centre par la Caisse Générale de la Sécurité Sociale de Guadeloupe.

Cette étude a été financée par le CHU de Pointe-à-Pitre dans le cadre de l'Appel Local à financement des projets de recherche pour 2010.

L'objectif de ce travail était d'analyser les relations entre les concentrations de la 25(OH)D, les polymorphismes génétiques de *CYP27B1*, *GC* et *NADSYN1* et le profil métabolique de ces sujets non diabétiques.

Les paramètres cliniques (notamment anthropométriques), métaboliques (profil glycémique et dyslipidémique) et les concentrations de 25(OH)D ont été colligés. Tous les sujets avaient signé un consentement éclairé pour leur participation à l'étude. La majorité des sujets était de sexe féminin (58%). Une hypertension et une dyslipidémie étaient constatées respectivement chez 42 et 58% des sujets, une obésité ou un surpoids chez 29 et 61% des sujets respectivement.

Chez ces sujets témoins, le déficit en vitamine D et l'insuffisance en vitamine D étaient retrouvés respectivement chez 8% et 57% des individus.

Le génotypage a été réalisé pour les polymorphismes des 3 gènes cités précédemment. L'équilibre de Hardy Weinberg n'étant pas obtenu pour la distribution du génotype *CYP27B1*, l'étude d'association pour les polymorphismes de ce gène n'a pas été poursuivie.

Les résultats de la régression linéaire pour les concentrations de vitamine D sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Régressions linéaires: associations entre les allèles mineurs de rs2282679, rs2298849, rs12785878 et les concentrations en vitamine D :

	Régression linéaire univariée				Régression linéaire** multivariée			
	Beta	SE	p	R ²	Beta	SE	p	R ²
Modèle a rs2282679 (GG - TG) vs TT	-2,5	1,2	0,04	0,01	-2,6	1,2	0,03	0,06
Modèle b rs2298849 (CC - TC) vs TT	-0,7	0,9	0,43	0,002	—	—	—	—
Modèle c rs12785878 (TT - GT) vs GG	2,2	0,9	0,01	0,02	2,1	0,8	0,02	0,06

Modèle a, b, c: pour chaque SNP de manière isolée.

Régression : *sans ajustement ** avec ajustement pour l'âge, le sexe, l'IMC.

Avec les modèles a, b, c, les résultats de la régression linéaire sont présentés pour chaque SNP considéré de manière isolée dans une analyse univariée puis une analyse multivariée (après ajustement pour l'âge, le sexe et l'IMC).

Ces modèles contribuaient respectivement pour 1% ($R^2 = 0,01$) et 2% ($R^2 = 0,02$), à la variation des concentrations de la 25(OH) D.

La variation de la concentration en 25(OH) D était en moyenne de -2,5 ng / mL en présence de l'allèle mineur de rs2282679, $p = 0,04$ (modèle a). Pour les porteurs de l'allèle mineur rs12785878, la variation de la 25(OH) D était de 2,19 ng / ml, $p = 0,01$ (modèle c).

Avec la régression linéaire multiple, après ajustement pour l'âge, le sexe, l'IMC, les associations de la 25(OH) D avec ces allèles mineurs restaient significatives (avec R^2 pour la régression multiple de 0,06 pour les deux modèles a et c).

Nous avons aussi examiné les associations entre les SNPs et les trois variables dépendantes suivantes : insuffisance en vitamine D (25(OH)D <30 ng / mL), dyslipidémie et surpoids.

Avec la régression logistique multivariée, trois modèles ont été testés, considérant séparément chaque SNP avec un ajustement pour l'âge, le sexe, l'IMC, la 25(OH)D, ou la dyslipidémie, en fonction de la variable dépendante.

Les OR ajustés d'insuffisance en vitamine D, de dyslipidémie et du surpoids sont présentés dans le tableau ci-dessous pour les trois SNPs.

Régressions logistiques de l'insuffisance en vitamine D, de la dyslipidémie et du surpoids :

	Insuffisance en Vitamine D		Dyslipidémie		Surpoids	
	OR (IC 95%)	<i>p</i>	OR (IC 95%)	<i>p</i>	OR (IC 95%)	<i>p</i>
Modèle 1 rs2282679 (GG - TG) vs TT	2,34 (1,15-4,90)	0,02	0,41 (0,21-0,84)	0,01	1,60 (0,70-3,36)	0,20
Modèle 2 rs2298849 (CC - TC) vs TT	1,22 (0,76-1,98)	0,24	1,49 (0,89-2,47)	0,12	0,57 (0,33-0,96)	0,03
Modèle 3 rs12785878 (TT - GT) vs GG	0,56 (0,35-0,89)	0,01	0,57 (0,34-0,94)	0,03	0,99 (0,60-1,62)	0,96

Pour rs2282679, les porteurs de l'allèle mineur (GG / TG) avaient un risque d'insuffisance en vitamine D multiplié par 2,34 et un risque réduit de dyslipidémie (OR 0,41). A l'inverse, les OR ajustés d'insuffisance en vitamine D et de dyslipidémie étaient tous deux significativement réduits pour les porteurs de l'allèle mineur rs12785878 (TT / GT). Le risque de surpoids était diminué pour les porteurs de l'allèle mineur de rs2298849 (CC / TC), (OR ajusté = 0,57, *p* = 0,03).

Par ailleurs, une plus faible fréquence du surpoids était notée chez les femmes porteuses du génotype CC de rs2298849 par rapport aux porteuses des génotypes TT / TC (50% vs 79%; *p* =

0,035). Chez les hommes aucune relation n'était retrouvée entre l'obésité ou le surpoids et les trois SNPs. Cette différence d'association observée entre les hommes et les femmes suggèrent l'existence de disparités dans l'effet des SNP qui pourraient être liées aux hormones féminines (telles que les œstrogènes) ou aux hormones masculines (comme la testostérone). Une interaction de la SHBG est aussi possible. Cette hormone se lie aux hormones sexuelles (principalement la testostérone) et les transporte dans la circulation. Sa variation pourrait jouer un rôle dans les associations entre différents facteurs génétiques et métaboliques.

Cette étude est la première à analyser de manière concomitante, les associations entre les polymorphismes des gènes codant le transporteur de la vitamine D (GC) et la NADSYN1, et les trois paramètres métaboliques (obésité, dyslipidémie et statut en vitamine D). Chez les sujets non diabétiques, nous avons mis en évidence une association entre polymorphismes *GC* et *NADSYN1* avec le statut vitaminique D mais aussi avec la dyslipidémie et le surpoids. Ces résultats corroborent, pour le statut en vitamine D, ceux d'autres études conduites dans des populations Européennes et Américaines et apportent des informations supplémentaires pour une population spécifique, la population Afro-Caribéenne.

Ce travail a fait l'objet d'un article original intitulé: « Relation between Polymorphisms in GC and NADSYN1 Genes and Overweight, Dyslipidemia, and Vitamin D Status in Non diabetics »
Cet article a été soumis à la revue « Obesity ».

Relation between polymorphisms in *GC* and *NADSYN1* genes and overweight, dyslipidemia, and vitamin D Status in non-diabetics.

Running Head: *GC* and *NADSYN1* genes in non-diabetic individuals.

L Foucan^{1,2}, F-L Vélayoudom-Céphise^{1,3}, L Larifla¹, C Armand¹, J Deloumeaux¹, C Fagour¹, J Plumasseau⁴, M-L Portlis⁵, L Liu⁶, F Bonnet⁷, J Ducros⁸.

1. Research group Clinical Epidemiology and Medicine. University of Antilles and Guyane, France.
2. Department of Public Health and Medical Information, University Hospital of Pointe-à-Pitre, Guadeloupe, France
3. Diabetology Unit, University Hospital of Pointe-à-Pitre, Guadeloupe, France
4. Health Centre, AGREXAM. Les Abymes, Guadeloupe, France
5. Clinical Genetic Unit, University Hospital of Pointe-à-Pitre, Guadeloupe, France
6. Department of Epidemiology and Biostatistics, Drexel University School of Public Health, Philadelphia, PA, USA
7. Unit of Endocrinology-Diabetology and nutrition, University Hospital South of Rennes, France.
8. Nephrology Unit, University Hospital of Pointe-à-Pitre, Guadeloupe, France

Correspondence: Dr Lydia Foucan, Département de Santé Publique. CHU de Pointe-à-Pitre. 97159 Pointe-à-Pitre Guadeloupe. France.

Tel: (590) 590 89 15 34. Fax: (590) 590 89 15 95.

e-mail: lfoucan@yahoo.fr, lydia.foucan@chu-guadeloupe.fr

Conflict of interest statement: The authors declare no conflict of interest.

Abstract

Our aim was to assess the associations between overweight, dyslipidemia, vitamin D status and polymorphisms in genes involved in the transport (*Group-Component: GC*) and the hydroxylation (*NADsynthetase 1: NADSYN1*) of 25 hydroxyvitamin D, in non-diabetic Afro Caribbean individuals.

We conducted a cross-sectional study with 323 individuals recruited from a health center. The rs2282679 and rs2298849 in *GC* and rs12785878 in *NADSYN1* were genotyped. Logistic regressions were used to analyze data.

Overall, 57% of participants had vitamin D (vitD) insufficiency (<30 ng/mL), 29% were obese, 61% had overweight and 58% had dyslipidemia. A lower frequency of overweight was noted in women carrying the rs2298849 CC genotype compared with those carrying TT/TC genotypes (50% vs 79%; $P = 0.035$). In cases without dyslipidemia, higher frequencies of obesity were observed for rs2282679 (GG/TG) carriers (33% vs 13%; $P = 0.01$) and rs2298849 (CC/TC) carriers (26% vs 11%; $P = 0.02$) compared with the remaining individuals.

Carrying the rs2282679 (GG/TG) minor allele increased the odds of vitD insufficiency and decreased the odds of dyslipidemia (adjusted OR 2.34, $P = 0.02$; and 0.41, $P = 0.01$, respectively), whereas the OR of both metabolic abnormalities was decreased in rs12785878 (TT/GT) minor allele carriers (adjusted OR 0.56, $P = 0.01$; and 0.57, $P = 0.03$, respectively). The adjusted odds ratio of being overweight for rs2298849 (CC/TC) minor allele carriers was 0.57 ($P = 0.03$).

Our results confirm the association of the *GC* and *NADSYN1* genes with vitamin D status and suggest that these genes contribute to dyslipidemia and overweight.

Keywords Dyslipidemia, Overweight, Vitamin D, Genetic susceptibility, NAD Synthetase 1, Group component, Ethnicity.

INTRODUCTION

The storage form of vitamin D, 25-hydroxyvitamin D (25(OH)D), in blood circulation is a marker of vitamin D status. Low 25(OH)D has been associated with increased risk of cardiometabolic diseases, including obesity (1), dyslipidemia (2), type 2 diabetes (3), and cardiovascular complications (2, 4). However, genetic factors may also have effects on these diseases. In particular, single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes of the vitamin D pathway that are involved in the transport or the hydroxylation of 25(OH)D may be associated with the cardiometabolic risk.

25(OH)D is transported in the circulation, mainly bound to its specific vitamin D-binding protein, also named the GC-group component (GC). Polymorphisms in the *GC* gene were previously reported to be associated with plasma glucose levels (5), fasting plasma insulin levels (6), and the percentage of fat mass in Caucasian nuclear families (7).

In previous studies of 25(OH)D, variants of genes involved in vitamin D transport (*GC*), hydroxylation/dehydroxylation (*CYP2R1* and *CYP24A1*), and *NADSYN1* were reported to modulate vitamin D status (8-10). The *NADSYN1* gene encodes NAD synthetase 1 (NADSYN1), which is one of the glutamine-dependent enzymes involved in cholesterol synthesis and favors the production of Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NAD⁺), the main coenzyme required for energy production and lipid synthesis (11). Nevertheless, studies of the association between obesity or dyslipidemia and polymorphisms in these genes are scarce. Genome-wide association (GWA) studies using vitamin D levels have been performed mainly in European populations and few studies have been performed in individuals of African ancestry (10, 12, 13).

A recent study performed in an African-American cohort found associations between SNPs in the *GC* and *CYP27B1* genes and 25(OH)D with a significant relation with the degree of African ancestry as assessed using skin color gradation (13).

In the French Caribbean island of Guadeloupe, which has 400,000 inhabitants, about 80% of the population is of African descent and these individuals are at risk of vitamin D insufficiency and obesity (14, 15).

Our aim was to assess the associations between obesity-related traits, dyslipidemia, and vitamin D status and four SNPs of the *GC*, *CYP27B1*, and *NADSYN1* genes in nondiabetic Afro-Caribbean individuals.

METHODS AND PROCEDURES

Study population

The participants were recruited among individuals who had a clinical and biological examination at the referring Health Center of Guadeloupe (AGREXAM). Data were collected during 2010 and 2011. For the assessment of vitamin D status, the physician included volunteers during sessions that were randomly planned. The determination of ethnic origin was based on self-report. Exclusion criteria included a history of kidney disease, diabetes or inflammatory disease, pregnancy, calcium or vitamin D replacement therapy. The study was approved by the regional ethics committee. All patients gave their written informed consent to participate in this study.

Data collection

Participants were interviewed by a physician using a standard questionnaire that provided information on age, sex, and use of antihypertensive and/or antihyperlipidemic treatments.

Height and weight were measured with participants standing without shoes and lightly clothed. Body mass index (BMI) was calculated as weight/height (kg/m^2). Waist circumference (cm) was measured above the iliac crests and below the lowest rib margin at minimal respiration with participants standing. The measurements were performed by trained nurses. Systolic and diastolic blood pressure (SBP and DBP, respectively) were assessed using automated monitors

after resting for at least 5 min. The retained values were the average of two readings (left and right arms).

Blood samples were obtained after an overnight fast. The biochemical analyses were performed using the same methods for the whole study sample. Glycemia was assessed using the glucose oxidase method. Cholesterol, high-density lipoprotein/cholesterol, and triglyceride levels were measured enzymatically. Plasma concentrations of 25(OH)D were measured via a chemiluminescence assay (DiaSorin SA, Antony, France), which includes 25(OH)D₂ and 25(OH)D₃. In this health center, only single measurements were available for all the parameters.

Genotyping

Genotyping was performed in 323 Afro-Caribbean individuals for SNPs that were reported to be associated with vitamin D status in individuals of European (10) or in African-Americans (13) descent: rs2282679 (intron 12) in *GC*, rs2298849 (intron 1) in *GC*, rs10877012 (5' UTR) in *CYP27B1*, and rs12785878 (intronic region of NM_018161.4) in *NADSYN1*. SNPs were genotyped by KBioscience Ltd using their own novel fluorescence-based competitive allele-specific PCR (KASPar) assay. Details of the method used can be found at www.kbioscience.co.uk/.

Definition of clinical factors

Obesity was defined as a BMI ≥ 30 kg/m² and overweight as a BMI ≥ 25 kg/m². Abdominal obesity was defined as a waist circumference > 102 cm in men or > 88 cm in women.

Hypertension was defined as SBP ≥ 140 or DBP > 90 mmHg or the current use of antihypertensive medication.

Vitamin D insufficiency was defined as a 25(OH)D level < 30 ng/mL and vitamin D deficiency as a 25(OH)D level < 20 ng/mL.

Dyslipidemia was defined as having one of the following measurements: high-density lipoprotein/cholesterol concentration < 40 mg/dL in men and < 50 mg/dL in women, triglyceride concentration \geq 150 mg/dL, low-density lipoprotein/cholesterol concentration \geq 130 mg/L, or the presence of a lipid-lowering treatment combined with a history of blood lipid abnormality.

Statistical analyses

Data are presented as numbers (percentages) for categorical variables and as means (standard deviations) for continuous variables. The chi-squared test and ANCOVA were used to test percentage and mean differences with adjustment for age, sex, and BMI. Serum 25(OH)D was \log_{10} transformed to approach a normal distribution.

We examined the associations between SNPs, 25(OH)D insufficiency (< 30 ng/mL), overweight, and dyslipidemia. Three regression models were tested including each SNP alone with adjustment for age, sex, BMI, 25(OH)D levels, or dyslipidemia, according to the dependent variable. Odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (95% CIs) were estimated. The SNP effects were presented as ORs associated with carrying the minor allele (dominant model).

The IBM SPSS Statistics software version 19 was used for data analyses. All tests were two-sided and a *P* value < 0.05 was considered significant.

RESULTS

Three hundred twenty-three non-diabetic individuals with complete data for circulating 25(OH)D concentration were included in the study. Among the participants, 187 (58%) were women. The mean age was 46.4 ± 12 years. The characteristics of the population under study are shown in Table 1. In the whole study population, the concentration of 25(OH)D ranged from 7 to 55 ng/mL and the mean serum 25(OH)D was 28.7 ± 7.6 ng/mL. Among the participants, 57%

had vitamin D insufficiency, 8% had vitamin D deficiency, 42% had hypertension, 29% were obese, 61% were overweight, and 58% had dyslipidemia.

The prevalence of obesity and overweight was significantly higher in women than in men (38% vs 17%, $P < 0.001$; and 68% vs 52%, $P = 0.004$, respectively).

The genotype distributions in the study population were within the Hardy–Weinberg equilibrium for rs2282679 T > G ($P = 0.90$), rs2298849 T > C ($P = 0.90$), and rs12785878 G > T ($P = 0.90$), but not for rs10877012 G > T ($P < 0.05$). Consequently, the results for rs10877012 (*CYP27B1*) are not shown in this report.

The distribution of 25(OH)D levels and metabolic parameters according to genotypes of *GC* and *NADSYN1* genes is reported in Table 2. The rs2282679 SNP in the *GC* gene was significantly associated with vitamin D status, and lower values of serum vitamin D, higher frequencies of vitamin D insufficiency. Higher frequencies of vitamin D deficiency were observed in carriers of the minor allele G (GG/TG) than in the remaining individuals (P values from 0.03 to 0.01). Its association with dyslipidemia was nearly significant ($P = 0.05$).

In the whole cohort, the rs2298849 SNP in the *GC* gene was associated only with vitamin D deficiency, with a higher frequency in carriers of the minor allele (CC/TC) than in the non-carriers ($P = 0.007$). The individuals carrying the CC genotype had a non-significantly lower frequency of overweight than did the remaining participants (51% vs 63%; $P = 0.11$).

For rs12785878, higher values for mean circulating 25(OH)D ($P = 0.03$) and lower frequency of vitamin D insufficiency ($P = 0.01$) and dyslipidemia were noted in carriers of the minor allele (TT/GT) compared with the remainder of the cohort.

Regarding the associations of the rs2298849 SNP with overweight or obesity according to sex or dyslipidemia (data not shown), a lower frequency of overweight was noted for women carrying the CC genotype compared with those carrying TT/TC genotypes (50% vs 79%; $P = 0.035$). The difference in frequencies of overweight was marginally significant between women carrying the rs12785878 TT genotype and women carrying the GG/GT genotypes (32% vs 69%;

$P = 0.067$) (data not shown). In men, no relationship was found between obesity or overweight and the three SNPs studied.

We also noted, in individuals without dyslipidemia, higher frequencies of obesity in minor allele carriers than in the others for rs2282679 (33% vs 13%. $P = 0.01$) and for rs2298849 (26% vs 11%. $P = 0.02$). In individuals with dyslipidemia a lower frequency of overweight in carriers of the rs12785878 TT genotype than in those carrying the GG-GT genotypes (44% vs 75%; $P = 0.04$).

Table 3 presents the adjusted ORs of vitamin D insufficiency, dyslipidemia, and overweight for the three SNPs. For rs2282679, carrying the minor allele (GG/TG) increased the odds of vitamin D insufficiency and decreased the odds of dyslipidemia (adjusted OR = 2.34, $P = 0.02$; and adjusted OR = 0.41, $P = 0.01$, respectively). Conversely, the adjusted ORs of vitamin D insufficiency and dyslipidemia were both significantly reduced for rs12785878 (TT/GT) minor allele carriers (adjusted OR = 0.56, $P = 0.01$; and adjusted OR = 0.57, $P = 0.03$, respectively). No significant association was noted between the rs2298849 (CC/TC) minor allele and vitamin D insufficiency or dyslipidemia. The odds of overweight were significantly reduced for rs2298849 (CC/TC) minor allele carriers (adjusted OR = 0.57, $P = 0.03$).

DISCUSSION

To our knowledge, this is the first study examining the relationship between overweight, dyslipidemia, vitamin D status and SNPs in the vitamin D-binding protein (*GC*) and *NADSYN1* genes in nondiabetic individuals. In this Afro-Caribbean population, we found significant associations between rs2282679 (*GC*), rs2298849 (*GC*), rs12785878 (*NADSYN1*) and vitamin D status. Two SNPs (rs2282679 and rs12785878, under a dominant model) were significantly associated with dyslipidemia, whereas only rs2298849 (under a dominant model) was associated with overweight.

The prevalence of vitamin D insufficiency was 57% and that of vitamin D deficiency was 8% in our study population. These prevalence values were globally lower than that observed in African-American individuals living in countries with a temperate climate (14,16); the effect of sunshine on vitamin D levels is widely recognized. Previous studies have also reported high frequencies of dyslipidemia (17) and obesity (18), as well as a strong and well-characterized relationship between vitamin D status and obesity (15), in the Afro-Caribbean population.

The vitamin D-binding protein, which is also known as the group-specific component (GC), is the main transporter of vitamin D (9). The concentration of this serum glycoprotein influences 25(OH)D levels and modulate the rates of its bioavailability, activation, and end-organ responsiveness (19-21). The *GC* gene is localized on chromosome 4 (4q12–q13) and encodes a single-chain polypeptide that comprises 474 amino acid residues and belongs to the albumin family (9, 22-24).

Our results regarding vitamin D corroborate previous findings in European (10) and African-American (13) populations, which showed associations between vitamin D levels and rs2282679 and rs2298849 in the *GC* gene in African-Americans (13), rs2282679 in Caucasians in two GWA studies (8, 10), and rs2298849 in 496 healthy individuals (12). These recent GWA studies also identified associations between other genetic variants of genes involved in vitamin D metabolism (*NADSYN1/DHCR7*, *CYP27B1*, *CYP2R1*, and *CYP24A1*) and 25(OH)D concentration (8, 10). Two other SNPs in the *GC* gene, rs4588 and rs7041, which have been more commonly studied, exhibited significant associations with the levels of 25(OH)D and 1,25(OH)₂D in Hispanic- and African-Americans (25), in 741 Caucasian women (26), and in 351 young Canadian adults of East-Asian, European, and South-Asian ancestry (20).

The relationship between the *NADSYN1* gene and vitamin D status has been less studied. The *NADSYN1* gene is located on chromosome 11 (11q13.4), close to the dehydrocholesterol reductase (*DHCR7*) gene, which encodes 7-dehydrocholesterol reductase, an enzyme involved in the conversion of 7-dehydrocholesterol into cholesterol in human skin (27).

A recent GWA study revealed that variants near genes involved in cholesterol synthesis influence vitamin D status in individuals of European descent who had an elevated risk of vitamin D insufficiency (10). In our study population, carrying the rs12785878 minor allele was associated with a decreased risk of vitamin D insufficiency (OR = 0.56).

Polymorphisms in the vitamin D-binding protein gene have been associated with risk of several diseases, including prostate cancer (28), type 2 diabetes, and insulin levels in non-Caucasian populations (29, 30); however, no association was found between this gene and the susceptibility to type 2 diabetes in French Caucasians (31).

Studies analyzing genetic associations with dyslipidemia or obesity-related traits are scarce (32). In our study sample, carrying the rs2282679 minor allele and carrying the rs12785878 minor allele decreased the odds of having dyslipidemia by a factor of 0.36 and 0.58, respectively. These associations were independent of BMI or 25(OH)D level. The rs12785878 SNP in the *NADSYNI* gene was not significantly associated with the levels of blood lipid parameters in our study population (data not shown); however, this SNP was significantly associated with dyslipidemia (as a categorical parameter), with a protective effect against this metabolic disease (OR = 0.58).

We have previously reported the relationship between anthropometric parameters and dyslipidemia in a large sample of the Afro-Caribbean population of Guadeloupe (17). In the present study, a significant relationship with obesity was noted for both SNPs in the *GC* gene in individuals without dyslipidemia, suggesting a direct effect of these SNPs on this metabolic abnormality. Conversely, a significant relationship between the rs12785878 SNP (*NADSYNI*) and overweight was noted only in individuals with dyslipidemia, suggesting an interaction between blood lipid parameters and the polymorphism of a gene (*NADSYNI*) involved in cholesterol synthesis.

Logistic regression analysis using the whole study population showed that, after adjusting for age, sex, dyslipidemia, and 25(OH)D levels, the rs2298849 SNP (*GC* gene, dominant model)

exhibited a protective effect against overweight (OR = 0.57). However, we noted a sex difference in the relationship between rs2298849 and overweight in women carrying the CC genotype and exhibiting a lower frequency of overweight compared with those carrying the TT/TC genotypes, whereas no relationship was found in men. In our study population, the prevalence of overweight and obesity were higher in women than in men. In the study in Caucasian nuclear families, the authors also found a female-specific association between another SNP (rs17467825) in *GC* and the percentage of fat mass (7). However, this sex-specific association suggests disparities in the sensitivity to the SNP related to female (such as estrogen) or male (such as testosterone) hormones. In a middle age Japanese population, an association between a polymorphism of the estrogen receptor alpha gene and upper-body obesity was found only in women (33). A possible effect of sex-hormone-binding globulin should be considered. This hormone binds and transports the sex steroid hormones (mainly testosterone) in the circulation (34) and its variation may contribute to susceptibility to metabolic and cardiovascular outcomes (35). A recent study in Chinese women that investigated the association between variants in genes involved in the vitamin D metabolic pathway and obesity-related traits did not find an association between BMI and SNPs in the *GC* gene, whereas BMI was associated with two other SNPs of genes of the vitamin D pathway (rs22488359 in *CYP24A1* and rs10832313 in *CYP2R1*) (32). This is not surprising, given that ethnic disparities in the relationships between genes and diseases have been widely reported.

It should be noted that the present study had several limitations, including a small sample size. In addition, the concentrations of serum 25(OH)D were examined using a single measurement for each subject, and data on dietary intake were unavailable.

However, our study also had considerable strengths. First, all participants had high skin pigmentation and were living on the island of Guadeloupe, which has a sunny climate. Genetic variants have been little studied in populations with dark skin. Moreover, ethnicity, sun exposure, and seasonal variations are involved in the metabolism of vitamin D.

Second, the exclusion of patients with diabetes from the study minimized the impact of insulin resistance/dependence (36) on the association between SNPs, serum 25(OH)D levels, and other risk factors.

Third, ethnic variation in the *GC* gene has been described (9). Our findings corroborated those previously reported in European and African-American individuals regarding genetic associations with vitamin D status and extended the relevant studies for a specific population sample.

Fourth, this study is the first to analyze the effects of SNPs in the *GC* and *NADSYN1* genes concomitantly on three cardiometabolic diseases (obesity, dyslipidemia, and vitamin D insufficiency).

In conclusion, although the role of genetic factors in the metabolism of vitamin D is recognized, much remains to be understood regarding this relationship. Our results obtained from non-diabetic Afro-Caribbean individuals confirm the associations of the *GC* and *NADSYN1* genes with vitamin D status and suggest that polymorphisms in these genes contribute to dyslipidemia, overweight, and obesity. As vitamin D status is linked to several adverse outcomes (37), our results highlight the fact that genetic variants associated with vitamin D levels may also play a role in the etiology of these diseases. Thus, it will be of interest to confirm these findings in other populations and ethnic groups.

Acknowledgements. This work was supported by grants from the University Hospital of Guadeloupe. We thank all the physicians and the nurses of the Health Center of Guadeloupe (AGREXAM) and all individuals who participated in this study. We also thank Dr Catherine Massart for her contribution.

REFERENCES

1. Rodriguez-Rodriguez E, Navia B, Lopez-Sobaler AM, Ortega RM. Vitamin D in overweight/obese women and its relationship with dietetic and anthropometric variables. *Obesity (Silver Spring)* 2009;17:778-782.
2. Chacko SA, Song Y, Manson JE, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D concentrations in relation to cardiometabolic risk factors and metabolic syndrome in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 2011;94:209-217.
3. Chowdhury TA, Boucher BJ, Hitman GA. Vitamin D and type 2 diabetes: Is there a link? *Prim Care Diabetes* 2009;3:115-116.
4. Wang TJ, Pencina MJ, Booth SL, Jacques PF, Ingelsson E, Lanier K, et al. Vitamin D deficiency and risk of cardiovascular disease. *Circulation* 2008;117:503-511.
5. Pratley RE, Thompson DB, Prochazka M, et al. An autosomal genomic scan for loci linked to prediabetic phenotypes in Pima Indians. *J Clin Invest* 1998;101:1757-1764.
6. Hirai M, Suzuki S, Hinokio Y, et al. Variations in vitamin D-binding protein (group-specific component protein) are associated with fasting plasma insulin levels in Japanese with normal glucose tolerance. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:1951-1953.
7. Jiang H, Xiong DH, Guo YF, Shen H, Xiao P, Yang F, et al. Association analysis of vitamin D-binding protein gene polymorphisms with variations of obesity-related traits in Caucasian nuclear families. *Int J Obes (Lond)* 2007;31:1319-1324.
8. Ahn J, Yu K, Stolzenberg-Solomon R, et al. Genome-wide association study of circulating vitamin D levels. *Hum Mol Genet* 2010;19:2739-2745.
9. Speeckaert M, Huang G, Delanghe JR, Taes YE. Biological and clinical aspects of the vitamin D binding protein (Gc-globulin) and its polymorphism. *Clin Chim Acta* 2006;372:33-42.
10. Wang TJ, Zhang F, Richards JB, et al. Common genetic determinants of vitamin D insufficiency: a genome-wide association study. *Lancet* 2010;376:180-188.
11. LaRonde-LeBlanc N, Resto M, Gerratana B. Regulation of active site coupling in glutamine-dependent NAD(+) synthetase. *Nat Struct Mol Biol* 2009;16:421-429.

12. Bu FX, Armas L, Lappe J, et al. Comprehensive association analysis of nine candidate genes with serum 25-hydroxy vitamin D levels among healthy Caucasian subjects. *Hum Genet* 2010;128:549-556.
13. Signorello LB, Shi J, Cai Q, et al. Common variation in vitamin D pathway genes predicts circulating 25-hydroxyvitamin D Levels among African Americans. *PLoS One* 2011;6:e28623.
14. Foucan L, Ducros J, Merault H. Vitamin D status in dark-skinned patients undergoing hemodialysis in a continually sunny country. *J Nephrol* 2012; 17:0.
15. Velayoudom-Cephise FL, Larifla L, Donnet JP, et al. Vitamin D deficiency, vitamin D receptor gene polymorphisms and cardiovascular risk factors in Caribbean patients with type 2 diabetes. *Diabetes Metab* 2011;37:540-545.
16. Ginde AA, Liu MC, Camargo CA, Jr. Demographic differences and trends of vitamin D insufficiency in the US population, 1988-2004. *Arch Intern Med* 2009;169:626-632.
17. Foucan L, Hanley J, Deloumeaux J, Suissa S. Body mass index (BMI) and waist circumference (WC) as screening tools for cardiovascular risk factors in Guadeloupean women. *J Clin Epidemiol* 2002;55:990-6.
18. Inamo J, Daigre JL, Boissin JL, et al. High blood pressure and obesity: disparities among four French Overseas Territories. *J Hypertens* 2011;29:1494-1501.
19. Chun RF. New perspectives on the vitamin D binding protein. *Cell Biochem Funct* 2012;23.
20. Gozdzik A, Zhu J, Wong BY, Fu L, Cole DE, Parra EJ. Association of vitamin D binding protein (VDBP) polymorphisms and serum 25(OH)D concentrations in a sample of young Canadian adults of different ancestry. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2011;127:405-412.
21. Safadi FF, Thornton P, Magiera H, et al. Osteopathy and resistance to vitamin D toxicity in mice null for vitamin D binding protein. *J Clin Invest* 1999;103:239-251.
22. Belsey R, Clark MB, Bernat M, et al. The physiologic significance of plasma transport of vitamin D and metabolites. *Am J Med* 1974;57:50-56.
23. Daiger SP, Schanfield MS, Cavalli-Sforza LL. Group-specific component (Gc) proteins bind vitamin D and 25-hydroxyvitamin D. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975;72:2076-2080.

24. Christiansen M, Jorgensen CS, Laursen I, Hirschberg D, Hojrup P, Houen G. Protein chemical characterization of Gc globulin (vitamin D-binding protein) isoforms; Gc-1f, Gc-1s and Gc-2. *Biochim Biophys Acta* 2007;1774:481-492.
25. Engelman CD, Fingerlin TE, Langefeld CD, et al. Genetic and environmental determinants of 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D levels in Hispanic and African Americans *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93:3381-3388.
26. Sinotte M, Diorio C, Berube S, Pollak M, Brisson J. combined binding protein and plasma concentrations of 25-hydroxyvitamin D in premenopausal women. *Am J Clin Nutr* 2009;89:634-640.
27. Waterham HR, Wanders RJ. Biochemical and genetic aspects of 7-dehydrocholesterol reductase and Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Biochim Biophys Acta* 2000;1529:340-356.
28. Ahn J, Albanes D, Berndt SI, et al. Vitamin D-related genes, serum vitamin D concentrations and prostate cancer risk. *Carcinogenesis* 2009;30:769-776.
29. Hirai M, Suzuki S, Hinokio Y, et al. Group specific component protein genotype is associated with NIDDM in Japan. *Diabetologia* 1998;41:742-743.
30. Szathmary EJ. The effect of Gc genotype on fasting insulin level in Dogrib Indians. *Hum Genet* 1987;75:368-372.
31. Ye WZ, Dubois-Laforgue D, Bellanne-Chantelot C, Timsit J, Velho G. Variations in the vitamin D-binding protein (Gc locus) and risk of type 2 diabetes mellitus in French Caucasians. *Metabolism* 2001;50:366-369.
32. Dorjgochoo T, Shi J, Gao YT, et al. Genetic variants in vitamin D metabolism-related genes and body mass index: analysis of genome-wide scan data of approximately 7000 Chinese women. *Int J Obes (Lond)* 2011 Dec 13.
33. Okura T, Koda M, Ando F, Niino N, Ohta S, Shimokata H. Association of polymorphisms in the estrogen receptor alpha gene with body fat distribution. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003;27:1020-1027.
34. Coviello AD, Haring R, Wellons M, et al. A genome-wide association meta-analysis of circulating sex hormone-binding globulin reveals multiple Loci implicated in sex steroid hormone regulation. *PLoS Genet* 2012;8:e1002805.

35. Wildman RP, Wang D, Fernandez I, et al. Associations of Testosterone and Sex Hormone Binding Globulin with Adipose Tissue Hormones in Midlife Women. *Obesity (Silver Spring)* 2012 Apr 30.
36. Hurskainen AR, Virtanen JK, Tuomainen TP, Nurmi T, Voutilainen S. Association of serum 25-hydroxyvitamin D with type 2 diabetes and markers of insulin resistance in a general older population in Finland. *Diabetes Metab Res Rev* 2012;28:418-423.
37. Holick MF. High prevalence of vitamin D inadequacy and implications for health. *Mayo Clin Proc* 2006;81:353-373.

Table 1: Characteristics of the Afro-Caribbean non-diabetic individuals.

Variables	All
	N= 323
Sex (F)	58 %
Age (years)	46 ± 12
Waist circumference (cm)	89 ± 13
Body mass index (Kg/m ²)	27 ± 6
Glycaemia (mmol/L)	4.6 ± 1.2
Overweight (%)	61 %
Obesity (%)	29 %
Abdominal obesity (%)	35%
Hypertension (%)	42 %
Dyslipidemia (%)	58 %
Vitamin D Insufficiency (%)	56%

Table 2. Distribution of 25(OH)D levels and metabolic parameters according to genotypes of *GC* and *NADSYN1* genes.

	Genotypes				<i>p</i>	Dominant model	Recessif model
						<i>p</i>	<i>p</i>
rs2282679 T>G (<i>GC</i>) (<i>N</i> = 323)	GG 0	TG 43	TT 280	<i>p</i>			
25 (OH)D (ng/mL)	—	26.4 ± 8.3	29.0 ± 7.4	0.03	0.03	—	
Vitamin D Insufficiency	—	72%	54%	0.03	0.03	—	
Vitamin D Deficiency	—	19%	6%	0.01	0.01	—	
Overweight	—	67%	60%	0.37	0.37	—	
Obesity	—	35%	28%	0.37	0.37	—	
Abdominal obesity	—	42%	34%	0.36	0.36	—	
Dyslipidemia	—	44%	60%	0.05	0.05	—	
rs2298849 T>C (<i>GC</i>) (<i>N</i> = 323)	CC 49	TC 165	TT 109	<i>p</i>			
25 (OH)D (ng/mL)	28.3 ± 6.9	28.5 ± 7.7	29.0 ± 7.8	0.87	0.60	0.76	
Vitamin D Insufficiency	53%	60%	53%	0.46	0.37	0.58	
Vitamin D Deficiency	6%	48%	14%	0.03	0.007	0.50	
Overweight	51%	61%	66%	0.20	0.21	0.11	
Obesity	22%	32%	28%	0.46	0.85	0.26	
Abdominal obesity	28%	39%	33%	0.32	0.37	0.27	
Dyslipidemia	53%	63%	51%	0.13	0.11	0.48	
rs12785878 G > T (<i>NADSYN1</i>) (<i>N</i> = 318)	TT 15	GT 106	GG 197	<i>p</i>	<i>P</i>		
25 (OH)D (ng/mL)	27.7 ± 7.1	30.2 ± 8.3	27.8 ± 7.1	0.05	0.03	0.69	
Vitamin D Insufficiency	53%	47%	62%	0.04	0.01	0.77	
Vitamin D Deficiency	13%	5%	10%	0.25	0.23	0.46	
Overweight	40%	62%	62%	0.22	0.60	0.08	
Obesity	20%	33%	28%	0.50	0.85	0.40	
Abdominal obesity	21%	39%	34%	0.37	0.37	0.17	
Dyslipidemia	60%	49%	62%	0.08	0.04	0.83	

The data are presented as mean (SD) or column percentage.

Table 3. Logistic regressions of vitamin D insufficiency, dyslipidemia and overweight for polymorphisms in *GC* and *NADSYN1*.

	Vitamin D Insufficiency		Dyslipidemia		Overweight	
	Adjusted OR (95% CI)	<i>p</i>	Adjusted* OR (95% CI)	<i>p</i>	Adjusted OR (95% CI)	<i>p</i>
Model 1 rs2282679 (GG - TG) vs TT	2.34 (1.15 – 4.90)	0.02	0.41 (0.21 – 0.84)	0.01	1.60 (0.70 – 3.36)	0.20
Model 2 rs2298849 (CC - TC) vs TT	1.22 (0.76 – 1.98)	0.24.	1.49 (0.89 – 2.47)	0.12	0.57 (0.33 – 0.96)	0.03
Model 3 rs12785878 (TT - GT) vs GG	0.56 (0.35 – 0.89)	0.01	0.57 (0.34 – 0.94)	0.03	0.99 (0.60 – 1.62)	0.96

Vitamin D insufficiency: adjustment for age, sex, BMI, dyslipidemia. *Dyslipidemia*: adjustment for age, sex, BMI, 25(OH)D levels. *Overweight*: adjustment for age, sex, 25(OH)D levels, dyslipidemia. The adjusted odds ratios are provided, separately for each SNP.

De façon similaire aux données de cette précédente étude sur la répartition du surpoids et de l'obésité selon le sexe, et de façon générale en Guadeloupe, le diabète est plus fréquent chez la femme que chez l'homme.

Cette constatation nous conduit à nous interroger sur la place des stéroïdes sexuels ou de leur transporteur SHBG (Sex Hormone Binding Globulin) dans la population Guadeloupéenne. Ces hormones pourraient-elles être associées aux anomalies du métabolisme glucidique et adipeux et pourraient-elles expliquer cette répartition différente des anomalies métaboliques entre les deux sexes?

Par ailleurs, les données de la littérature sur le lien possible entre vitamine D et stéroïdes sexuels ou SHBG sont encore très rares. Les stéroïdes sexuels augmentent la 1-alpha-hydroxylation de la 25(OH)D et la synthèse de la forme biologiquement active de la vitamine D (400). Même si les mécanismes physiopathologiques sont mal connus, le déficit androgénique pourrait ainsi aggraver le déficit en vitamine D et les anomalies métaboliques associées à celui-ci.

Ces anomalies métaboliques, en particulier le DT2, sont aussi associées à des concentrations basses de SHBG, de façon similaire aux concentrations de vitamine D.

L'association entre stéroïdes sexuels et situation d'insulinorésistance est maintenant admise.

Récemment, une association significative entre les stéroïdes sexuels et l'adiposité viscérale a été trouvée (401).

Avant d'évaluer les hormones sexuelles et la SHBG chez les sujets Afro-Caribéens, nous avons souhaité analyser les relations entre la SHBG, la glycémie, le profil insulinaire, la graisse viscérale et intra hépatique et certaines hépatokines impliquées dans le métabolisme glucosé.

En collaboration avec les équipes de recherche de Rennes et Angers, nous avons pu effectuer ce travail chez des sujets dysmétaboliques Caucasiens, issus de la cohorte NUMEVOX.

Ce travail est présenté dans le chapitre suivant après un rappel sur la SHBG.

CHAPITRE IV. SHBG

La SHBG encore appelée SBP (Sex Binding Protein) ou TeBP (Testosterone Binding Protein) est la protéine de transport plasmatique des stéroïdes sexuels (testostérone et œstradiol E₂). Son affinité pour ces hormones est plus élevée que celle de l'albumine (402).

L'existence de la SHBG chez l'homme a été suggérée en 1959, par les expériences de Daughaday sur la testostérone plasmatique puis confirmée par Mercier et al. (en 1967) qui ont identifié cette globuline B liant la testostérone et distincte de l'albumine à l'électrophorèse (403, 404). Des études ultérieures ont révélé que cette protéine de liaison était commune à la testostérone et à l'E₂ et que sa liaison à ces stéroïdes sexuels était réversible (405).

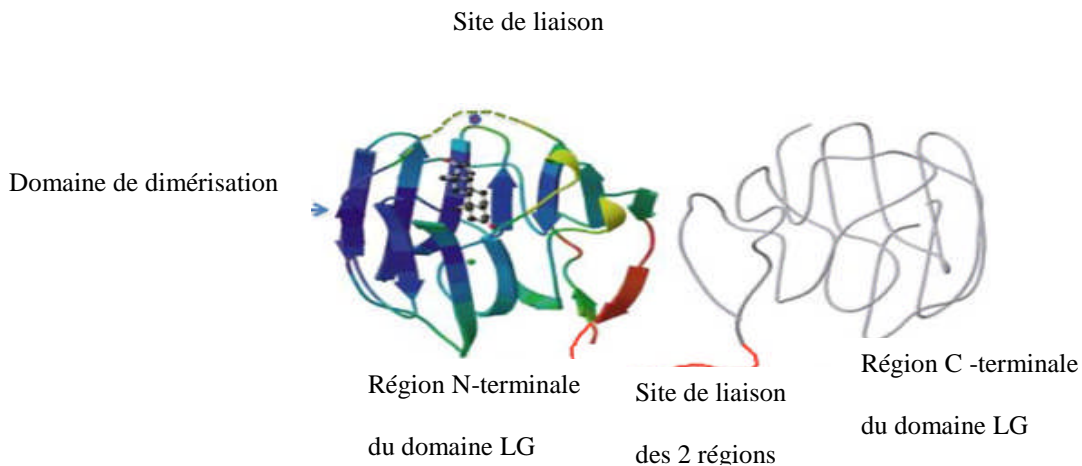
IV.1 Structure et synthèse de la SHBG

La SHBG est une protéine glyquée, synthétisée à partir d'un précurseur de 402 acides aminés dont les 29 premiers résidus forment une séquence hydrophobe (406). C'est un homodimère qui possède un seul site de liaison pour son ligand au sein de chaque sous-unité (407). Chaque monomère est formé de 373 acides aminés et d'une répétition en tandem de domaines LG (406, 408).

La SHBG est synthétisée par les hépatocytes avec une demi-vie d'environ 7 jours (409). Il existe une isoforme glycosylée de la SHBG, appelée androgen-binding protein (ABP) et produite par les cellules de Sertoli testiculaires (410).

Figure 16 : Structure tertiaire de la SHBG (411)

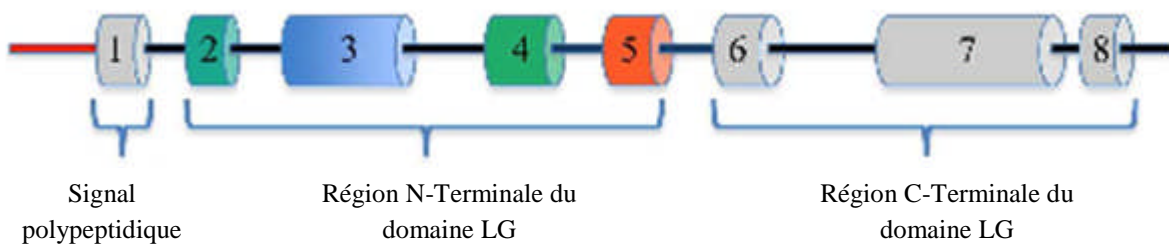
Monomère de la SHBG contenant le domaine LG avec sa région amino-terminale (en vert) séparé de la région carboxy-terminale (en gris) par un site de liaison (en rouge). Le site de liaison des hormones stéroïdes est en pointillés vert.



Le gène qui code pour la SHBG est situé sur le bras court du chromosome 17 en 17p12-p13. Il est constitué de 8 exons codants (412, 413).

Figure 17 : Structure du gène de la SHBG (411)

L'exon 1 comprend 60 paires de bases ainsi que le site d'initiation de la traduction de la séquence du précurseur polypeptidique de la SHBG.



IV.2 Physiologie et mode d'action de la SHBG

Le récepteur de la SHBG est situé sur la membrane des tissus cibles des hormones stéroïdes. Le passage de cette membrane se fait de façon passive après séquestration du complexe SHBG–hormones stéroïdes à la surface de la cellule (414).

Les variations plasmatiques de la SHBG influencent la distribution plasmatique des stéroïdes sexuels répartis, entre leur forme liée (à cette SHBG) et leur fraction libre (402). Des études in vitro ont montré que les stéroïdes sexuels (œstrogènes et testostérone), régulent aussi physiologiquement, la production et la sécrétion de la SHBG (415, 416). Des concentrations basses de SHBG ont ainsi été décrites pour la première fois dans les situations anormales d'hypersécrétion de stéroïdes (androgènes ou E2), responsable d'hirsutisme ou d'acné (417) et dans l'excès d'œstrogènes lié au cancer de l'endomètre (418).

La mesure de la SHBG constitue un marqueur diagnostique important des états de sécrétion inappropriée de TSH. Ainsi, les concentrations de SHBG sont normales dans les résistances aux hormones thyroïdiennes mais augmentées au cours des adénomes thyroïdiens responsables d'une hyperthyroïdie d'origine centrale (419).

D'autres facteurs métaboliques ou nutritionnels, certains facteurs de croissance ou des facteurs liés au vieillissement modifient les concentrations de SHBG soit de façon directe en régulant sa synthèse hépatique, soit de façon indirecte en modulant les étapes de liaison de la SHBG à son récepteur membranaire au niveau des cellules cibles (418, 420) (tableau 3).

Les concentrations de SHBG varient aussi physiologiquement avec l'âge et le sexe.

Des normes de concentrations sériques de la SHBG ont été établies et sont précisées dans le tableau 4.

Tableau 3 : Situations physiologiques et pathologiques associées à des variations plasmatiques de SHBG

SHBG basse	SHBG élevée
Obésité - hyperandrogénie	Grossesse (production d'œstrogènes augmentée)
Syndrome des ovaires polykystiques	Anorexie
Hypothyroïdie	Hypogonadisme
Hyperprolactinémie - Hypercorticisme	Insensibilité aux androgènes
Acromégalie	Hyperthyroïdie (en particulier, liée à un adénome thyroïdienne)
Syndrome néphrotique	Cirrhose du foie
Tumeur androgéno-sécrétante	Thérapeutiques: Contraception orale, anti-épiléptiques, substitution hormonale œstroprogestative
Thérapeutiques: Hormone de croissance, glucocorticoïdes, androgènes / anabolisants	

Tableau 4 : Normes des concentrations sériques de SHBG en fonction de l'âge et du sexe

Individus	SHBG (nmol/l)
Hommes 17-65 ans	14,5-50
Femmes 17-50 ans	26,1-110
Femmes post-ménopausées sans traitement hormonal substitutif	14,1-68,9

Facteur de conversion : $\text{nmol/L} \times 0,095 = \mu\text{g/ml (mg/l)}$

$\mu\text{g/ml (mg/l)} \times 10,53 = \text{nmol/L}$

IV.3 SHBG et paramètres du métabolisme du glucose (insulinorésistance, insulinosécrétion, diabète)

En dehors de leurs effets physiologiques sur la fonction de reproduction, les stéroïdes sexuels et la SHBG influencent le métabolisme hydrocarboné. Le dysfonctionnement le plus fréquent de ce métabolisme implique des mécanismes d'insulinorésistance, composante principale du syndrome métabolique et du diabète de type 2.

Le syndrome métabolique est défini selon le NCEP ATP III (National Cholesterol Education Program correspondant au programme de lutte contre le cholestérol aux Etats Unis) par la présence d'au moins 3 critères parmi les 5 suivants (421).

1. Une obésité abdominale avec un tour de taille > 102 cm chez l'homme et > 88cm chez la femme
2. Une hypertriglycéridémie > 1,5 g/l (1,7 mmol/l)
3. Une concentration de High Density Lipoprotein-Cholestérol (HDL-CT) < 0,4 g/l (1,04 mmol/l) chez l'homme ou < 0,5 g/l (1,29 chez la femme)
4. Une hypertension artérielle >130/85 mm de Hg
5. Une glycémie à jeun > 1,10 g/l (6,1 mmol/l)

La définition du NCEP-ATP III cible le risque cardiovasculaire et prend en compte les anomalies lipidiques (triglycérides et HDL-CT) avec un seuil tensionnel plus bas que les définitions de l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) et de l'EGIR (European Group for the Study of Insulin Resistance) qui privilégient plutôt les mécanismes de l'insulinorésistance (422-424).

L'insulinorésistance n'est pas synonyme de syndrome métabolique. D'après la conférence de consensus de l'Association Américaine du diabète (ADA), elle est définie par une altération de la réponse des tissus à l'insuline exogène ou endogène (425, 426).

En dehors de son rôle de régulation de la glycémie, l'insuline exerce des effets, essentiellement anabolisants, sur différents types de cellules, principalement les hépatocytes, les myocytes et les adipocytes. Elle stimule leur croissance et leur différenciation et favorise le stockage des substrats dans la graisse, le foie et le muscle. Elle stimule la lipogenèse, le stockage des lipides et la synthèse du glycogène. Elle inhibe la lipolyse et la glycogénolyse (427).

L'insulinorésistance peut être évaluée par la mesure de l'index d'insulinorésistance ou HOMA-IR calculé selon la formule suivante : $[\text{insuline à jeun (mU/ml)} \times \text{glucose à jeun (mmol/l)}] / 22,5$ (428).

Différentes études ont mis en évidence une association significative entre les concentrations basses de SHBG et la présence d'un syndrome métabolique ou d'un diabète de type 2 (DT2) quel que soit le sexe (11, 12, 429, 430). L'une de ces études, réalisée chez 345 hommes ayant un syndrome métabolique mais non diabétiques, a mis en évidence une association inverse entre les concentrations de SHBG et celles de l'insuline, du glucose et des triglycérides (429). Toutes les études rapportées jusqu'ici étaient majoritairement, observationnelles et mettaient en évidence une corrélation négative entre concentrations de SHBG, glycémie ou insulïnémie chez des sujets normoglycémiques ou en situation d'insulinorésistance (431, 432). Une autre de ces études, la «San Antonio Heart Study» a confirmé l'existence d'une corrélation inverse et significative entre la SHBG et les concentrations d'insuline chez des femmes provenant de 2 groupes ethniques différents et en situation pré ou post-ménopausique. Dans cette population, des valeurs hautes de testostérone libre et des valeurs basses de SHBG étaient associées à des concentrations élevées de glucose et d'insuline, quel que soit le groupe ethnique d'appartenance (431, 433).

En présence d'un hyperinsulinisme, le rôle de l'insulïnémie sur la synthèse hépatique de la SHBG a été évoqué. Des travaux ont mis en évidence une diminution de la synthèse de la SHBG après apport d'insuline exogène dans des lignées de cellules HepG2 (hépatoblastomes humains)

(434, 435). Ces résultats sont en accord avec une possible régulation de la synthèse de SHBG directement par l'insuline.

L'effet inhibiteur de l'hyperinsulinisme sur la production hépatique de SHBG a aussi été décrit chez la femme, dans des situations de syndrome des ovaires polykystiques (SOPK), caractérisées par un état d'insulinorésistance majeure et d'hyperandrogénie (13).

A l'inverse, la SHBG pourrait moduler la sécrétion d'insuline. Des concentrations basses de SHBG sont corrélées aux index d'insulinosensibilité chez des hommes diabétiques de type 2 (436), mais aussi des sujets non diabétiques chez lesquels elles sont significativement associées aux pics de sécrétion insulinique (437). De plus, elles sont modulées par les concentrations de glucose (431, 432). Une étude française a montré que des concentrations basses de SHBG seraient un facteur de risque d'anomalies glucidiques chez la femme, indépendamment des taux d'adiponectine et d'insuline. Ces valeurs basses de SHBG seraient associées à un risque de DT2 indépendamment de l'index HOMA et des paramètres du syndrome métabolique (438), ce qui a été confirmé par les travaux de Peter et al (439). Les mécanismes réellement impliqués dans la survenue d'un DT2 et liés aux concentrations de SHBG indépendamment de la situation d'insulinorésistance, sont peu connus mais d'après d'anciennes études, les valeurs basses de SHBG associées à des concentrations basses de testostérone biodisponible, contribueraient au développement du DT2 (433, 440, 441). Les stéroïdes sexuels pourraient ainsi jouer un rôle dans cette association entre SHBG et DT2, qui semble être plus forte chez la femme que chez l'homme (442, 443).

L'HbA1C ou hémoglobine glyquée est une forme d'hémoglobine sanguine qui lie les molécules de sucre. Elle est corrélée à la glycémie et est un bon marqueur de l'équilibre glycémique sur 3 mois chez le sujet diabétique (444). Les concentrations de SHBG seraient inversement associées à l'HbA1C mais ces données sont rapportées chez des sujets non diabétiques, issus de la cohorte

EPIC-Norfolk (Norfolk population of European Prospective Investigation into Cancer) et peu de travaux sur ce sujet ont été publiés (445).

Enfin, un rôle direct de l'obésité sur les concentrations de SHBG a été évoqué. En effet, une relation inverse entre l'IMC et la SHBG a été mise en évidence chez l'homme comme chez la femme (446). L'analyse des concentrations de SHBG et de l'insulinémie chez des femmes obèses en pré ménopause, a confirmé, après perte de poids, la non inhibition de la SHBG par les seules variations d'insuline (438, 439, 447). Plus récemment, l'hypothèse du rôle de l'adiposité viscérale dans la diminution des concentrations de SHBG a été envisagée avec la mise en évidence d'une corrélation inverse entre SHBG et index HOMA, mais aussi une association inverse entre l'existence d'un syndrome métabolique et les concentrations de la SHBG, chez des femmes en post ménopause, comparées à des femmes en pré ménopause (447).

La SHBG semble être un meilleur marqueur de l'insulinorésistance et du risque de DT2 que les stéroïdes sexuels mais plusieurs études ont analysé le rôle de ces androgènes dans la survenue des anomalies glucidiques. L'effet protecteur des œstrogènes sur le risque d'insulinorésistance et de DT2 a été mis en évidence chez des femmes recevant un traitement hormonal substitutif versus placebo. Avec le traitement hormonal, l'insulinosensibilité et le profil glycémique étaient améliorés, associés à une baisse de l'incidence du DT2 (448, 449). Une méta analyse de Ding (2006) insiste sur le rôle modulateur des hormones stéroïdes sur le statut glycémique et le risque de DT2 chez l'homme et la femme (7).

Comme pour les œstrogènes, les variations de testostérone sont impliquées dans le métabolisme glucidique. Des concentrations élevées de testostérone totale sont associées à un risque plus élevé de DT2 chez la femme alors que chez les hommes, le risque de DT2 est associé à des concentrations plutôt basses de testostérone totale. Une des explications est le rôle de l'adiposité qui interviendrait comme facteur confondant puisque chez l'homme, la testostérone est inversement associée à l'adiposité ce qui n'est pas le cas chez la femme (6, 450) .

En définitive, les mécanismes impliquant la SHBG dans le métabolisme hydrocarboné sont complexes et multiples.

En dehors de son rôle de protéine de transport des stéroïdes sexuels, et de son implication dans le métabolisme hydrocarboné, la SHBG intervient dans la régulation de l'activité de la lipoprotéine lipase (LPL) hépatique et influence les concentrations sériques du HDL-CT (12). Les lipoprotéines plasmatiques sont synthétisées par le foie et les mécanismes de régulation de leur synthèse sont similaires à ceux de la SHBG (451). La lipogenèse hépatique associée à une augmentation de la graisse intra hépatique, est corrélée aux concentrations plasmatiques de SHBG (452). La graisse viscérale est associée à un hyperinsulinisme et à un profil lipidique particulier, avec un HDL-CT bas, une hypertriglycéridémie, et un taux de Low-Density Lipoprotein Cholestérol (LDL-CT) élevé. A l'inverse, les concentrations de SHBG sont plutôt corrélées négativement à l'hypertriglycéridémie, au LDL-CT, au cholestérol total, et à l'Apo B (12). Une corrélation positive entre SHBG et HDL-CT a aussi été décrite, suggérant l'effet plutôt protecteur de la SHBG en matière d'événement cardiovasculaire (453, 454).

Indépendamment de l'insulinorésistance, l'obésité favoriserait la baisse de la SHBG par le biais des récepteurs « Peroxysome-Proliferator Receptors » (PPARs) qui régulent aussi l'homéostasie glucidique et lipidique.

La SHBG synthétisée par le foie, est ainsi associée à l'adiposité viscérale et au risque de développer un diabète de type 2 mais les mécanismes physiopathologiques impliqués sont encore mal connus. La graisse intrahépatique et l'hyperinsulinisme ont été proposés comme déterminant l'expression moléculaire de la SHBG (455) mais la relation entre la SHBG, les stéroïdes sexuels, la graisse intra-hépatique, les hépatokines et les paramètres métaboliques n'est pas établie.

Notre hypothèse de recherche est la suivante : il pourrait exister une association entre la SHBG et le métabolisme du glucose, indépendante des hormones sexuelles mais liée à la graisse

viscérale ou intra hépatique. Cette analyse pourrait avoir des répercussions importantes sur nos travaux ultérieurs, nous permettant de cibler les paramètres biologiques qui pourraient expliquer pourquoi dans la population de Guadeloupe, la répartition du diabète prédomine chez la femme.

Pour étayer notre hypothèse, une étude chez des sujets dysmétaboliques caucasiens, a été réalisée et est présentée dans le chapitre ci-dessous :

IV.4 Stéroïdes sexuels, graisse intra-hépatique et FGF-21 dans l'association entre la SHBG et les paramètres métaboliques

L'objectif principal de cette étude était d'évaluer les relations entre la SHBG, les stéroïdes sexuels et les paramètres métaboliques (glycémie, HbA1C, dyslipidémie). Un autre de nos objectifs était de déterminer si les hépatokines impliqués dans le métabolisme du glucose, la graisse viscérale ou intrahépatique pouvaient moduler l'association de la SHBG avec les paramètres métaboliques.

Les données de 299 sujets dysmétaboliques (233 hommes et 66 femmes), issus de la cohorte Numevox (enregistrée sous le numéro NCT00997165) ont été analysées en collaboration avec les équipes de Rennes et d'Angers. Les sujets avaient été inclus après signature du consentement éclairé. Ils ont bénéficié de mesures anthropométriques et biologiques pour les dosages plasmatiques à jeun du glucose, de l'insuline, du bilan lipidique, de la SHBG, de l'adiponectine et des hépatokines FGF-21 et Fétuin A. L'évaluation de la graisse viscérale et de la graisse intra hépatique a pu être réalisée avec une imagerie par résonance magnétique (IRM) chez 136 sujets. L'âge moyen était de $54,4 \pm 9,4$ ans chez les hommes et de $59,8 \pm 5,7$ ans chez les femmes.

Les concentrations de SHBG étaient de $40,5 \pm 23,5$ nmol/l chez les hommes et de $48,8 \pm 25,3$ nmol/l chez les femmes. Chez ces sujets, les concentrations de SHBG étaient inversement corrélées à la glycémie à jeun ($r = -0,23$; $p=0,001$) et à l'HbA1C ($r=-0,30$, $p=0,0001$) après

ajustement pour l'IMC (figures A et B). Les concentrations de la glycémie à jeun et de l'HbA1C diminuaient en fonction des quartiles de SHBG [1^{er} vs 4^{ème} quartile: (6,55 ± 1,33 vs 5,95 ± 1,10 mmol/l; p=0,01) et (6,26 ± 0,79 vs 5,89 ± 0,56; p=0,008) après ajustement pour l'âge, l'IMC et la consommation d'alcool (figures C et D).

Pour conserver la distribution gaussienne de certaines variables (SHBG, HbA1C et triglycérides), les analyses ont été faites après transformation en fonction logarithme (log transformation).

Figure A : SHBG et glycémie

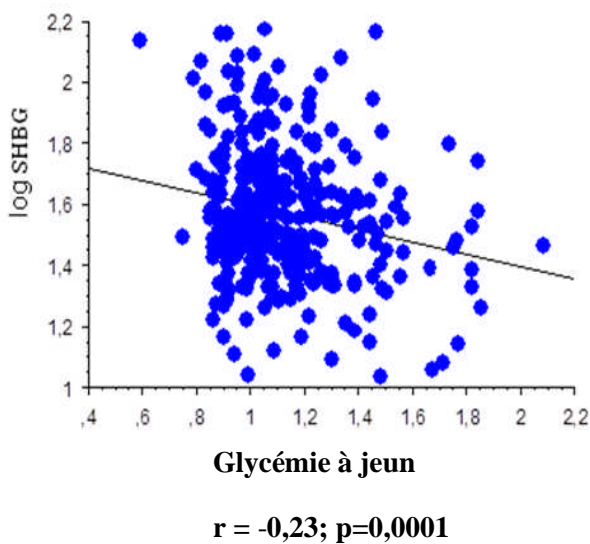


Figure B : SHBG et HbA1C

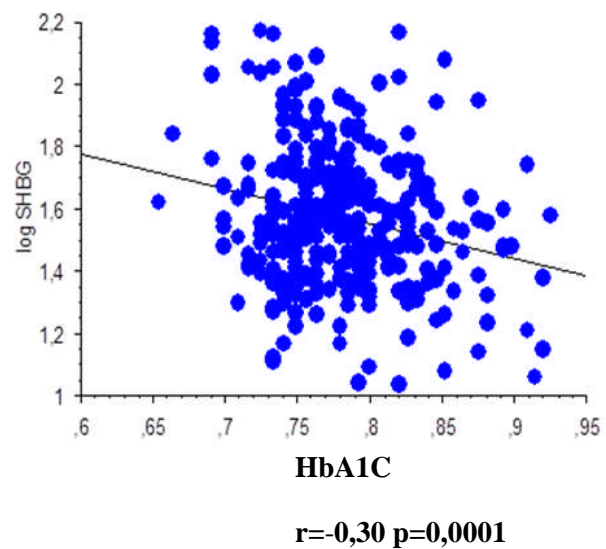


Figure C : Quartiles de SHBG et glycémie

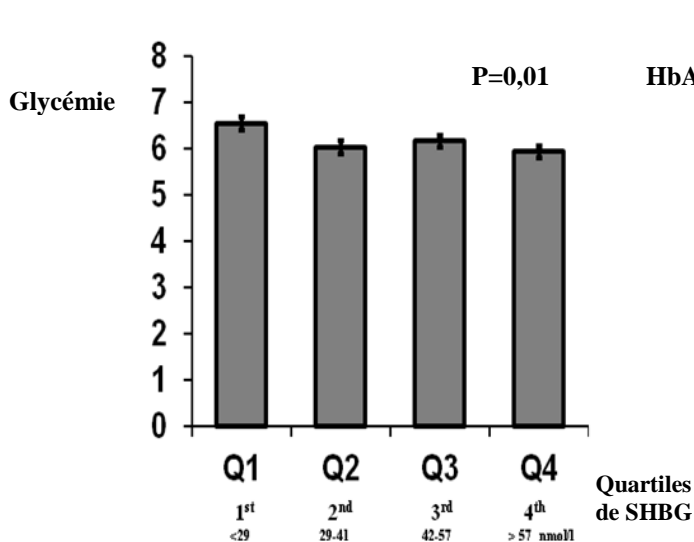
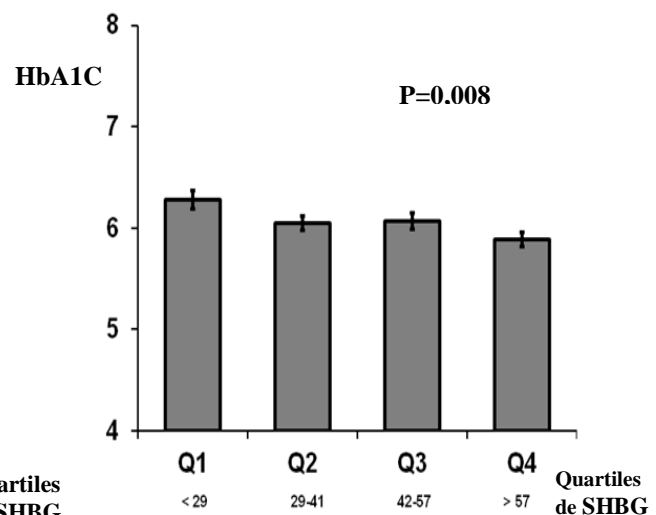


Figure D : Quartiles de SHBG et HbA1C



Par ailleurs, les concentrations de SHBG étaient positivement corrélées au HDL-cholestérol ($r=0,22$, $p=0,0001$) et négativement aux triglycérides ($r=-0,22$, $p=0,0002$). De plus, les triglycérides diminuaient et celles du HDL-CT augmentaient avec les quartiles de SHBG, ceci indépendamment de la glycémie, de l'index HOMA et des concentrations d'adiponectine. Après ajustement pour l'âge et le tour de taille, les concentrations de SHBG étaient inversement associées aux triglycérides ($\beta=-0,20$, $p=0,0008$) mais non à la graisse intra-hépatique ($p=0,09$) ou viscérale ($p=0,37$) (Tableau ci-dessous).

Tableau : Relations entre les concentrations de SHBG et la répartition du tissu adipeux

	Coefficient bêta	p
Graisse viscérale	- 0,09	0,37
Graisse sous-cutanée	- 0,14	0,11
Graisse intra hépatique	- 0,13	0,09

Après ajustement pour l'âge et le tour de taille, les concentrations de SHBG étaient associées à l'adiponectinémie ($\beta=0,09$, $p=0,11$), à FGF-21 ($\beta= -0,18$, $p=0,003$), mais non à Fétuin A ($p=0,63$).

L'association entre les concentrations de SHBG, de glucose et de lipides n'était pas modifiée par les concentrations de testostérone et d'œstradiol. En revanche, nous avons constaté chez les hommes (données non disponibles chez les femmes), une corrélation significative entre la SHBG et la testostéronémie totale ($r=0,60$, $p<0,0001$) et entre la SHBG et l'œstradiolémie ($r=0,16$, $p=0,02$).

En définitive, les concentrations de SHBG étaient corrélées négativement à la glycémie à jeun et à l'HBA1C avec un effet indépendant du sexe, du contexte métabolique et de la graisse intra hépatique.

Très peu d'études ont porté sur l'analyse de cette relation entre la SHBG et la graisse intra hépatique mesurée par IRM ou spectroscopie, dans une population similaire à la nôtre (439). Les autres travaux, peu nombreux, évaluent cette association entre SHBG et graisse viscérale ou hépatique généralement chez des femmes, en situation de pré-ménopause et de surpoids ou en présence d'un syndrome des ovaires polykystiques (456).

L'association inverse décrite entre les concentrations de SHBG et le tour de taille (outil utilisé pour estimer la graisse viscérale) est généralement notée chez la femme obèse, et ne correspond pas au profil de la population de sujets dysmétaboliques, majoritairement masculin, que nous avons choisi d'analyser (457)

Ce travail a fait l'objet d'un article intitulé « *Sexual steroids, intra hepatic fat and FGF-21 in the association between SHBG and metabolic features* ». Cet article est en phase de soumission à la revue « *Clinical Endocrinology* ».

Role of sexual steroids, intra-hepatic fat and FGF-21 in the association between SHBG and metabolic features

Short title: SHBG, FGF-21 and intrahepatic fat

Fabrice Bonnet (1), Fritz-Line-Velayoudom Cephise (2), Alain Gautier (1), Séverine Dubois (3), Catherine Massart (4), Alioune camara (1), Laurent Larifla (5), Beverley Balkau (6), Pierre-Henri Ducluzeau (3).

(1) Department of Endocrinology, University hospital of Rennes, Inserm UMR 991, Rennes, France

(2) Dept of Endocrinology-Diabetology, University Hospital of Pointe-à-Pitre, France

(3) Department of Diabetology, University Hospital of Angers, France

(4) Laboratory of hormonology, University Hospital of Ponchaillou, Rennes France

(5) Research Group, Clinical Epidemiology and Medicine, University Hospital of Guadeloupe, University of Antilles and Guyane, France

(6) INSERM CESP Centre for Research in Epidemiology and Population Health, U 1018, Epidemiology of Diabetes, Obesity and Chronic Kidney Disease Over the Lifecourse, Villejuif, France

Key terms: SHBG, metabolic syndrome, hepatokines, intrahepatic fat

- **Word count :** 2701
- **Name and address of the author to whom the proofs and requests for offprints should be sent:** Fabrice Bonnet, Department of Endocrinology. University Hospital of Rennes, 2 rue Henri le Guilloux- 35033 RENNES CEDEX 9
- **Corresponding author's e-mail and ground mail addresses, telephone and fax numbers:** fabrice.bonnet@chu-rennes.fr, tel: +33 2 99 26 71 42, fax number: +33 2 99 26 71 49
- **Abstract:** 242 words
- Disclosure statement: the authors have nothing to disclose
- Acknowledgments: the authors are indebted to Jacqueline Gibassier for her precious help

Abstract

Background: SHBG (sex hormone binding globulin) concentration is inversely associated with the risk of type 2 diabetes. However, the mechanisms underlying this association beyond intrahepatic fat content remain poorly understood.

Objective: We investigated whether SHBG is correlated to both glucose and lipids levels and whether this association depends on fatty liver content, visceral fat content and/or hepatokines.

Design and Patients: We studied 299 dysmetabolic individuals in whom measurement of plasma SHBG, glucose, adiponectin, FGF21, Fetuin A was performed. Intrahepatic liver fat and visceral fat content were measured by MRI in 136 subjects.

Results: SHBG concentration was inversely correlated with fasting glucose ($r=-0.23$, $P=0.001$), HbA1c ($r=-0.30$, $P<0.0001$), triglycerides ($r=-0.22$, $P=0.0002$) and positively correlated to HDL-Cholesterol ($r=0.22$, $P=0.0001$) after adjustment for age, BMI and waist circumference. The significant association between SHBG and both HbA1c and lipids persisted after adjustment for either hepatic fat content or Fetuin-A or FGF-21 concentrations. There was an inverse correlation between SHBG and FGF-21 levels, which was attenuated after controlling for intrahepatic fat. Total testosterone or estradiol levels did not modify the relationship between SHBG and both glucose and lipids levels in men.

Conclusion: The significant association between SHBG and both HbA1c and lipids levels was not related to either FGF-21 or Fetuin-A and was also independent of intrahepatic and visceral fat. The novel association between SHBG and FGF-21 concentrations underscores possible interactions between lipolysis, intrahepatic fat, elevated FGF-21 and low SHBG levels, which need to be further, explored.

INTRODUCTION

SHBG (Sex Hormone Binding Globulin) is a protein transport of sex steroids synthesized by the liver. Previous evidence has shown that low levels of SHBG are associated with visceral adiposity, fatty liver and an increased risk of type 2 diabetes¹⁻⁴. Furthermore, studies applying the Mendelian randomization approach suggest that SHBG may be directly involved in the pathogenesis of type 2 diabetes^{5,6}. However, the pathophysiological mechanisms underlying the inverse association between SHBG and both the presence of the metabolic syndrome and the onset of hyperglycaemia remain poorly understood. Hyperinsulinaemia, glucose or intrahepatic fat content have been proposed as possible determinants of the molecular expression of SHBG⁷. It has been shown that monosaccharide-induced lipogenesis reduces hepatic Hepatocyte Nuclear Factor 4 alpha (HNF-4 α) levels, a transcription factor which regulates SHBG gene expression, leading therefore to the down regulation of SHBG synthesis after sugar consumption-induced lipogenesis⁸.

However, the nature of the relationship between plasma SHBG concentration and lipids levels besides hepatic lipogenesis or intrahepatic fat content has not been well characterized. Furthermore, the role of hepatokines or adipocytokines such as adiponectin, Fetuin A or FGF-21, which are involved in the regulation of both lipid and glucose homeostasis, as determinants of SHBG concentration remains unknown.

The aim of the present study was to investigate the relationship between circulating SHBG and both glycaemia and lipids levels in men. For this purpose, we studied a cohort of men with at least one metabolic abnormality presenting therefore with a wide range of both glycaemia and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) concentrations from normal to pathologically elevated values. Furthermore, we sought to determine whether hepatic and visceral fat content, hepatokines or adiponectin levels modulated the association between SHBG and metabolic features.

MATERIALS AND METHODS

Study population

A total of 299 individuals (233 men and 66 women) from the Numevox cohort (registered on clinicaltrials.gov: NCT00997165) was included. This cohort is intended to follow-up the vascular dysfunction in relation to fat repartition in patients with metabolic syndrome. Each patient had at least one parameter of metabolic syndrom (MetS). Biological explorations were performed in the Department of Nutrition of the Angers University Hospital, in France. The institutional ethics committees approved the study. Written consent was obtained for all the studied patients and validated by the Ethical Research Committee. Patients were aged between 27 and 77 years and did not present obvious acute disease at the time of evaluation. No patient received medications known to interfere with sex steroids or SHBG levels.

Clinical data

Weight, height, waist circumference and blood pressure using an automatic blood pressure cuff were recorded. The presence of the MetS was defined according to the IDF 2005 criteria.

Blood tests

Blood samples were obtained from participants after overnight fasting. Fasting serum glucose (FBG), insulin, HbA1c, alanine aminotransferase, γ -Glutamyltransferase, total cholesterol levels, Low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) and triglycerides (TG) were measured.

The HOMA insulin resistance index (HOMA-IR) was calculated as described previously ⁹. Leptin was measured by ELISA (Millipore, USA); Fetuin A and FGF 21 were measured by ELISA (R&D Systems, Minneapolis, USA) and SHBG was measured by immunoradiometric assay (IRMA) (Immunotech, Beckman–Coulter, Villepinte, France). In the 233 men of the

cohort, E2 was measured by ultrasensitive RIA (ESTR-US-CT, CisBio, IBA, Gif sur Yvette, France) and testosterone by the automated chemiluminescent ADVIA-Centaur® (Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown, USA).

Imaging

Imaging was carried out on a 1.5T MRI with a phased-array surface coil. Individuals who had the MRI assessment had similar age and BMI as those who did not. Visceral subcutaneous fat area was quantified in slices Intra and retro peritoneal VAT was assessed from an abdominal MRI at the level of the L3-L4 inter vertebral disk in a subset of 136 patients¹⁰. Intrahepatic fat fraction (HFF) was quantified by a multi-fast gradient-echo (MFGRE) method previously validated^{11, 12}. The principle of the sequence is an in phase (IP) and out of phase (OP) echo gradient, but with the acquisition of 16 echoes (eight IP images and eight OP images), allowing for the precise calculation of signal decay parameters: water (W) signal, fat (F) signal, local field inhomogeneity, and noise (N). HFF was calculated using the following formula: $100 \times (F/(W+F)) = \%FMFGRE$. HFF calculation was carried out from the signal intensities measured in two sites of interest, located in the right liver lobe (anterior and posterior right liver lobes). The two sites were attentively selected to avoid the presence of liver vessels.

Statistical analysis

The data are expressed as mean \pm SD or as percentages for categorical data. Variables, which were not normally distributed, were log transformed before analysis. Spearman correlation coefficients, rho, were determined between SHBG and metabolic parameters. An ANOVA was used for assessing the metabolic parameters according to the quartiles of SHBG.

The relationships between SHBG and metabolic parameters were assessed by a multiple linear regression analysis with adjustment for age, sex, BMI and waist and by further controlling for hepatic, visceral fat content or hepatokines levels. Statistical analyses used

StatView for Windows (version 5.0, SAS Institute Inc., NC) and SAS version 9.2 (SAS Institute, Cary, NC).

RESULTS

The population studied had a wide range of fasting glycaemia (4.1 to 10.1 mmol/l), HbA1c (4.5 to 8.4 %), HDL-C (0.6 to 3.1 mmol/l) and triglycerides concentrations (0.4 to 8.4 mmol/l) (Table 1).

In univariate analysis, plasma concentration of SHBG was negatively correlated with fasting glycemia ($r=-0.23$, $P=0.0001$), HbA1c ($r=-0.30$, $P=0.0001$) but not with fasting insulin ($r=-0.02$, $P=0.70$), nor HOMA-IR index ($\rho=-0.12$, $P=0.05$). The inverse relationship between SHBG and glucose levels was also apparent when stratifying the population according to the quartiles of SHBG [first vs fourth quartile: fasting glycaemia, 6.55 ± 1.33 vs. 5.95 ± 1.10 mmol/l, P for ANOVA: 0.01; HbA1c: 6.26 ± 0.79 vs 5.89 ± 0.56 , P for ANOVA: 0.008]. This association between SHBG and both fasting glucose and HbA1c persisted after adjustment for age, sex, BMI and was unchanged after controlling for adiponectin levels (Table 2).

SHBG and lipids

Circulating SHBG concentration was positively correlated with HDL-C ($\rho=0.22$, $P=0.0001$) and negatively with triglycerides ($\rho=-0.22$, $P=0.0002$) in univariate analysis. There was also a graded increase in HDL-C concentration across SHBG quartiles and a parallel decrease in triglycerides levels (Figure 1). This association between SHBG and both HDL-C and triglycerides persisted in the multivariate regression model and was independent of fasting glycaemia, HbA1c and adiponectin levels (Table 2).

Table 3 shown results of the impact of sexual hormones on the association between SHBG and metabolic features in men. The association between triglycerides or HDL-C with SHBG was not particularly affected after adjusting for testosterone or estradiol concentration in men.

Impact of fat localization and hepatokines on the association between SHBG and metabolic features

After adjusting for age, sex and waist, SHBG concentration was not associated with visceral or subcutaneous fat ($\beta = -0.09$, $P=0.37$ and $\beta = -0.14$, $P = 0.11$ respectively). There was only a trend for an inverse association between SHBG and intra-hepatic fat ($\beta = -0.13$, $P= 0.09$).

Regarding relations with hepatokines, in univariate analysis, we found a positive correlation between SHBG and adiponectin ($\rho=0.16$, $P=0.008$). This relation was not significant any more after adjustment for age, sex and BMI (table 2). Fetuin A concentration was not related to SHBG (Table 2).

In contrast, FGF 21 appeared as a significant determinant of SHBG level with a negative correlation ($\beta =-0.18$, $P= 0.003$) after adjustment for age, sex, and waist. Similarly, concentrations of SHBG significantly decreased across quartiles of FGF21 (P for trend: 0.001) (Figure 2). This significant association between SHBG and FGF 21 persisted after further controlling for fasting glycaemia, HbA1c, lipids or visceral fat but was abolished after taking into account for intra-hepatic fat.

The relationship between SHBG and either glucose (both fasting glycemia and HbA1c) or lipid levels was not dependent on either visceral or intrahepatic fat content (Table 4).

Similarly, the association of SHBG with metabolic features appears to be not influenced by FGF 21 concentration (Table 4).

Impact of sexual hormones

In the 233 men of the cohort, we observed that neither total testosterone nor estradiol did alter the association between SHBG and both fasting glycaemia and HbA1c (Table 3). The relation with triglycerides persisted also after controlling for either testosterone or E2. For HDL-c, adjustment for total testosterone but not for E2 attenuated the association with SHBG (Table 3).

DISCUSSION

The main finding of the present study is that SHBG is inversely correlated to both glucose and lipid concentrations independently of both visceral and intra-hepatic fat content. Furthermore, in men the association between SHBG and glucose levels appears to be independent of sexual steroids levels.

Previous studies reported that a low SHBG level is associated with enhanced insulin resistance and an increased risk of type 2 diabetes^{5, 6}. This has been examined in young women with PCOS or middle-aged women and men^{13, 14}. The potential mechanisms underlying this association remain poorly elucidated. The first hypothesis raised was that hyperinsulinaemia leads to a decrease of SHBG concentration¹⁵ or an inhibition of hepatic synthesis of SHBG¹⁶.

However, as noted in a recent study⁴ we did not find a significant association between fasting insulin and SHBG level in our cohort. Furthermore, in the present study, the association between SHBG and glucose levels was independent of the HOMA-IR index suggesting that SHBG is not a simple marker of insulin-resistance and that a direct role of glucose on SHBG secretion cannot be dismissed.

Previous reports showed an inverse association between SHBG and fasting glycaemia^{17, 18} but only few studies have examined the association between SHBG and HbA1c^{19, 20}. All

these previous studies which assessed HbA1c did not adjust for visceral or intrahepatic fat content.

It has been reported that glucose may directly decrease expression of SHBG⁷ and glucose-induced lipogenesis could also directly influence hepatic production of SHBG⁸.

An inverse correlation between SHBG and abdominal fat, independently of insulin resistance has been described¹⁴. However, in the present study, the significant association between SHBG concentration and both fasting glucose and HbA1c was independent of both visceral and liver fat. A recent study showed an inverse relationship between SHBG concentration and intrahepatic fat content and supported a direct effect of SHBG on hepatic glucose production⁶. Our findings suggest therefore the role of another mechanisms and a probable direct effect of SHBG in glucose metabolism as supported by recent data from the Mendelian randomization approach. Genetic variants in the SHBG gene have been shown to affect both SHBG concentration and the risk of type 2 diabetes in a large population^{5, 6}, supporting a direct role for SHBG in the pathophysiology of hyperglycaemia.

A correlation between low SHBG and an adverse lipid profile was previously reported in large cohorts where low SHBG was related to low HDL-C and hypertriglyceridemia after adjustment for body mass index²¹. We extend this point by showing that the relationship between SHBG and lipid parameters is not altered after controlling for either visceral/intrahepatic fat or sexual steroids. This suggests the possibility of a direct role of SHBG in the regulation of lipid metabolism, independently of glucose, insulin, sexual steroids levels and fatty liver. A modulation of hepatic lipoprotein lipase activity by SHBG could explain the inverse correlation between SHBG and triglycerides. A strong negative association between SHBG levels and post-heparin hepatic lipase activity, and a lower magnitude positive association of SHBG to lipoprotein lipase activity has been shown²². Interestingly, these associations were independent from adiposity and body fat distribution²².

Hepatokines as adiponectin, Fetuin A and FGF 21 may play a role in the modulation of insulin sensitivity^{23, 24}. We observed a positive correlation between SHBG and adiponectin levels, as reported previously²⁵ but the inverse association between SHBG and glucose levels was not explained in the present study by differences in adiponectin concentration.

Fetuin-A is a glycosylated protein secreted by liver, which may play a role in the pathophysiology of type 2 diabetes through inhibition of insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of the insulin receptor. High plasma levels of fetuin-A are associated with insulin resistance and are predictive of the risk of type 2 diabetes, independently of conventional risk factors²³. Fetuin-A concentration has been shown to be increased in presence of intrahepatic fat content²⁶. Our results showed that SHBG is not related to fetuin-A levels and that this peptide does not appear to mediate the association between low SHBG, fatty liver and the increased risk of type 2 diabetes.

To our knowledge, our study is the first to describe an association between SHBG and fibroblast growth factor 21 (FGF-21). This novel peptide which is mainly expressed in liver plays an important role in liver and adipose tissue metabolism^{27, 28}. Long-term FGF-21 administration lowers blood glucose and triglycerides levels in diabetic rhesus monkeys²⁸. In humans, FGF-21 has been reported to be associated with fatty liver and free fatty acids^{29, 30}. We showed that FGF-21 appears as a determinant of SHBG concentration, independently of plasma glucose or insulin levels. Because FGF-21 has been reported to regulate lipolysis and to be related with free fatty acids³⁰, this suggests to further examining the relation between SHBG and adipose tissue metabolism.

The observation that the association between SHBG and FGF 21 was abolished after adjusting for intra-hepatic fat suggests that liver fat may regulate SHBG concentration, possibly via the modulation of FGF-21 secretion by the liver. This mechanism needs however to be specifically addressed in future studies.

SHBG binds with high affinity with androgens and oestrogens. Consequently, SHBG concentration is a key modulator of the biological action of sex steroids in target tissues³¹. Low endogenous testosterone may promote the development of insulin resistance and hyperglycaemia³². Beyond differences in body composition, a direct impact of endogenous testosterone on glucose metabolism has been supported by clinical data showing enhanced insulin resistance following sex steroid withdrawal in hypogonadic men³².

Our findings showed that the correlation between SHBG and both fasting glycaemia and HbA1c was independent of both total testosterone and estradiol in men. Studies that have addressed the interaction between SHBG, sexual steroids and glucose metabolism are scarce.

In a recent large cross-sectional study, the association between SHBG and HbA1c was abolished when total testosterone was added into the multivariate model¹⁸. These discrepancies may result from differences in age and BMI with a younger age and higher BMI in the present study. This suggests that the contribution of low SHBG to the development of hyperglycaemia may be more pronounced in young and middle-age men than in the elderly. This point deserves to be directly addressed in prospective cohorts.

A few studies have addressed the association between estradiol and HbA1c in men. An association between elevated estradiol levels and the risk of type 2 diabetes has been described³³. However, plasma estradiol concentration could be viewed as a marker of visceral adiposity with a stronger correlation with BMI and visceral adipose tissue than for total testosterone³⁴.

In the present study, we observed that endogenous estradiol did not alter the relation between SHBG and glucose levels, despite a large proportion of obese individuals. Our findings suggest therefore that increased aromatisation related to abdominal adiposity is probably not an important mechanism underlying the inverse association between SHBG and glycaemia.

Our study has potential limitations. We used HOMA-IR index as a surrogate marker of insulin resistance and we did not have clamp data to better evaluate the correlation between SHBG, FGF-21 levels and insulin sensitivity. We did not use spectroscopy to measure intrahepatic fat content. However, our method has been validated^{11, 12} and MRI is commonly used in epidemiological studies³⁵. Another limitation is the cross-sectional design, which precludes from drawing conclusions about the causal direction of the observed associations.

In summary, our findings showed that the significant association observed between SHBG and both glucose and lipids levels is not related to changes in either FGF-21 or Fetuin-A concentrations and appears to be also independent of intrahepatic and visceral fat. The novel association reported in the present study between SHBG and FGF-21 concentrations underscores possible interactions between lipolysis, intrahepatic fat, elevated FGF-21 and low SHBG levels which need to be further explored.

Legends to figures:

Fig 1: Association between SHBG quartiles and both HDL-c (A) and triglycerides (B)

Fig2: SHBG concentration according to FGF-21 quartiles

Table 1: Characteristics of the study population (mean \pm SD or median with interquartile range)

Variables	Men (n=233)	Women (n=66)
Age (years)	54.4 \pm 9.4	59.8 \pm 5.7
Waist circumference (cm)	105.7 \pm 11.8	100.5 \pm 12.6
BMI (kg/m ²)	30.8 \pm 4.7	31.8 \pm 5.6
Type 2 Diabetes (%)	71 (30.5%)	19 (28.8%)
Fasting glycaemia (mmol/l)	6.21 \pm 1.2	6.05 \pm 1.3
HbA1c (%)	6.1 \pm 0.7	6.0 \pm 0.5
HDL-C (mmol/l)	1.5 \pm 0.4	1.7 \pm 0.5
LDL-C(mmol/l)	2.8 \pm 0.9	3.3 \pm 1.1
Triglycerides (mmol/l)	1.43 (0.89-1.97)	1.42 (0.93-1.91)
Adiponectine (mg/l)	6.8 \pm 3.2	9.1 \pm 4.0
Fetuin A (μ g/ml)	470 (400-540)	450 (384-516)
FGF 21 (pg/ml)	237 (96.5-377.5)	314 (155.9-472.1)
SHBG (nmol/l)	40.5 \pm 23.5	48.8 \pm 25.3
Testosterone (nmol/l)	16.1 \pm 6.0	
17 β -estradiol (pmol/l)	76.9 \pm 30.1	

TABLE 2: Association between SHBG concentration and metabolic features after controlling for age, sex and BMI

<i>SHBG</i>		
Variables	β	P value
Fasting glycaemia	-0.23	0.0001
HbA1c	-0.30	<0.0001
Fasting insulinaemia	-0.02	0.70
HOMA-IR	-0.12	0.05
HDL-C	0.13	0.02
LDL-C	0.03	0.65
Triglycerides	-0.20	0.0008
Leptin	0.03	0.48
Adiponectin	0.09	0.11
Fetuin A	0.03	0.63
FGF-21	-0.18	0.003

Standardized β coefficients and P values from a multiple linear regression model predicting SHBG according to metabolic features after adjustment for age, sex, and BMI.

Table 3: Impact of sexual hormones on the association between SHBG and metabolic features in men

Variables	Fasting glycaemia		HbA1c		HDL-C		Triglycerides	
	β	P	β	P	β	P	β	P
Model 1	-0.23	0.0005	-0.28	<0.0001	0.15	0.02	-0.21	0.002
Model 1 + total testosterone	-0.30	0.0003	-0.34	<0.0001	0.10	0.21	-0.28	0.0006
Model 1 + E2	-0.24	0.0006	-0.28	<0.0001	0.14	0.037	-0.22	0.001

Standardized β coefficients and p values from a multiple linear regression model. A log transformation was applied for each variable.

Model 1 corresponds to adjustment for age, sex, smoking and BMI.

Table 4: Impact of visceral adipose tissue, hepatic fat content and FGF 21 on the association between SHBG and metabolic features

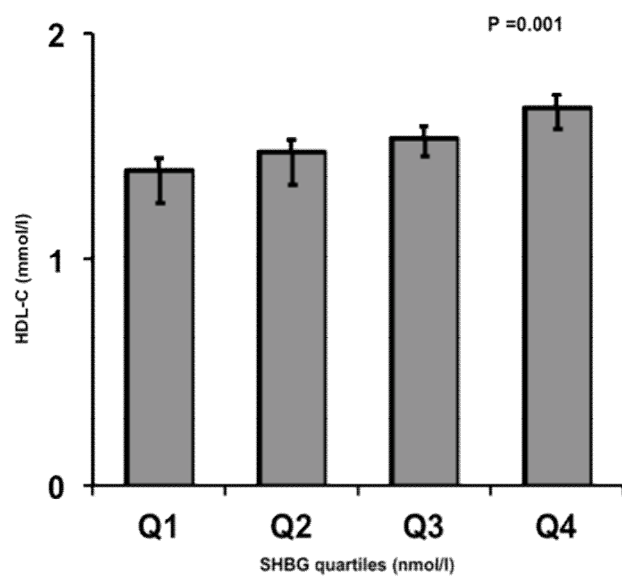
Variables	Fasting glycaemia		HbA1c		HDL-C		Triglycerides	
	β	P	β	P	β	P	β	P
Model 1	-0.23	0.0001	-0.29	<0.0001	0.13	0.02	-0.20	0.0009
Model 1 + VAT	-0.28	0.0001	-0.35	<0.0001	0.20	0.01	-0.25	0.004
Model 1 + hepatic fat	-0.15	0.08	-0.21	0.02	0.24	0.005	-0.23	0.009
Model 1 + VAT + hepatic fat	-0.15	0.10	-0.23	0.01	0.21	0.02	-0.24	0.009
Model 1 + FGF 21	-0.21	0.0006	-0.27	<0.0001	0.16	0.008	-0.18	0.002

*VAT: visceral adipose tissue

Standardized β coefficients and p values from a multiple linear regression model. A log transformation was applied for each variable.

Model 1 corresponds to adjustment for age, sex, smoking and BMI.

Figure 1A



B

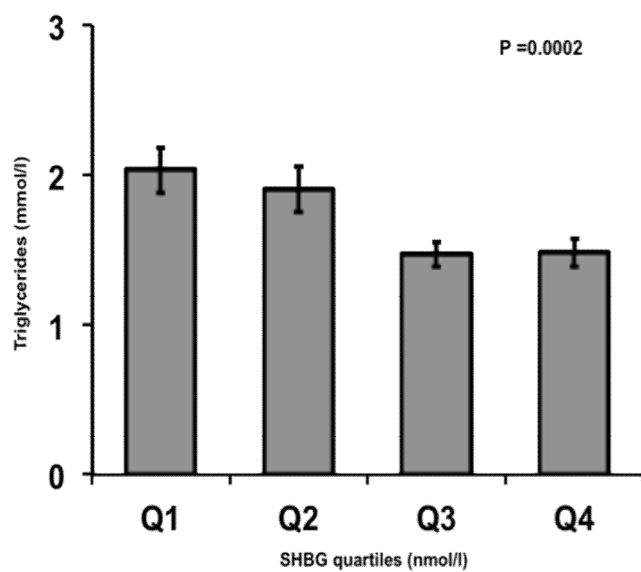
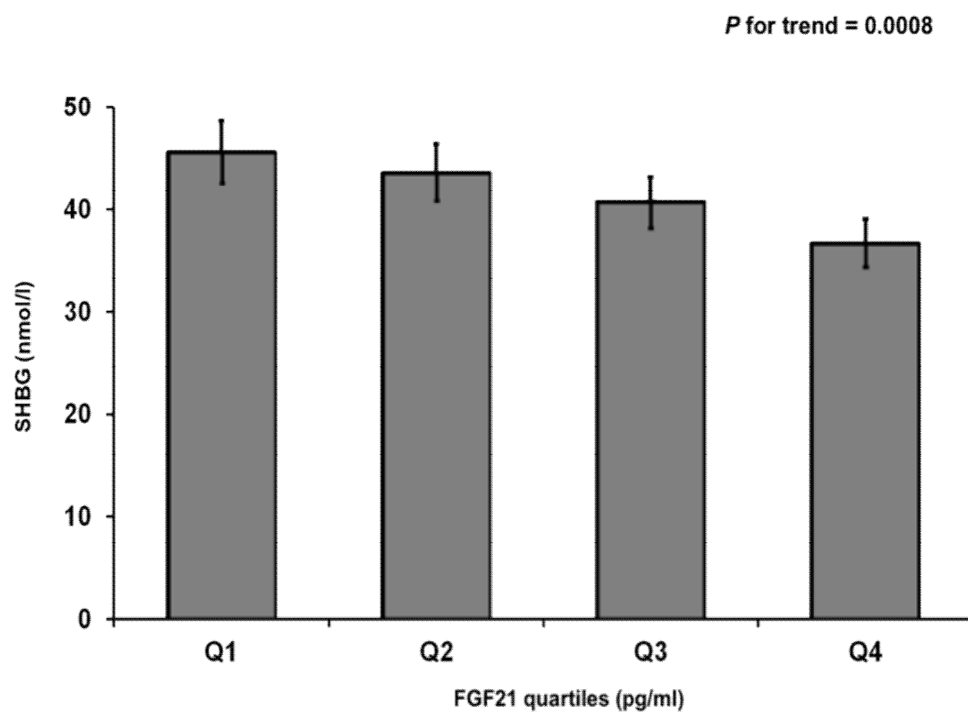


Fig 2



REFERENCES

- 1 Birkeland, K.I., Hanssen, K.F., Torjesen, P.A. & Vaaler, S. (1993) Level of sex hormone-binding globulin is positively correlated with insulin sensitivity in men with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 76, 275-278.
- 2 Ding, E.L., Song, Y., Malik, V.S. & Liu, S. (2006) Sex differences of endogenous sex hormones and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 295, 1288-1299.
- 3 Bonnet, F., Balkau, B., Malecot, J.M., Picard, P., Lange, C., Fumeron, F., Aubert, R., Raverot, V., Dechaud, H., Tichet, J., Lecomte, P. & Pugeat, M. (2009) Sex hormone-binding globulin predicts the incidence of hyperglycemia in women: interactions with adiponectin levels. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 161, 81-85.
- 4 Peter, A., Kantartzis, K., Machann, J., Schick, F., Staiger, H., Machicao, F., Schleicher, E., Fritsche, A., Haring, H.U. & Stefan, N. (2010) Relationships of circulating sex hormone-binding globulin with metabolic traits in humans. *Diabetes* 59, 3167-3173.
- 5 Ding, E.L., Song, Y., Manson, J.E., Hunter, D.J., Lee, C.C., Rifai, N., Buring, J.E., Gaziano, J.M. & Liu, S. (2009) Sex hormone-binding globulin and risk of type 2 diabetes in women and men. *N Engl J Med* 361, 1152-1163.
- 6 Perry, J.R., Weedon, M.N., Langenberg, C., Jackson, A.U., Lyssenko, V., Sparso, T., Thorleifsson, G., Grallert, H., Ferrucci, L., Maggio, M., Paolisso, G., Walker, M., Palmer, C.N., Payne, F., Young, E., Herder, C., Narisu, N., Morcken, M.A., Bonnycastle, L.L., Owen, K.R., Shields, B., Knight, B., Bennett, A., Groves, C.J., Ruukonen, A., Jarvelin, M.R., Pearson, E., Pascoe, L., Ferrannini, E., Bornstein, S.R., Stringham,

H.M., Scott, L.J., Kuusisto, J., Nilsson, P., Neptin, M., Gjesing, A.P., Pisinger, C., Lauritzen, T., Sandbaek, A., Sampson, M., Zeggini, E., Lindgren, C.M., Steinthorsdottir, V., Thorsteinsdottir, U., Hansen, T., Schwarz, P., Illig, T., Laakso, M., Stefansson, K., Morris, A.D., Groop, L., Pedersen, O., Boehnke, M., Barroso, I., Wareham, N.J., Hattersley, A.T., McCarthy, M.I. & Frayling, T.M. (2010) Genetic evidence that raised sex hormone binding globulin (SHBG) levels reduce the risk of type 2 diabetes. *Hum Mol Genet* 19, 535-544.

7 Pugeat, M., Nader, N., Hogeveen, K., Raverot, G., Dechaud, H. & Grenot, C. (2010) Sex hormone-binding globulin gene expression in the liver: drugs and the metabolic syndrome. *Mol Cell Endocrinol* 316, 53-59.

8 Selva, D.M., Hogeveen, K.N., Innis, S.M. & Hammond, G.L. (2007) Monosaccharide-induced lipogenesis regulates the human hepatic sex hormone-binding globulin gene. *J Clin Invest* 117, 3979-3987.

9 Matthews, D.R., Hosker, J.P., Rudenski, A.S., Naylor, B.A., Treacher, D.F. & Turner, R.C. (1985) Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28, 412-419.

10 Illouz, F., Roulier, V., Rod, A., Gallois, Y., Pelle, C.P., Aube, C., Rohmer, V., Ritz, P. & Ducluzeau, P.H. (2008) Distribution of adipose tissue: quantification and relationship with hepatic steatosis and vascular profiles of type 2 diabetic patients with metabolic syndrome. *Diabetes & metabolism* 34, 68-74.

11 Ducluzeau, P.H., Manchec-Poilblanc, P., Roullier, V., Cesbron, E., Lebigot, J., Bertrais, S. & Aube, C. (2010) Distribution of abdominal adipose tissue as a predictor of hepatic steatosis assessed by MRI. *Clinical radiology* 65, 695-700.

- 12 Cesbron-Metivier, E., Roullier, V., Boursier, J., Cavarro-Menard, C., Lebigot, J., Michalak, S., Cales, P. & Aube, C. (2010) Noninvasive liver steatosis quantification using MRI techniques combined with blood markers. *European journal of gastroenterology & hepatology* 22, 973-982.
- 13 Gascon, F., Valle, M., Martos, R., Ruz, F.J., Rios, R., Montilla, P. & Canete, R. (2000) Sex hormone-binding globulin as a marker for hyperinsulinemia and/or insulin resistance in obese children. *Eur J Endocrinol* 143, 85-89.
- 14 Akin, F., Bastemir, M., Alkis, E. & Kaptanoglu, B. (2009) SHBG levels correlate with insulin resistance in postmenopausal women. *Eur J Intern Med* 20, 162-167.
- 15 Plymate, S.R., Jones, R.E., Matej, L.A. & Friedl, K.E. (1988) Regulation of sex hormone binding globulin (SHBG) production in Hep G2 cells by insulin. *Steroids* 52, 339-340.
- 16 Nestler, J.E., Powers, L.P., Matt, D.W., Steingold, K.A., Plymate, S.R., Rittmaster, R.S., Clore, J.N. & Blackard, W.G. (1991) A direct effect of hyperinsulinemia on serum sex hormone-binding globulin levels in obese women with the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 72, 83-89.
- 17 Laaksonen, D.E., Niskanen, L., Punnonen, K., Nyysönen, K., Tuomainen, T.P., Salonen, R., Rauramaa, R. & Salonen, J.T. (2003) Sex hormones, inflammation and the metabolic syndrome: a population-based study. *Eur J Endocrinol* 149, 601-608.
- 18 Brand, J.S., Wareham, N.J., Dowsett, M., Folkard, E., van der Schouw, Y.T., Luben, R.N. & Khaw, K.T. (2011) Associations of endogenous testosterone and SHBG with glycated haemoglobin in middle-aged and older men. *Clin Endocrinol (Oxf)* 74, 572-578.

- 19 Fernandez-Real, J.M., Grasa, M., Casamitjana, R., Pugeat, M., Barret, C. & Ricart, W. (1999) Plasma total and glycosylated corticosteroid-binding globulin levels are associated with insulin secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 84, 3192-3196.
- 20 Svartberg, J., Jenssen, T., Sundsfjord, J. & Jorde, R. (2004) The associations of endogenous testosterone and sex hormone-binding globulin with glycosylated hemoglobin levels, in community dwelling men. The Tromso Study. *Diabetes & metabolism* 30, 29-34.
- 21 Sutton-Tyrrell, K., Wildman, R.P., Matthews, K.A., Chae, C., Lasley, B.L., Brockwell, S., Pasternak, R.C., Lloyd-Jones, D., Sowers, M.F. & Torrens, J.I. (2005) Sex-hormone-binding globulin and the free androgen index are related to cardiovascular risk factors in multiethnic premenopausal and perimenopausal women enrolled in the Study of Women Across the Nation (SWAN). *Circulation* 111, 1242-1249.
- 22 Desmeules, A., Couillard, C., Tchernof, A., Bergeron, J., Rankinen, T., Leon, A.S., Rao, D.C., Skinner, J.S., Wilmore, J.H., Despres, J.P. & Bouchard, C. (2003) Post-heparin lipolytic enzyme activities, sex hormones and sex hormone-binding globulin (SHBG) in men and women: The HERITAGE Family Study. *Atherosclerosis* 171, 343-350.
- 23 Stefan, N., Fritsche, A., Weikert, C., Boeing, H., Joost, H.G., Haring, H.U. & Schulze, M.B. (2008) Plasma fetuin-A levels and the risk of type 2 diabetes. *Diabetes* 57, 2762-2767.
- 24 Cuevas-Ramos, D., Almeda-Valdes, P., Aguilar-Salinas, C.A., Cuevas-Ramos, G., Cuevas-Sosa, A.A. & Gomez-Perez, F.J. (2009) The role of fibroblast growth factor 21 (FGF21) on energy balance, glucose and lipid metabolism. *Current diabetes reviews* 5, 216-220.

- 25 Vanbillemont, G., Lapauw, B., De Naeyer, H., Roef, G., Kaufman, J.M. & Taes, Y.E. (2012) Sex hormone-binding globulin at the crossroad of body composition, somatotrophic axis and insulin/glucose homeostasis in young healthy men. *Clinical endocrinology* 76, 111-118.
- 26 Stefan, N., Hennige, A.M., Staiger, H., Machann, J., Schick, F., Krober, S.M., Machicao, F., Fritsche, A. & Haring, H.U. (2006) Alpha2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-A is associated with insulin resistance and fat accumulation in the liver in humans. *Diabetes Care* 29, 853-857.
- 27 Badman, M.K., Pissios, P., Kennedy, A.R., Koukos, G., Flier, J.S. & Maratos-Flier, E. (2007) Hepatic fibroblast growth factor 21 is regulated by PPARalpha and is a key mediator of hepatic lipid metabolism in ketotic states. *Cell metabolism* 5, 426-437.
- 28 Kharitonkov, A., Wroblewski, V.J., Koester, A., Chen, Y.F., Clutinger, C.K., Tigno, X.T., Hansen, B.C., Shanafelt, A.B. & Etgen, G.J. (2007) The metabolic state of diabetic monkeys is regulated by fibroblast growth factor-21. *Endocrinology* 148, 774-781.
- 29 Tyynismaa, H., Raivio, T., Hakkarainen, A., Ortega-Alonso, A., Lundbom, N., Kaprio, J., Rissanen, A., Suomalainen, A. & Pietilainen, K.H. (2011) Liver fat but not other adiposity measures influence circulating FGF21 levels in healthy young adult twins. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 96, E351-355.
- 30 Reinehr, T., Woelfle, J., Wunsch, R. & Roth, C.L. (2012) Fibroblast Growth Factor 21 (FGF-21) and Its Relation to Obesity, Metabolic Syndrome, and Nonalcoholic Fatty Liver in Children: A Longitudinal Analysis. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 97, 2143-2150.

- 31 Vermeulen, A., Kaufman, J.M. & Giagulli, V.A. (1996) Influence of some biological indexes on sex hormone-binding globulin and androgen levels in aging or obese males. *J Clin Endocrinol Metab* 81, 1821-1826.
- 32 Yialamas, M.A., Dwyer, A.A., Hanley, E., Lee, H., Pitteloud, N. & Hayes, F.J. (2007) Acute sex steroid withdrawal reduces insulin sensitivity in healthy men with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 92, 4254-4259.
- 33 Vikan, T., Schirmer, H., Njolstad, I. & Svartberg, J. (2010) Low testosterone and sex hormone-binding globulin levels and high estradiol levels are independent predictors of type 2 diabetes in men. *Eur J Endocrinol* 162, 747-754.
- 34 Gautier, A., Bonnet, F., Dubois, S., Massart, C., Grosheny, C., Bachelot, A., Aube, C., Balkau, B. & Ducluzeau, P.H. (2012) Associations between visceral adipose tissue, inflammation and sex steroid concentrations in men. *Clinical endocrinology*.
- 35 Saadeh, S., Younossi, Z.M., Remer, E.M., Gramlich, T., Ong, J.P., Hurley, M., Mullen, K.D., Cooper, J.N. & Sheridan, M.J. (2002) The utility of radiological imaging in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 123, 745-750.

CHAPITRE V. CONCLUSION

En Guadeloupe, l'augmentation de la prévalence du diabète et de l'obésité constitue un problème majeur de santé publique. Ces pathologies métaboliques sont à haut risque cardiovasculaire et prédominent chez la femme. Des paramètres non classiques, comme la vitamine D et la SHBG sont décrits comme étant associés aux anomalies du métabolisme du glucose mais les mécanismes physiopathologiques de cette association sont encore mal connus.

L'analyse de ces paramètres a été retenue pour ce travail de recherche, du fait des variations du statut en vitamine D selon la pigmentation cutanée et des variations de la SHBG en fonction du sexe.

Au cours de ces études, nous avons mis en évidence les résultats suivants :

- La prévalence du déficit en vitamine D est élevée chez les sujets diabétiques de type 2 d'origine Afro-Caribéenne (42,6%) et ce malgré l'ensoleillement continu et l'intensité des rayons ultra-violet B (UVB) dans le département de la Guadeloupe. Le rôle de la barrière mélanique aux UVB peut expliquer en partie, la diminution des concentrations de la vitamine D chez les sujets à la peau foncée.
- Ce déficit en vitamine D est associé aux facteurs de risque cardiovasculaire (obésité et dyslipidémie) dans cette même population mais aussi chez les sujets en insuffisance rénale chronique et dialysés (diabète, obésité). Ainsi, le statut vitaminique D pourrait être un paramètre d'intérêt dans ces populations à haut risque cardiovasculaire.
- Chez les sujets Afro-Caribéens (AC) diabétiques mais aussi chez les sujets AC témoins sains, le statut en vitamine D est associé à certains polymorphismes de gènes codant son récepteur (*VDR*), sa protéine de transport (*GC*) et certaines enzymes impliquées dans son métabolisme (*NADSYN1*).
- Chez des sujets témoins sains (non diabétiques), les polymorphismes de *GC* et *NADSYN1* sont également associés à la dyslipidémie indépendamment de l'IMC ou du statut en vitamine D. Des polymorphismes de *GC* sont également associés à l'obésité chez les

sujets sans dyslipidémie alors que des polymorphismes de *NADSYN1* sont associés au surpoids en présence d'une dyslipidémie. Ces résultats sont en faveur d'une interaction possible entre les paramètres lipidiques et les polymorphismes de *NADSYN1* impliqués dans la synthèse du cholestérol.

- Chez les sujets dialysés comme chez les témoins sains, le déficit vitaminique D était plus fréquent chez la femme que chez l'homme. La relation entre les polymorphismes de *GC* et le surpoids présente chez la femme, n'était pas retrouvée chez l'homme. L'implication d'autres paramètres tels que les stéroïdes sexuels ou leur transporteur SHBG, pourrait être envisagée dans cette association.

En définitive, le déficit en vitamine D est associé à différentes pathologies chroniques comme le diabète, l'obésité, l'hypertension artérielle mais aussi à certaines pathologies auto-immunes et cancéreuses. Les polymorphismes des gènes *VDR*, *GC* et *NADSYN1* sont associés au statut en vitamine D dans notre étude. Ils pourraient donc influencer la réponse thérapeutique à la substitution vitaminique D chez ces sujets et jouer un rôle dans les mécanismes étiologiques des pathologies chroniques liées au déficit en vitamine D.

Dans la deuxième partie de notre travail de recherche qui concernait une population de sujets dysmétaboliques, nous avons mis en évidence :

- Une association inverse entre les concentrations de la SHBG et du glucose mais aussi de l'HbA1C.
- Une association inverse entre les concentrations de SHBG et de triglycérides indépendamment de l'âge et du tour de taille.
- Une augmentation des concentrations de HDL-CT avec les quartiles de SHBG.
- Une association entre les concentrations de SHBG et celles de l'adiponectine et du FGF-21 (hépatokine impliquée dans la régulation de la lipolyse).

- L'absence de relation entre les concentrations de SHBG, la graisse viscérale, la graisse intrahépatique et les concentrations de Fétuin A.

En définitive, les concentrations de SHBG sont associées aux paramètres du métabolisme glucidique et lipidique, indépendamment de l'index HOMA, de la graisse viscérale ou hépatique.

Dans cette étude, cette relation était indépendante des stéroïdes sexuels.

Au vu des résultats de nos travaux, des études d'intervention pourraient permettre de confirmer l'impact des variations des concentrations de la vitamine D ou de la SHBG sur le profil cardiométabolique.

CHAPITRE VI. PERSPECTIVE

Les données de la littérature et les résultats de nos travaux soulignent le rôle majeur de la vitamine D dans le métabolisme hydrocarboné et comme facteur de risque cardiovasculaire potentiel dans la population Afro-Caribéenne de Guadeloupe. Malgré l'ensoleillement continu dans notre région, le déficit et l'insuffisance en vitamine D ont une prévalence non négligeable. Au vu des complications liées à ces anomalies, il nous semble indispensable de poursuivre nos travaux sur cette thématique de la vitamine D. Une étude est prévue afin de compléter nos travaux précédents. Elle concernera l'évaluation de la supplémentation en Cholécalférol chez des sujets diabétiques de type 2 déficitaires en vitamine D et l'influence des polymorphismes des gènes codant pour le VDR et la protéine de transport DBP.

VI.1 Evaluation de la supplémentation en Cholécalférol chez des sujets diabétiques de type 2 déficitaires en vitamine D et influence des polymorphismes des gènes codant pour le VDR et la protéine de transport DBP

VI.2 Justification de l'étude et objectifs

Au vu des résultats de nos études dans un échantillon de la population de sujets diabétiques de type 2 en Guadeloupe (399), nous pensons que les concentrations basses de 25(OH)D pourraient expliquer en partie, l'augmentation du risque cardiovasculaire dans cette population.

Chez ces sujets, la prévalence et l'incidence élevées du diabète pourraient être favorisées par une fréquence plus élevée du déficit en vitamine D.

Les polymorphismes des gènes codant pour le VDR ou pour la protéine de transport de la vitamine D pourraient être impliqués dans la résistance à la supplémentation vitaminique D chez certains sujets.

La réflexion autour du dosage systématique de la vitamine D chez ces sujets a été menée tout comme l'intérêt d'un dépistage systématique de certains polymorphismes génétiques en cas de non réponse à la supplémentation vitaminique D.

L'objectif principal de ce travail est d'évaluer l'effet du traitement par la vitamine D3 sur les concentrations de la 25(OH) D, sur le profil métabolique et cardiovasculaire de sujets diabétiques de type 2. Les objectifs secondaires sont de déterminer le taux de résistance à la supplémentation vitaminique D et d'analyser les relations entre la réponse thérapeutique des sujets et les polymorphismes génétiques du VDR et de la DBP dont ils sont porteurs.

Pour cela nous avons décidé de mettre en place une étude prospective au sein du service de diabétologie du CHU de Pointe-à-Pitre, pour évaluer l'apport du Cholécalférol chez des sujets diabétiques de type 2 et déficitaires en vitamine D.

VI.3 Patients et méthodes

Cette étude concerne des sujets diabétiques de type 2, Afro-Caribéen avec une pigmentation cutanée foncée et déficitaires en vitamine D.

Les critères d'exclusion de l'étude sont les suivants : le refus de participation, les patients âgés de moins de 40 ans ou de plus de 70 ans , les sujets ayant une contre-indication au traitement par la vitamine D, l'hypersensibilité connue à la vitamine D, l'hypercalcémie, l'hypercalciurie, les antécédents de lithiase calcique, l'existence de pathologies associées à des anomalies vitaminiques D (insuffisance rénale, cancer, maladies auto immunes, infection par le VIH), les sujets diabétiques de type 1, les sujets diabétiques de type 2 traités par insuline, les sujets recevant un traitement par la Vitamine D, les femmes enceintes, les majeurs sous tutelle.

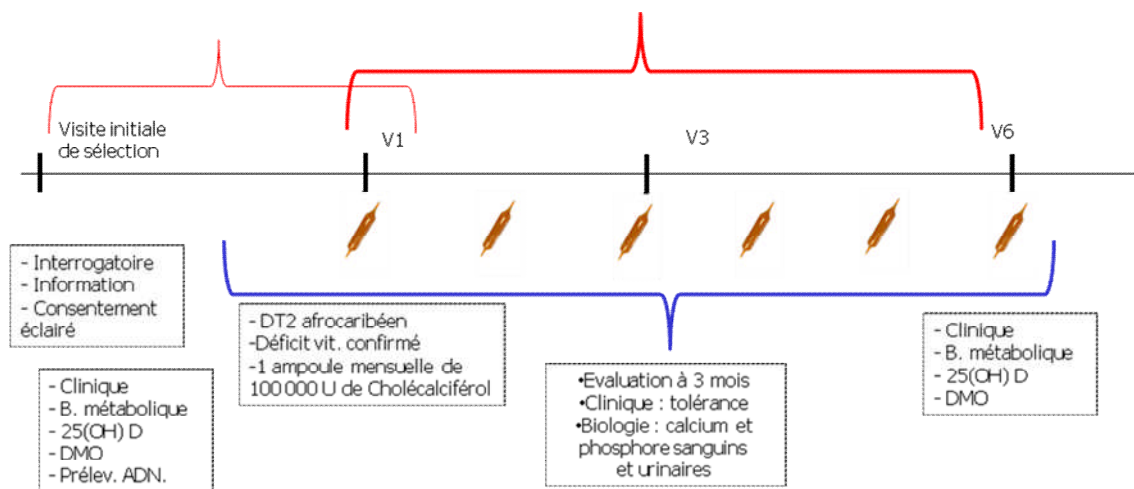
L'étude a récemment débuté dans le service de diabétologie-endocrinologie du CHU de Pointe-à-Pitre. Lors d'une visite initiale, elle est expliquée aux patients avec remise de la note d'information et du consentement éclairé.

Après signature du consentement éclairé et avant l'administration de la vitamine D3, une prise de sang est réalisée à jeun pour les dosages de glycémie et insulïnémie à jeun, cholestérol total, HDL-CT et LDL-CT, triglycérides, 25(OH)D, calcium, phosphore, albumine, PTH, créatinine, HBA1C et hémoglobine. Les dosages de la calciurie et de la phosphaturie sont réalisés sur un échantillon

d'urine. 2 tubes EDTA de 5 ml de sérum sont conservés pour l'extraction de l'ADN et l'analyse secondaire des polymorphismes sélectionnés (polymorphismes du *VDR* et de *DBP* étudiés dans nos travaux précédents).

Les paramètres cliniques, les éléments concernant les habitudes alimentaires (questionnaire GRIO du groupe de recherche sur les ostéoporoses, pour l'évaluation de l'apport alimentaire en calcium et vitamine D), l'évaluation de l'activité physique sont colligés. La tolérance clinique est évaluée de façon mensuelle par téléphone. Une évaluation clinique et phosphocalcique est prévue après le 3^{ème} mois pour juger de l'absence d'effets indésirables ou de signes de surdosage en vitamine D. Le bilan de fin d'étude, après 6 mois de traitement, inclut un interrogatoire, une évaluation clinique physique et une exploration biologique similaire au bilan initial excepté le prélèvement d'ADN.

Le schéma de l'étude est résumé par la figure ci-dessous:



La vitamine D3 est prescrite sous la forme orale d'une ampoule de 100 000 unités d'Uvédose® par mois pendant 6 mois.

VI.4 Financement et aspect légal

Pour la réalisation de ce projet, l'équipe de recherche a reçu un avis favorable du ministère de l'outre-mer pour un financement de l'ordre de 22 700 euros. Un financement complémentaire de 15 000 euros a été accordé par le CHU de Pointe-à-Pitre. Après signature du consentement éclairé, les sujets ont été informés que la durée de stockage et d'utilisation des prélèvements biologiques est prévue pour 10 ans après la clôture de l'étude. Au cas où une prolongation apparaîtrait souhaitable, leur consentement sera expressément demandé. Après l'étude, le matériel restant sera détruit ou retourné à la collection centrale, pour éviter que tout matériel génétique ne soit archivé en un autre site que ceux prévus à cet usage.

VII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*. 2004 May;27(5):1047-53.
2. Bringer J, Fontaine P, Detournay B, Nachit-Ouinekh F, Bami G, Eschwege E. Prevalence of diagnosed type 2 diabetes mellitus in the French general population: the INSTANT study. *Diabetes Metab*. 2009 Feb;35(1):25-31.
3. Atallah A, Inamo J, Lang T, Larabi L, Chatellier G, Rozet JE, et al. [Prevalence of hypertension in a disadvantaged population in Antilles: a major role for obesity?]. *Arch Mal Coeur Vaiss*. 2007 Jan;100(1):22-7.
4. Cancela L, Nemere I, Norman AW. 1 alpha,25(OH)₂ vitamin D₃: a steroid hormone capable of producing pleiotropic receptor-mediated biological responses by both genomic and nongenomic mechanisms. *J Steroid Biochem*. 1988;30(1-6):33-9.
5. Berger U, Wilson P, McClelland RA, Colston K, Haussler MR, Pike JW, et al. Immunocytochemical detection of 1,25-dihydroxyvitamin D receptors in normal human tissues. *J Clin Endocrinol Metab*. 1988 Sep;67(3):607-13.
6. Oh JY, Barrett-Connor E, Wedick NM, Wingard DL. Endogenous sex hormones and the development of type 2 diabetes in older men and women: the Rancho Bernardo study. *Diabetes Care*. 2002 Jan;25(1):55-60.
7. Ding EL, Song Y, Malik VS, Liu S. Sex differences of endogenous sex hormones and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*. 2006 Mar 15;295(11):1288-99.
8. Wang TJ, Pencina MJ, Booth SL, Jacques PF, Ingelsson E, Lanier K, et al. Vitamin D deficiency and risk of cardiovascular disease. *Circulation*. 2008 Jan 29;117(4):503-11.
9. Scragg R, Holdaway I, Singh V, Metcalf P, Baker J, Dryson E. Serum 25-hydroxyvitamin D₃ levels decreased in impaired glucose tolerance and diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract*. 1995 Mar;27(3):181-8.
10. Signorello LB, Shi J, Cai Q, Zheng W, Williams SM, Long J, et al. Common variation in vitamin D pathway genes predicts circulating 25-hydroxyvitamin D Levels among African Americans. *PLoS One*. 2011;6(12):e28623.

11. Laaksonen DE, Niskanen L, Punnonen K, Nyysönen K, Tuomainen TP, Valkonen VP, et al. Testosterone and sex hormone-binding globulin predict the metabolic syndrome and diabetes in middle-aged men. *Diabetes Care*. 2004 May;27(5):1036-41.
12. Tchernof A, Toth MJ, Poehlman ET. Sex hormone-binding globulin levels in middle-aged premenopausal women. Associations with visceral obesity and metabolic profile. *Diabetes Care*. 1999 Nov;22(11):1875-81.
13. Nestler JE, Powers LP, Matt DW, Steingold KA, Plymate SR, Rittmaster RS, et al. A direct effect of hyperinsulinemia on serum sex hormone-binding globulin levels in obese women with the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 1991 Jan;72(1):83-9.
14. Stefan N, Schick F, Haring HU. Sex hormone-binding globulin and risk of type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2009 Dec 31;361(27):2675-6; author reply 7-8.
15. Sun Q, Cornelis MC, Manson JE, Hu FB. Plasma Levels of Fetuin-A and Hepatic Enzymes and Risk of Type 2 Diabetes in Women in the U.S. *Diabetes*. 2012 Aug 24.
16. Mellanby E. An experimental investigation on rickets. 1919. *Nutrition*. 1989 Mar-Apr;5(2):81-6; discussion 7.
17. McCollum EV, Pitz W, Simmonds N, Becker JE, Shipley PG, Bunting RW. The effect of additions of fluorine to the diet of the rat on the quality of the teeth. 1925. *Studies on experimental rickets. XXI. An experimental demonstration of the existence of a vitamin which promotes calcium deposition*. 1922. The effect of additions of fluorine to the diet of the rat on the quality of the teeth. 1925. *J Biol Chem*. 2002 May 10;277(19):E8.
18. The Vitamin Theory in Rickets. *Br Med J*. 1922 Jan 7;1(3184):20-1.
19. Heaton TB. On the Vitamin D. *Biochem J*. 1922;16(6):800-8.
20. Hess AF. On the Induction of Antirachitic Properties in Rations by Exposure to Light. *Science*. 1924 Sep 19;60(1551):269.
21. Hess AF. The Prevention and Cure of Rickets by Sunlight. *Am J Public Health (N Y)*. 1922 Feb;12(2):104-7.
22. Hess AF, Unger LJ, Pappenheimer AM. Experimental Rickets in Rats : Vii. The Prevention of Rickets by Sunlight, by the Rays of the Mercury Vapor Lamp, and by the Carbon Arc Lamp. *J Exp Med*. 1922 Sep 30;36(4):427-46.
23. Steenbock H. The Induction of Growth Promoting and Calcifying Properties in a Ration by Exposure to Light. *Science*. 1924 Sep 5;60(1549):224-5.
24. Askew FA, Bourdillon RB, Webster TA. The production of vitamin D in a glow discharge. *Biochem J*. 1932;26(3):814.
25. Wolf G. The discovery of vitamin D: the contribution of Adolf Windaus. *J Nutr*. 2004 Jun;134(6):1299-302.
26. Darwish HM, DeLuca HF. Analysis of binding of the 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor to positive and negative vitamin D response elements. *Arch Biochem Biophys*. 1996 Oct 15;334(2):223-34.
27. Darwish HM, DeLuca HF. Recent advances in the molecular biology of vitamin D action. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 1996;53:321-44.
28. Reddy GS, Tserng KY. Calcitroic acid, end product of renal metabolism of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ through C-24 oxidation pathway. *Biochemistry*. 1989 Feb 21;28(4):1763-9.
29. Okano T, Yasumura M, Mizuno K, Kobayashi T. In vivo and in vitro conversion of 7-dehydrocholesterol into vitamin D₃ in rat skin by ultraviolet ray's irradiation. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 1978;24(1):47-56.
30. Tian XQ, Chen TC, Matsuoka LY, Wortsman J, Holick MF. Kinetic and thermodynamic studies of the conversion of previtamin D₃ to vitamin D₃ in human skin. *J Biol Chem*. 1993 Jul 15;268(20):14888-92.
31. Holick MF, MacLaughlin JA, Clark MB, Holick SA, Potts JT, Jr., Anderson RR, et al. Photosynthesis of previtamin D₃ in human skin and the physiologic consequences. *Science*. 1980 Oct 10;210(4466):203-5.

32. Holick MF, Tian XQ, Allen M. Evolutionary importance for the membrane enhancement of the production of vitamin D₃ in the skin of poikilothermic animals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Apr 11;92(8):3124-6.
33. Haddad JG, Matsuoka LY, Hollis BW, Hu YZ, Wortsman J. Human plasma transport of vitamin D after its endogenous synthesis. *J Clin Invest*. 1993 Jun;91(6):2552-5.
34. Holick MF, MacLaughlin JA, Doppelt SH. Regulation of cutaneous previtamin D₃ photosynthesis in man: skin pigment is not an essential regulator. *Science*. 1981 Feb 6;211(4482):590-3.
35. Webb AR, DeCosta BR, Holick MF. Sunlight regulates the cutaneous production of vitamin D₃ by causing its photodegradation. *J Clin Endocrinol Metab*. 1989 May;68(5):882-7.
36. Lehmann B, Meurer M. Vitamin D metabolism. *Dermatol Ther*. 2010 Jan-Feb;23(1):2-12.
37. Holick MF, Chen TC, Lu Z, Sauter E. Vitamin D and skin physiology: a D-lightful story. *J Bone Miner Res*. 2007 Dec;22 Suppl 2:V28-33.
38. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med*. 2007 Jul 19;357(3):266-81.
39. Glerup H, Mikkelsen K, Poulsen L, Hass E, Overbeck S, Thomsen J, et al. Commonly recommended daily intake of vitamin D is not sufficient if sunlight exposure is limited. *J Intern Med*. 2000 Feb;247(2):260-8.
40. Harris SS, Soteriades E, Coolidge JA, Mudgal S, Dawson-Hughes B. Vitamin D insufficiency and hyperparathyroidism in a low income, multiracial, elderly population. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000 Nov;85(11):4125-30.
41. Munro I. Derivation of tolerable upper intake levels of nutrients. *Am J Clin Nutr*. 2001 Dec;74(6):865-7.
42. Vieth R. Why the optimal requirement for Vitamin D₃ is probably much higher than what is officially recommended for adults. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2004 May;89-90(1-5):575-9.
43. Brown AJ, Dusso A, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol*. 1999 Aug;277(2 Pt 2):F157-75.
44. Werck-Reichhart D, Feyereisen R. Cytochromes P450: a success story. *Genome Biol*. 2000;1(6):REVIEWS3003.
45. Cheng JB, Levine MA, Bell NH, Mangelsdorf DJ, Russell DW. Genetic evidence that the human CYP2R1 enzyme is a key vitamin D 25-hydroxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 May 18;101(20):7711-5.
46. Prosser DE, Jones G. Enzymes involved in the activation and inactivation of vitamin D. *Trends Biochem Sci*. 2004 Dec;29(12):664-73.
47. 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 Jan;27(1):100-11.
48. Souberbielle JC, Prie D, Courbebaisse M, Friedlander G, Houillier P, Maruani G, et al. [Update on vitamin D and evaluation of vitamin D status]. *Ann Endocrinol (Paris)*. 2008 Dec;69(6):501-10.
49. Holick MF. The cutaneous photosynthesis of previtamin D₃: a unique photoendocrine system. *J Invest Dermatol*. 1981 Jul;77(1):51-8.
50. Stamp TC, Haddad JG, Twigg CA. Comparison of oral 25-hydroxycholecalciferol, vitamin D, and ultraviolet light as determinants of circulating 25-hydroxyvitamin D. *Lancet*. 1977 Jun 25;1(8026):1341-3.
51. Speeckaert M, Huang G, Delanghe JR, Taes YE. Biological and clinical aspects of the vitamin D binding protein (Gc-globulin) and its polymorphism. *Clin Chim Acta*. 2006 Oct;372(1-2):33-42.
52. Haddad JG, Hillman L, Rojanasathit S. Human serum binding capacity and affinity for 25-hydroxyergocalciferol and 25-hydroxycholecalciferol. *J Clin Endocrinol Metab*. 1976 Jul;43(1):86-91.

53. Ghazarian JG, Jefcoate CR, Knutson JC, Orme-Johnson WH, DeLuca HF. Mitochondrial cytochrome p450. A component of chick kidney 25-hydrocholecalciferol-1 α -hydroxylase. *J Biol Chem.* 1974 May 25;249(10):3026-33.
54. Fraser DR, Kodicek E. Unique biosynthesis by kidney of a biological active vitamin D metabolite. *Nature.* 1970 Nov 21;228(5273):764-6.
55. Takeyama K, Kitanaka S, Sato T, Kobori M, Yanagisawa J, Kato S. 25-Hydroxyvitamin D3 1 α -hydroxylase and vitamin D synthesis. *Science.* 1997 Sep 19;277(5333):1827-30.
56. Shinki T, Shimada H, Wakino S, Anazawa H, Hayashi M, Saruta T, et al. Cloning and expression of rat 25-hydroxyvitamin D3-1 α -hydroxylase cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Nov 25;94(24):12920-5.
57. Monkawa T, Yoshida T, Wakino S, Shinki T, Anazawa H, Deluca HF, et al. Molecular cloning of cDNA and genomic DNA for human 25-hydroxyvitamin D3 1 α -hydroxylase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997 Oct 20;239(2):527-33.
58. Adams JS, Hewison M. Extrarenal expression of the 25-hydroxyvitamin D-1-hydroxylase. *Arch Biochem Biophys.* 2012 Jul 1;523(1):95-102.
59. Gray RW, Caldas AE, Wilz DR, Lemann J, Jr., Smith GA, DeLuca HF. Metabolism and excretion of 3H-1,25-(OH)₂-vitamin D3 in healthy adults. *J Clin Endocrinol Metab.* 1978 May;46(5):756-65.
60. Cooke NE, Haddad JG. Vitamin D binding protein (Gc-globulin). *Endocr Rev.* 1989 Aug;10(3):294-307.
61. Cooke NE, Willard HF, David EV, George DL. Direct regional assignment of the gene for vitamin D binding protein (Gc-globulin) to human chromosome 4q11-q13 and identification of an associated DNA polymorphism. *Hum Genet.* 1986 Jul;73(3):225-9.
62. Abbas SK, Care AD, Van Baelen H, Bouillon R. Plasma vitamin D-binding protein and free 1,25-dihydroxyvitamin D3 index in pregnant ewes and their fetuses in the last month of gestation. *J Endocrinol.* 1987 Oct;115(1):7-12.
63. Nykjaer A, Dragun D, Walther D, Vorum H, Jacobsen C, Herz J, et al. An endocytic pathway essential for renal uptake and activation of the steroid 25-(OH) vitamin D3. *Cell.* 1999 Feb 19;96(4):507-15.
64. Nykjaer A, Fyfe JC, Kozyraki R, Leheste JR, Jacobsen C, Nielsen MS, et al. Cubilin dysfunction causes abnormal metabolism of the steroid hormone 25(OH) vitamin D(3). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Nov 20;98(24):13895-900.
65. Birn H, Vorum H, Verroust PJ, Moestrup SK, Christensen EI. Receptor-associated protein is important for normal processing of megalin in kidney proximal tubules. *J Am Soc Nephrol.* 2000 Feb;11(2):191-202.
66. Liu W, Yu WR, Carling T, Juhlin C, Rastad J, Ridefelt P, et al. Regulation of gp330/megalyn expression by vitamins A and D. *Eur J Clin Invest.* 1998 Feb;28(2):100-7.
67. Leheste JR, Melsen F, Wellner M, Jansen P, Schlichting U, Renner-Muller I, et al. Hypocalcemia and osteopathy in mice with kidney-specific megalin gene defect. *FASEB J.* 2003 Feb;17(2):247-9.
68. Gacad MA, Chen H, Arbelle JE, LeBon T, Adams JS. Functional characterization and purification of an intracellular vitamin D-binding protein in vitamin D-resistant new world primate cells. Amino acid sequence homology with proteins in the hsp-70 family. *J Biol Chem.* 1997 Mar 28;272(13):8433-40.
69. Makin G, Lohnes D, Byford V, Ray R, Jones G. Target cell metabolism of 1,25-dihydroxyvitamin D3 to calcitroic acid. Evidence for a pathway in kidney and bone involving 24-oxidation. *Biochem J.* 1989 Aug 15;262(1):173-80.
70. Masuda S, Byford V, Arabian A, Sakai Y, Demay MB, St-Arnaud R, et al. Altered pharmacokinetics of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 and 25-hydroxyvitamin D3 in the blood and tissues of the 25-hydroxyvitamin D-24-hydroxylase (Cyp24a1) null mouse. *Endocrinology.* 2005 Feb;146(2):825-34.

71. Ishizuka S, Norman AW. Metabolic pathways from 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ to 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D₃-26,23-lactone. Stereo-retained and stereo-selective lactonization. *J Biol Chem.* 1987 May 25;262(15):7165-70.
72. Ishizuka S, Kurihara N, Hakeda S, Maeda N, Ikeda K, Kumegawa M, et al. 1 alpha,25-Dihydroxyvitamin D₃[1 alpha,25-(OH)₂D₃]-26,23-lactone inhibits 1,25-(OH)₂D₃-mediated fusion of mouse bone marrow mononuclear cells. *Endocrinology.* 1988 Aug;123(2):781-6.
73. Brumbaugh PF, Haussler MR. Specific binding of 1alpha,25-dihydroxycholecalciferol to nuclear components of chick intestine. *J Biol Chem.* 1975 Feb 25;250(4):1588-94.
74. Zou A, Elgort MG, Allegretto EA. Retinoid X receptor (RXR) ligands activate the human 25-hydroxyvitamin D₃-24-hydroxylase promoter via RXR heterodimer binding to two vitamin D-responsive elements and elicit additive effects with 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *J Biol Chem.* 1997 Jul 25;272(30):19027-34.
75. Nemere I, Schwartz Z, Pedrozo H, Sylvia VL, Dean DD, Boyan BD. Identification of a membrane receptor for 1,25-dihydroxyvitamin D₃ which mediates rapid activation of protein kinase C. *J Bone Miner Res.* 1998 Sep;13(9):1353-9.
76. Jurutka PW, Bartik L, Whitfield GK, Mathern DR, Barthel TK, Gurevich M, et al. Vitamin D receptor: key roles in bone mineral pathophysiology, molecular mechanism of action, and novel nutritional ligands. *J Bone Miner Res.* 2007 Dec;22 Suppl 2:V2-10.
77. Silver J, Naveh-Manly T, Mayer H, Schmelzer HJ, Popovtzer MM. Regulation by vitamin D metabolites of parathyroid hormone gene transcription in vivo in the rat. *J Clin Invest.* 1986 Nov;78(5):1296-301.
78. Aurbach GD. Biosynthesis, secretion and mechanism of action of parathyroid hormone. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 1974;85:78-99.
79. Hoenderop JG, Nilius B, Bindels RJ. Calcium absorption across epithelia. *Physiol Rev.* 2005 Jan;85(1):373-422.
80. Jeung EB, Krisinger J, Dann JL, Leung PC. Molecular cloning of the full-length cDNA encoding the human calbindin-D9k. *FEBS Lett.* 1992 Jul 28;307(2):224-8.
81. Jeung EB, Leung PC, Krisinger J. The human calbindin-D9k gene. Complete structure and implications on steroid hormone regulation. *J Mol Biol.* 1994 Jan 28;235(4):1231-8.
82. Seifert MF, Gray RW, Bruns ME. Elevated levels of vitamin D-dependent calcium-binding protein (calbindin-D9k) in the osteosclerotic (oc) mouse. *Endocrinology.* 1988 Mar;122(3):1067-73.
83. Darwish HM, DeLuca HF. 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.* 1992 Jan 15;89(2):603-7.
84. Lee GS, Jung EM, Choi KC, Oh GT, Jeung EB. Compensatory induction of the TRPV6 channel in a calbindin-D9k knockout mouse: Its regulation by 1,25-hydroxyvitamin D₃. *J Cell Biochem.* 2009 Dec 1;108(5):1175-83.
85. White KE, Biber J, Murer H, Econs MJ. Chromosomal localization of two human genes involved in phosphate homeostasis: the type IIb sodium-phosphate cotransporter and stanniocalcin-2. *Somat Cell Mol Genet.* 1998 Nov;24(6):357-62.
86. Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005 Jul;289(1):F8-28.
87. Kooh SW, Fraser D, DeLuca HF, Holick MF, Belsey RE, Clark MB, et al. Treatment of hypoparathyroidism and pseudohypoparathyroidism with metabolites of vitamin D: evidence for impaired conversion of 25-hydroxyvitamin D to 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D. *N Engl J Med.* 1975 Oct 23;293(17):840-4.
88. Chan JC, Young RB, Hartenberg MA, Chinchilli VM. Calcium and phosphate metabolism in children with idiopathic hypoparathyroidism or pseudohypoparathyroidism: effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *J Pediatr.* 1985 Mar;106(3):421-6.
89. van de Graaf SF, Hoenderop JG, Bindels RJ. Regulation of TRPV5 and TRPV6 by associated proteins. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2006 Jun;290(6):F1295-302.

90. Visser M, Deeg DJ, Lips P. Low vitamin D and high parathyroid hormone levels as determinants of loss of muscle strength and muscle mass (sarcopenia): the Longitudinal Aging Study Amsterdam. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003 Dec;88(12):5766-72.
91. Sato Y, Iwamoto J, Kanoko T, Satoh K. Low-dose vitamin D prevents muscular atrophy and reduces falls and hip fractures in women after stroke: a randomized controlled trial. *Cerebrovasc Dis.* 2005;20(3):187-92.
92. Christensen AT, Ostergard T, Andersen V. Severe impaired deambulation in a patient with vitamin D and mineral deficiency due to exocrine pancreatic insufficiency. *JOP.* 2011 Sep;12(5):482-4.
93. Capiati DA, Vazquez G, Boland RL. Protein kinase C alpha modulates the Ca²⁺ influx phase of the Ca²⁺ response to 1alpha,25-dihydroxy-vitamin-D3 in skeletal muscle cells. *Horm Metab Res.* 2001 Apr;33(4):201-6.
94. Dobnig H, Pilz S, Schrnagl H, Renner W, Seelhorst U, Wellnitz B, et al. Independent association of low serum 25-hydroxyvitamin d and 1,25-dihydroxyvitamin d levels with all-cause and cardiovascular mortality. *Arch Intern Med.* 2008 Jun 23;168(12):1340-9.
95. Pilz S, Marz W, Wellnitz B, Seelhorst U, Fahrleitner-Pammer A, Dimai HP, et al. Association of vitamin D deficiency with heart failure and sudden cardiac death in a large cross-sectional study of patients referred for coronary angiography. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008 Oct;93(10):3927-35.
96. Tishkoff DX, Nibbelink KA, Holmberg KH, Dandu L, Simpson RU. Functional vitamin D receptor (VDR) in the t-tubules of cardiac myocytes: VDR knockout cardiomyocyte contractility. *Endocrinology.* 2008 Feb;149(2):558-64.
97. Green JJ, Robinson DA, Wilson GE, Simpson RU, Westfall MV. Calcitriol modulation of cardiac contractile performance via protein kinase C. *J Mol Cell Cardiol.* 2006 Aug;41(2):350-9.
98. Cardus A, Parisi E, Gallego C, Aldea M, Fernandez E, Valdivielso JM. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 stimulates vascular smooth muscle cell proliferation through a VEGF-mediated pathway. *Kidney Int.* 2006 Apr;69(8):1377-84.
99. Nibbelink KA, Tishkoff DX, Hershey SD, Rahman A, Simpson RU. 1,25(OH)₂-vitamin D3 actions on cell proliferation, size, gene expression, and receptor localization, in the HL-1 cardiac myocyte. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2007 Mar;103(3-5):533-7.
100. O'Connell TD, Berry JE, Jarvis AK, Somerman MJ, Simpson RU. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 regulation of cardiac myocyte proliferation and hypertrophy. *Am J Physiol.* 1997 Apr;272(4 Pt 2):H1751-8.
101. Pfeifer M, Begerow B, Minne HW, Nachtigall D, Hansen C. Effects of a short-term vitamin D(3) and calcium supplementation on blood pressure and parathyroid hormone levels in elderly women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 Apr;86(4):1633-7.
102. Zittermann A, Schleithoff SS, Tenderich G, Berthold HK, Korfer R, Stehle P. Low vitamin D status: a contributing factor in the pathogenesis of congestive heart failure? *J Am Coll Cardiol.* 2003 Jan 1;41(1):105-12.
103. Li YC, Kong J, Wei M, Chen ZF, Liu SQ, Cao LP. 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system. *J Clin Invest.* 2002 Jul;110(2):229-38.
104. Zhou C, Lu F, Cao K, Xu D, Goltzman D, Miao D. Calcium-independent and 1,25(OH)₂D₃-dependent regulation of the renin-angiotensin system in 1alpha-hydroxylase knockout mice. *Kidney Int.* 2008 Jul;74(2):170-9.
105. Pilz S, Tomaschitz A, Ritz E, Pieber TR. Vitamin D status and arterial hypertension: a systematic review. *Nat Rev Cardiol.* 2009 Oct;6(10):621-30.
106. Monkawa T, Yoshida T, Hayashi M, Saruta T. Identification of 25-hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase gene expression in macrophages. *Kidney Int.* 2000 Aug;58(2):559-68.
107. Saggese G, Federico G, Balestri M, Toniolo A. Calcitriol inhibits the PHA-induced production of IL-2 and IFN-gamma and the proliferation of human peripheral blood leukocytes

- while enhancing the surface expression of HLA class II molecules. *J Endocrinol Invest.* 1989 May;12(5):329-35.
108. Mathieu C, Waer M, Laureys J, Rutgeerts O, Bouillon R. Prevention of autoimmune diabetes in NOD mice by 1,25 dihydroxyvitamin D3. *Diabetologia.* 1994 Jun;37(6):552-8.
 109. Hypponen E, Laara E, Reunanen A, Jarvelin MR, Virtanen SM. Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study. *Lancet.* 2001 Nov 3;358(9292):1500-3.
 110. Lemire JM, Ince A, Takashima M. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 attenuates the expression of experimental murine lupus of MRL/l mice. *Autoimmunity.* 1992;12(2):143-8.
 111. Cantorna MT, Hayes CE, DeLuca HF. 1,25-Dihydroxycholecalciferol inhibits the progression of arthritis in murine models of human arthritis. *J Nutr.* 1998 Jan;128(1):68-72.
 112. Munger KL, Levin LI, Hollis BW, Howard NS, Ascherio A. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *JAMA.* 2006 Dec 20;296(23):2832-8.
 113. Fournier C, Gepner P, Sadouk M, Charreire J. In vivo beneficial effects of cyclosporin A and 1,25-dihydroxyvitamin D3 on the induction of experimental autoimmune thyroiditis. *Clin Immunol Immunopathol.* 1990 Jan;54(1):53-63.
 114. Kivity S, Agmon-Levin N, Zisapli M, Shapira Y, Nagy EV, Danko K, et al. Vitamin D and autoimmune thyroid diseases. *Cell Mol Immunol.* 2011 May;8(3):243-7.
 115. Lemire JM. Le rôle de la vitamine D dans l'immunosuppression: les leçons de l'auto-immunité et la transplantation. in "La vitamine D", San Diego:Academic. 1997:1167-81.
 116. Stockl D, Sluss PM, Thienpont LM. Specifications for trueness and precision of a reference measurement system for serum/plasma 25-hydroxyvitamin D analysis. *Clin Chim Acta.* 2009 Oct;408(1-2):8-13.
 117. Binkley N, Krueger D, Gemar D, Drezner MK. Correlation among 25-hydroxy-vitamin D assays. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008 May;93(5):1804-8.
 118. Cavalier E, Wallace AM, Knox S, Mistretta VI, Cormier C, Souberbielle JC. Serum vitamin D measurement may not reflect what you give to your patients. *J Bone Miner Res.* 2008 Nov;23(11):1864-5.
 119. Heaney RP. Vitamin D: how much do we need, and how much is too much? *Osteoporos Int.* 2000;11(7):553-5.
 120. Lips P, Chapuy MC, Dawson-Hughes B, Pols HA, Holick MF. An international comparison of serum 25-hydroxyvitamin D measurements. *Osteoporos Int.* 1999;9(5):394-7.
 121. Dawson-Hughes B, Harris SS, Dallal GE. Plasma calcidiol, season, and serum parathyroid hormone concentrations in healthy elderly men and women. *Am J Clin Nutr.* 1997 Jan;65(1):67-71.
 122. Chapuy MC, Preziosi P, Maamer M, Arnaud S, Galan P, Hercberg S, et al. Prevalence of vitamin D insufficiency in an adult normal population. *Osteoporos Int.* 1997;7(5):439-43.
 123. Mithal A, Wahl DA, Bonjour JP, Burckhardt P, Dawson-Hughes B, Eisman JA, et al. Global vitamin D status and determinants of hypovitaminosis D. *Osteoporos Int.* 2009 Nov;20(11):1807-20.
 124. Cavalier E, Rozet E, Gadsisseur R, Carlisi A, Monge M, Chapelle JP, et al. Measurement uncertainty of 25-OH vitamin D determination with different commercially available kits: impact on the clinical cut offs. *Osteoporos Int.* 2010 Jun;21(6):1047-51.
 125. Holick MF. Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. *J Clin Invest.* 2006 Aug;116(8):2062-72.
 126. Holick MF, Biancuzzo RM, Chen TC, Klein EK, Young A, Bibuld D, et al. Vitamin D2 is as effective as vitamin D3 in maintaining circulating concentrations of 25-hydroxyvitamin D. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008 Mar;93(3):677-81.
 127. Trang HM, Cole DE, Rubin LA, Pierratos A, Siu S, Vieth R. Evidence that vitamin D3 increases serum 25-hydroxyvitamin D more efficiently than does vitamin D2. *Am J Clin Nutr.* 1998 Oct;68(4):854-8.
 128. Armas LA, Hollis BW, Heaney RP. Vitamin D2 is much less effective than vitamin D3 in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Nov;89(11):5387-91.

129. Nilsson SF, Ostberg L, Peterson PA. Binding of vitamin D to its human carrier plasma protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 1972 Feb 16;46(3):1380-7.
130. Hollis BW, Frank NE. Quantitation of vitamin D₂, vitamin D₃, 25-hydroxyvitamin D₂, and 25-hydroxyvitamin D₃ in human milk. *Methods Enzymol.* 1986;123:167-76.
131. Houghton LA, Vieth R. The case against ergocalciferol (vitamin D₂) as a vitamin supplement. *Am J Clin Nutr.* 2006 Oct;84(4):694-7.
132. Holmberg I, Berlin T, Ewerth S, Bjorkhem I. 25-Hydroxylase activity in subcellular fractions from human liver. Evidence for different rates of mitochondrial hydroxylation of vitamin D₂ and D₃. *Scand J Clin Lab Invest.* 1986 Dec;46(8):785-90.
133. Romagnoli E, Mascia ML, Cipriani C, Fassino V, Mazzei F, D'Erasmo E, et al. Short and long-term variations in serum calcitropic hormones after a single very large dose of ergocalciferol (vitamin D₂) or cholecalciferol (vitamin D₃) in the elderly. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008 Aug;93(8):3015-20.
134. Tripkovic L, Lambert H, Hart K, Smith CP, Bucca G, Penson S, et al. Comparison of vitamin D₂ and vitamin D₃ supplementation in raising serum 25-hydroxyvitamin D status: a systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr.* 2012 Jun;95(6):1357-64.
135. Heaney RP, Davies KM, Chen TC, Holick MF, Barger-Lux MJ. Human serum 25-hydroxycholecalciferol response to extended oral dosing with cholecalciferol. *Am J Clin Nutr.* 2003 Jan;77(1):204-10.
136. Haines ST, Park SK. Vitamin D supplementation: what's known, what to do, and what's needed. *Pharmacotherapy.* 2012 Apr;32(4):354-82.
137. van Groningen L, Opdenoordt S, van Sorge A, Telting D, Giesen A, de Boer H. Cholecalciferol loading dose guideline for vitamin D-deficient adults. *Eur J Endocrinol.* 2010 Apr;162(4):805-11.
138. Trivedi DP, Doll R, Khaw KT. Effect of four monthly oral vitamin D₃ (cholecalciferol) supplementation on fractures and mortality in men and women living in the community: randomised double blind controlled trial. *BMJ.* 2003 Mar 1;326(7387):469.
139. Bischoff-Ferrari HA. How to select the doses of vitamin D in the management of osteoporosis. *Osteoporos Int.* 2007 Apr;18(4):401-7.
140. Souberbielle JC, Courbebaisse M, Cormier C, Pierrot-Deseilligny C, Viard JP, Jean G, et al. When should we measure vitamin D concentration in clinical practice? *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 2012 Apr;243:129-35.
141. Vieth R. Vitamin D supplementation, 25-hydroxyvitamin D concentrations, and safety. *Am J Clin Nutr.* 1999 May;69(5):842-56.
142. Hathcock JN, Shao A, Vieth R, Heaney R. Risk assessment for vitamin D. *Am J Clin Nutr.* 2007 Jan;85(1):6-18.
143. Taylor EN, Stampfer MJ, Curhan GC. Dietary factors and the risk of incident kidney stones in men: new insights after 14 years of follow-up. *J Am Soc Nephrol.* 2004 Dec;15(12):3225-32.
144. Curhan GC, Willett WC, Knight EL, Stampfer MJ. Dietary factors and the risk of incident kidney stones in younger women: Nurses' Health Study II. *Arch Intern Med.* 2004 Apr 26;164(8):885-91.
145. Barger-Lux MJ, Heaney RP. Effects of above average summer sun exposure on serum 25-hydroxyvitamin D and calcium absorption. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 Nov;87(11):4952-6.
146. Amir E, Simmons CE, Freedman OC, Dranitsaris G, Cole DE, Vieth R, et al. A phase 2 trial exploring the effects of high-dose (10,000 IU/day) vitamin D₃ in breast cancer patients with bone metastases. *Cancer.* 2010 Jan 15;116(2):284-91.
147. Kimball SM, Ursell MR, O'Connor P, Vieth R. Safety of vitamin D₃ in adults with multiple sclerosis. *Am J Clin Nutr.* 2007 Sep;86(3):645-51.

148. Webb AR, Kline L, Holick MF. Influence of season and latitude on the cutaneous synthesis of vitamin D₃: exposure to winter sunlight in Boston and Edmonton will not promote vitamin D₃ synthesis in human skin. *J Clin Endocrinol Metab.* 1988 Aug;67(2):373-8.
149. Loomis WF. Skin-pigment regulation of vitamin-D biosynthesis in man. *Science.* 1967 Aug 4;157(3788):501-6.
150. Norman AW. Sunlight, season, skin pigmentation, vitamin D, and 25-hydroxyvitamin D: integral components of the vitamin D endocrine system. *Am J Clin Nutr.* 1998 Jun;67(6):1108-10.
151. Season, latitude, and ability of sunlight to promote synthesis of vitamin D₃ in skin. *Nutr Rev.* 1989 Aug;47(8):252-3.
152. Matsuoka LY, Ide L, Wortsman J, MacLaughlin JA, Holick MF. Sunscreens suppress cutaneous vitamin D₃ synthesis. *J Clin Endocrinol Metab.* 1987 Jun;64(6):1165-8.
153. Matsuoka LY, Wortsman J, Dannenberg MJ, Hollis BW, Lu Z, Holick MF. Clothing prevents ultraviolet-B radiation-dependent photosynthesis of vitamin D₃. *J Clin Endocrinol Metab.* 1992 Oct;75(4):1099-103.
154. Robson J, Diffey BL. Textiles and sun protection. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 1990 Feb;7(1):32-4.
155. Tan CY, Statham B, Marks R, Payne PA. Skin thickness measurement by pulsed ultrasound: its reproducibility, validation and variability. *Br J Dermatol.* 1982 Jun;106(6):657-67.
156. MacLaughlin J, Holick MF. Aging decreases the capacity of human skin to produce vitamin D₃. *J Clin Invest.* 1985 Oct;76(4):1536-8.
157. Armas LA, Dowell S, Akhter M, Duthuluru S, Huerter C, Hollis BW, et al. Ultraviolet-B radiation increases serum 25-hydroxyvitamin D levels: the effect of UVB dose and skin color. *J Am Acad Dermatol.* 2007 Oct;57(4):588-93.
158. Matsuoka LY, Wortsman J, Haddad JG, Kolm P, Hollis BW. Racial pigmentation and the cutaneous synthesis of vitamin D. *Arch Dermatol.* 1991 Apr;127(4):536-8.
159. Barrett-Connor E, Siris ES, Wehren LE, Miller PD, Abbott TA, Berger ML, et al. Osteoporosis and fracture risk in women of different ethnic groups. *J Bone Miner Res.* 2005 Feb;20(2):185-94.
160. Nelson DA, Jacobsen G, Barondess DA, Parfitt AM. Ethnic differences in regional bone density, hip axis length, and lifestyle variables among healthy black and white men. *J Bone Miner Res.* 1995 May;10(5):782-7.
161. Clemens TL, Adams JS, Henderson SL, Holick MF. Increased skin pigment reduces the capacity of skin to synthesise vitamin D₃. *Lancet.* 1982 Jan 9;1(8263):74-6.
162. Chen TC, Chimeh F, Lu Z, Mathieu J, Person KS, Zhang A, et al. Factors that influence the cutaneous synthesis and dietary sources of vitamin D. *Arch Biochem Biophys.* 2007 Apr 15;460(2):213-7.
163. Lo CW, Paris PW, Holick MF. Indian and Pakistani immigrants have the same capacity as Caucasians to produce vitamin D in response to ultraviolet irradiation. *Am J Clin Nutr.* 1986 Nov;44(5):683-5.
164. Holick MF, Frommer JE, McNeill SC, Richtand NM, Henley JW, Potts JT, Jr. Photometabolism of 7-dehydrocholesterol to previtamin D₃ in skin. *Biochem Biophys Res Commun.* 1977 May 9;76(1):107-14.
165. Garabedian M, Holick MF, Deluca HF, Boyle IT. Control of 25-hydroxycholecalciferol metabolism by parathyroid glands. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1972 Jul;69(7):1673-6.
166. Miller WL, Portale AA. Vitamin D 1 alpha-hydroxylase. *Trends Endocrinol Metab.* 2000 Oct;11(8):315-9.
167. Breslau NA. Normal and abnormal regulation of 1,25-(OH)₂D synthesis. *Am J Med Sci.* 1988 Dec;296(6):417-25.

168. Colussi G, De Ferrari ME, Surian M, Malberti F, Rombola G, Pontoriero G, et al. Vitamin D metabolites and osteomalacia in the human Fanconi syndrome. *Proc Eur Dial Transplant Assoc Eur Ren Assoc.* 1985;21:756-60.
169. Haussler MR, Baylink DJ, Hughes MR, Brumbaugh PF, Wergedal JE, Shen FH, et al. The assay of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃: physiologic and pathologic modulation of circulating hormone levels. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1976;5 Suppl:151S-65S.
170. Henry HL, Norman AW. Vitamin D: metabolism and biological actions. *Annu Rev Nutr.* 1984;4:493-520.
171. Rost CR, Bikle DD, Kaplan RA. In vitro stimulation of 25-hydroxycholecalciferol 1 α -hydroxylation by parathyroid hormone in chick kidney slices: evidence for a role for adenosine 3',5'-monophosphate. *Endocrinology.* 1981 Mar;108(3):1002-6.
172. Murayama A, Takeyama K, Kitanaka S, Kodera Y, Hosoya T, Kato S. The promoter of the human 25-hydroxyvitamin D₃ 1 α -hydroxylase gene confers positive and negative responsiveness to PTH, calcitonin, and 1 α ,25(OH)₂D₃. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998 Aug 10;249(1):11-6.
173. Rasmussen H, Deluca H, Arnaud C, Hawker C, Vonstedingk M. The Relationship between Vitamin D and Parathyroid Hormone. *J Clin Invest.* 1963 Dec;42:1940-6.
174. Brown EM, Gamba G, Riccardi D, Lombardi M, Butters R, Kifor O, et al. Cloning and characterization of an extracellular Ca²⁺-sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature.* 1993 Dec 9;366(6455):575-80.
175. Matsumoto T, Ikeda K, Morita K, Fukumoto S, Takahashi H, Ogata E. Blood Ca²⁺ modulates responsiveness of renal 25(OH)D₃-1 α -hydroxylase to PTH in rats. *Am J Physiol.* 1987 Nov;253(5 Pt 1):E503-7.
176. Bland R, Walker EA, Hughes SV, Stewart PM, Hewison M. Constitutive expression of 25-hydroxyvitamin D₃-1 α -hydroxylase in a transformed human proximal tubule cell line: evidence for direct regulation of vitamin D metabolism by calcium. *Endocrinology.* 1999 May;140(5):2027-34.
177. Hughes MR, Brumbaugh PF, Hussler MR, Wergedal JE, Baylink DJ. Regulation of serum 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ by calcium and phosphate in the rat. *Science.* 1975 Nov 7;190(4214):578-80.
178. Tanaka Y, Deluca HF. The control of 25-hydroxyvitamin D metabolism by inorganic phosphorus. *Arch Biochem Biophys.* 1973 Feb;154(2):566-74.
179. Bushinsky DA, Nalbantian-Brandt C, Favus MJ. Elevated Ca²⁺ does not inhibit the 1,25(OH)₂D₃ response to phosphorus restriction. *Am J Physiol.* 1989 Feb;256(2 Pt 2):F285-9.
180. Gray RW, Haasch ML, Brown CE. Regulation of plasma 1,25-(OH)₂-D₃ by phosphate: evidence against a role for total or acid-soluble renal phosphate content. *Calcif Tissue Int.* 1983 Sep;35(6):773-7.
181. Wu S, Finch J, Zhong M, Slatopolsky E, Grief M, Brown AJ. Expression of the renal 25-hydroxyvitamin D-24-hydroxylase gene: regulation by dietary phosphate. *Am J Physiol.* 1996 Jul;271(1 Pt 2):F203-8.
182. Kawashima H, Kraut JA, Kurokawa K. Metabolic acidosis suppresses 25-hydroxyvitamin in D₃-1 α -hydroxylase in the rat kidney. Distinct site and mechanism of action. *J Clin Invest.* 1982 Jul;70(1):135-40.
183. Lee SW, Russell J, Avioli LV. 25-hydroxycholecalciferol to 1,25-dihydroxycholecalciferol: conversion impaired by systemic metabolic acidosis. *Science.* 1977 Mar 11;195(4282):994-6.
184. Bushinsky DA, Riera GS, Favus MJ, Coe FL. Response of serum 1,25(OH)₂D₃ to variation of ionized calcium during chronic acidosis. *Am J Physiol.* 1985 Sep;249(3 Pt 2):F361-5.
185. Engstrom GW, Horst RL, Reinhardt TA, Littledike ET. 25-Hydroxyvitamin D 1 α - and 24-hydroxylase activities in pig kidney homogenates: effect of vitamin D deficiency. *J Nutr.* 1984 Jan;114(1):119-26.

186. Martin DL, Deluca HF. Calcium transport and the role of vitamin D. *Arch Biochem Biophys.* 1969 Oct;134(1):139-48.
187. Gray RW. Evidence that somatomedins mediate the effect of hypophosphatemia to increase serum 1,25-dihydroxyvitamin D₃ levels in rats. *Endocrinology.* 1987 Aug;121(2):504-12.
188. Halloran BP, Spencer EM. Dietary phosphorus and 1,25-dihydroxyvitamin D metabolism: influence of insulin-like growth factor I. *Endocrinology.* 1988 Sep;123(3):1225-9.
189. Gray RW. Control of plasma 1,25-(OH)₂-vitamin D concentrations by calcium and phosphorus in the rat: effects of hypophysectomy. *Calcif Tissue Int.* 1981;33(5):485-8.
190. Gray RW, Garthwaite TL, Phillips LS. Growth hormone and triiodothyronine permit an increase in plasma 1,25(OH)₂D concentrations in response to dietary phosphate deprivation in hypophysectomized rats. *Calcif Tissue Int.* 1983;35(1):100-6.
191. Matsumoto T, Kawanobe Y, Ezawa I, Shibuya N, Hata K, Ogata E. Role of insulin in the increase in serum 1,25-dihydroxyvitamin D concentrations in response to phosphorus deprivation in streptozotocin-induced diabetic rats. *Endocrinology.* 1986 Apr;118(4):1440-4.
192. Liu S, Zhou J, Tang W, Jiang X, Rowe DW, Quarles LD. Pathogenic role of Fgf23 in Hyp mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006 Jul;291(1):E38-49.
193. Post SM, Duez H, Gervois PP, Staels B, Kuipers F, Princen HM. Fibrates suppress bile acid synthesis via peroxisome proliferator-activated receptor- α -mediated downregulation of cholesterol 7 α -hydroxylase and sterol 27-hydroxylase expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001 Nov;21(11):1840-5.
194. Chen W, Chiang JY. Regulation of human sterol 27-hydroxylase gene (CYP27A1) by bile acids and hepatocyte nuclear factor 4 α (HNF4 α). *Gene.* 2003 Aug 14;313:71-82.
195. Quinn CM, Jessup W, Wong J, Kritharides L, Brown AJ. Expression and regulation of sterol 27-hydroxylase (CYP27A1) in human macrophages: a role for RXR and PPAR γ ligands. *Biochem J.* 2005 Feb 1;385(Pt 3):823-30.
196. Eloranta JJ, Kullak-Ublick GA. Coordinate transcriptional regulation of bile acid homeostasis and drug metabolism. *Arch Biochem Biophys.* 2005 Jan 15;433(2):397-412.
197. Pascussi JM, Robert A, Nguyen M, Walrant-Debray O, Garabedian M, Martin P, et al. Possible involvement of pregnane X receptor-enhanced CYP24 expression in drug-induced osteomalacia. *J Clin Invest.* 2005 Jan;115(1):177-86.
198. Hewison M, Zehnder D, Bland R, Stewart PM. 1 α -Hydroxylase and the action of vitamin D. *J Mol Endocrinol.* 2000 Oct;25(2):141-8.
199. Schiavi SC, Kumar R. The phosphatonin pathway: new insights in phosphate homeostasis. *Kidney Int.* 2004 Jan;65(1):1-14.
200. DeLuca HF. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am J Clin Nutr.* 2004 Dec;80(6 Suppl):1689S-96S.
201. Murayama A, Kim MS, Yanagisawa J, Takeyama K, Kato S. Transrepression by a liganded nuclear receptor via a bHLH activator through co-regulator switching. *EMBO J.* 2004 Apr 7;23(7):1598-608.
202. Townsend K, Evans KN, Campbell MJ, Colston KW, Adams JS, Hewison M. Biological actions of extra-renal 25-hydroxyvitamin D-1 α -hydroxylase and implications for chemoprevention and treatment. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2005 Oct;97(1-2):103-9.
203. Zehnder D, Bland R, Williams MC, McNinch RW, Howie AJ, Stewart PM, et al. Extrarenal expression of 25-hydroxyvitamin d(3)-1 α -hydroxylase. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 Feb;86(2):888-94.
204. Zehnder D, Bland R, Chana RS, Wheeler DC, Howie AJ, Williams MC, et al. 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.* 2002 Mar;13(3):621-9.

205. Zehnder D, Evans KN, Kilby MD, Bulmer JN, Innes BA, Stewart PM, et al. The ontogeny of 25-hydroxyvitamin D(3) 1 α -hydroxylase expression in human placenta and decidua. *Am J Pathol.* 2002 Jul;161(1):105-14.
206. Hewison M, Freeman L, Hughes SV, Evans KN, Bland R, Eliopoulos AG, et al. Differential regulation of vitamin D receptor and its ligand in human monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol.* 2003 Jun 1;170(11):5382-90.
207. Reichel H, Koeffler HP, Norman AW. Synthesis in vitro of 1,25-dihydroxyvitamin D3 and 24,25-dihydroxyvitamin D3 by interferon-gamma-stimulated normal human bone marrow and alveolar macrophages. *J Biol Chem.* 1987 Aug 15;262(23):10931-7.
208. Bikle DD, Pillai S. Vitamin D metabolite production and function in keratinocytes. *Ann N Y Acad Sci.* 1988;548:27-44.
209. Courbebaisse M, Souberbielle JC. [Phosphocalcic metabolism: regulation and explorations]. *Nephrol Ther.* 2011 Apr;7(2):118-38.
210. Kim HS, Chung W, Kim S. Vitamin d, and kidney disease. *Electrolyte Blood Press.* 2011 Jun;9(1):1-6.
211. Shigematsu T, Kazama JJ, Yamashita T, Fukumoto S, Hosoya T, Gejyo F, et al. Possible involvement of circulating fibroblast growth factor 23 in the development of secondary hyperparathyroidism associated with renal insufficiency. *Am J Kidney Dis.* 2004 Aug;44(2):250-6.
212. Shimada T, Hasegawa H, Yamazaki Y, Muto T, Hino R, Takeuchi Y, et al. FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis. *J Bone Miner Res.* 2004 Mar;19(3):429-35.
213. Yamashita T. Structural and biochemical properties of fibroblast growth factor 23. *Ther Apher Dial.* 2005 Aug;9(4):313-8.
214. Shimada T, Kakitani M, Yamazaki Y, Hasegawa H, Takeuchi Y, Fujita T, et al. Targeted ablation of Fgf23 demonstrates an essential physiological role of FGF23 in phosphate and vitamin D metabolism. *J Clin Invest.* 2004 Feb;113(4):561-8.
215. Bai X, Miao D, Li J, Goltzman D, Karaplis AC. Transgenic mice overexpressing human fibroblast growth factor 23 (R176Q) delineate a putative role for parathyroid hormone in renal phosphate wasting disorders. *Endocrinology.* 2004 Nov;145(11):5269-79.
216. Razzaque MS, Lanske B. The emerging role of the fibroblast growth factor-23-klotho axis in renal regulation of phosphate homeostasis. *J Endocrinol.* 2007 Jul;194(1):1-10.
217. Martin A, David V, Quarles LD. Regulation and function of the FGF23/klotho endocrine pathways. *Physiol Rev.* 2012 Jan;92(1):131-55.
218. Kurosu H, Ogawa Y, Miyoshi M, Yamamoto M, Nandi A, Rosenblatt KP, et al. Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by klotho. *J Biol Chem.* 2006 Mar 10;281(10):6120-3.
219. Urakawa I, Yamazaki Y, Shimada T, Iijima K, Hasegawa H, Okawa K, et al. Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. *Nature.* 2006 Dec 7;444(7120):770-4.
220. Liu S, Tang W, Zhou J, Stubbs JR, Luo Q, Pi M, et al. Fibroblast growth factor 23 is a counter-regulatory phosphaturic hormone for vitamin D. *J Am Soc Nephrol.* 2006 May;17(5):1305-15.
221. Bonjour JP, Caverzasio J, Rizzoli R. Phosphate homeostasis, 1,25-dihydroxyvitamin D(3), and hyperparathyroidism in early chronic renal failure. *Trends Endocrinol Metab.* 1992 Oct;3(8):301-5.
222. Almaden Y, Hernandez A, Torregrosa V, Canalejo A, Sabate L, Fernandez Cruz L, et al. High phosphate level directly stimulates parathyroid hormone secretion and synthesis by human parathyroid tissue in vitro. *J Am Soc Nephrol.* 1998 Oct;9(10):1845-52.
223. Michael M, Garcia D. Secondary hyperparathyroidism in chronic kidney disease: clinical consequences and challenges. *Nephrol Nurs J.* 2004 Mar-Apr;31(2):185-94; quiz 95-6.

224. Malluche HH, Monier-Faugere MC. Understanding and managing hyperphosphatemia in patients with chronic renal disease. *Clin Nephrol.* 1999 Nov;52(5):267-77.
225. Llach F. Hyperphosphatemia in end-stage renal disease patients: pathophysiological consequences. *Kidney Int Suppl.* 1999 Dec;73:S31-7.
226. Hayakawa Y, Tanaka Y, Funahashi H, Imai T, Matsuura N, Oiwa M, et al. Hyperphosphatemia accelerates parathyroid cell proliferation and parathyroid hormone secretion in severe secondary parathyroid hyperplasia. *Endocr J.* 1999 Oct;46(5):681-6.
227. Moe S, Drueke T, Cunningham J, Goodman W, Martin K, Olgaard K, et al. Definition, evaluation, and classification of renal osteodystrophy: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int.* 2006 Jun;69(11):1945-53.
228. Hruska KA, Teitelbaum SL. Renal osteodystrophy. *N Engl J Med.* 1995 Jul 20;333(3):166-74.
229. Hutchison AJ, Whitehouse RW, Boulton HF, Adams JE, Mawer EB, Freemont TJ, et al. Correlation of bone histology with parathyroid hormone, vitamin D3, and radiology in end-stage renal disease. *Kidney Int.* 1993 Nov;44(5):1071-7.
230. KDIGO clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD). *Kidney Int Suppl.* 2009 Aug(113):S1-130.
231. Caro JF, Dohm LG, Pories WJ, Sinha MK. Cellular alterations in liver, skeletal muscle, and adipose tissue responsible for insulin resistance in obesity and type II diabetes. *Diabetes Metab Rev.* 1989 Dec;5(8):665-89.
232. Olefsky JM, Nolan JJ. Insulin resistance and non-insulin-dependent diabetes mellitus: cellular and molecular mechanisms. *Am J Clin Nutr.* 1995 Apr;61(4 Suppl):980S-6S.
233. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet.* 1998 Sep 12;352(9131):837-53.
234. Baynes KC, Boucher BJ, Feskens EJ, Kromhout D. Vitamin D, glucose tolerance and insulinaemia in elderly men. *Diabetologia.* 1997 Mar;40(3):344-7.
235. Variation and trends in incidence of childhood diabetes in Europe. EURODIAB ACE Study Group. *Lancet.* 2000 Mar 11;355(9207):873-6.
236. Maahs DM, West NA, Lawrence JM, Mayer-Davis EJ. Epidemiology of type 1 diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2010 Sep;39(3):481-97.
237. Stivelman E, Retnakaran R. Role of vitamin D in the pathophysiology and treatment of type 2 diabetes. *Curr Diabetes Rev.* 2012 Jan;8(1):42-7.
238. Mitri J, Dawson-Hughes B, Hu FB, Pittas AG. Effects of vitamin D and calcium supplementation on pancreatic beta cell function, insulin sensitivity, and glycemia in adults at high risk of diabetes: the Calcium and Vitamin D for Diabetes Mellitus (CaDDM) randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr.* 2011 Aug;94(2):486-94.
239. Chiu KC, Chu A, Go VL, Saad MF. Hypovitaminosis D is associated with insulin resistance and beta cell dysfunction. *Am J Clin Nutr.* 2004 May;79(5):820-5.
240. Norman AW, Frankel JB, Heldt AM, Grodsky GM. Vitamin D deficiency inhibits pancreatic secretion of insulin. *Science.* 1980 Aug 15;209(4458):823-5.
241. Cade C, Norman AW. Vitamin D3 improves impaired glucose tolerance and insulin secretion in the vitamin D-deficient rat in vivo. *Endocrinology.* 1986 Jul;119(1):84-90.
242. Zeitz U, Weber K, Soegiarto DW, Wolf E, Balling R, Erben RG. Impaired insulin secretory capacity in mice lacking a functional vitamin D receptor. *FASEB J.* 2003 Mar;17(3):509-11.
243. Maestro B, Molero S, Bajo S, Davila N, Calle C. Transcriptional activation of the human insulin receptor gene by 1,25-dihydroxyvitamin D(3). *Cell Biochem Funct.* 2002 Sep;20(3):227-32.

244. Maestro B, Davila N, Carranza MC, Calle C. Identification of a Vitamin D response element in the human insulin receptor gene promoter. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2003 Feb;84(2-3):223-30.
245. Dunlop TW, Vaisanen S, Frank C, Molnar F, Sinkkonen L, Carlberg C. The human peroxisome proliferator-activated receptor delta gene is a primary target of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and its nuclear receptor. *J Mol Biol*. 2005 Jun 3;349(2):248-60.
246. Draznin B. Cytosolic calcium and insulin resistance. *Am J Kidney Dis*. 1993 Jun;21(6 Suppl 3):32-8.
247. Sowers JR. Insulin resistance and hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004 May;286(5):H1597-602.
248. Wei Y, Sowers JR, Clark SE, Li W, Ferrario CM, Stump CS. Angiotensin II-induced skeletal muscle insulin resistance mediated by NF-kappaB activation via NADPH oxidase. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008 Feb;294(2):E345-51.
249. Boucher BJ, Mannan N, Noonan K, Hales CN, Evans SJ. Glucose intolerance and impairment of insulin secretion in relation to vitamin D deficiency in east London Asians. *Diabetologia*. 1995 Oct;38(10):1239-45.
250. Isaia G, Giorgino R, Adami S. High prevalence of hypovitaminosis D in female type 2 diabetic population. *Diabetes Care*. 2001 Aug;24(8):1496.
251. Scragg R, Sowers M, Bell C. Serum 25-hydroxyvitamin D, diabetes, and ethnicity in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Diabetes Care*. 2004 Dec;27(12):2813-8.
252. Knekt P, Laaksonen M, Mattila C, Harkanen T, Marniemi J, Heliovaara M, et al. Serum vitamin D and subsequent occurrence of type 2 diabetes. *Epidemiology*. 2008 Sep;19(5):666-71.
253. Forouhi NG, Ye Z, Rickard AP, Khaw KT, Luben R, Langenberg C, et al. Circulating 25-hydroxyvitamin D concentration and the risk of type 2 diabetes: results from the European Prospective Investigation into Cancer (EPIC)-Norfolk cohort and updated meta-analysis of prospective studies. *Diabetologia*. 2012 Aug;55(8):2173-82.
254. Gagnon C, Lu ZX, Magliano DJ, Dunstan DW, Shaw JE, Zimmet PZ, et al. Low Serum 25-Hydroxyvitamin D Is Associated with Increased Risk of the Development of the Metabolic Syndrome at Five Years: Results from a National, Population-Based Prospective Study (The Australian Diabetes, Obesity and Lifestyle Study: AusDiab). *J Clin Endocrinol Metab*. 2012 Jun;97(6):1953-61.
255. Lee S, Clark SA, Gill RK, Christakos S. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and pancreatic beta-cell function: vitamin D receptors, gene expression, and insulin secretion. *Endocrinology*. 1994 Apr;134(4):1602-10.
256. Sergeev IN, Rhoten WB. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 evokes oscillations of intracellular calcium in a pancreatic beta-cell line. *Endocrinology*. 1995 Jul;136(7):2852-61.
257. Kadowaki S, Norman AW. Pancreatic vitamin D-dependent calcium binding protein: biochemical properties and response to vitamin D. *Arch Biochem Biophys*. 1984 Aug 15;233(1):228-36.
258. Kadowaki S, Norman AW. Dietary vitamin D is essential for normal insulin secretion from the perfused rat pancreas. *J Clin Invest*. 1984 Mar;73(3):759-66.
259. Sooy K, Schermerhorn T, Noda M, Surana M, Rhoten WB, Meyer M, et al. Calbindin-D(28k) controls [Ca(2+)](i) and insulin release. Evidence obtained from calbindin-d(28k) knockout mice and beta cell lines. *J Biol Chem*. 1999 Nov 26;274(48):34343-9.
260. Watson PE, Watson ID, Batt RD. Obesity indices. *Am J Clin Nutr*. 1979 Apr;32(4):736-7.
261. Fontaine KR, Redden DT, Wang C, Westfall AO, Allison DB. Years of life lost due to obesity. *JAMA*. 2003 Jan 8;289(2):187-93.
262. Peeters A, Barendregt JJ, Willekens F, Mackenbach JP, Al Mamun A, Bonneux L. Obesity in adulthood and its consequences for life expectancy: a life-table analysis. *Ann Intern Med*. 2003 Jan 7;138(1):24-32.

263. Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Bautista L, Franzosi MG, Commerford P, et al. Obesity and the risk of myocardial infarction in 27,000 participants from 52 countries: a case-control study. *Lancet*. 2005 Nov 5;366(9497):1640-9.
264. Kenchaiah S, Evans JC, Levy D, Wilson PW, Benjamin EJ, Larson MG, et al. Obesity and the risk of heart failure. *N Engl J Med*. 2002 Aug 1;347(5):305-13.
265. Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med*. 2003 Apr 24;348(17):1625-38.
266. Wareham N. Physical activity and obesity prevention. *Obes Rev*. 2007 Mar;8 Suppl 1:109-14.
267. Wilkin TJ, Mallam KM, Metcalf BS, Jeffery AN, Voss LD. Variation in physical activity lies with the child, not his environment: evidence for an 'activitystat' in young children (EarlyBird 16). *Int J Obes (Lond)*. 2006 Jul;30(7):1050-5.
268. Slawik M, Beuschlein F. [Genetics and pathophysiology of obesity]. *Internist (Berl)*. 2006 Feb;47(2):120-9.
269. Bell NH, Greene A, Epstein S, Oexmann MJ, Shaw S, Shary J. Evidence for alteration of the vitamin D-endocrine system in blacks. *J Clin Invest*. 1985 Aug;76(2):470-3.
270. Arunabh S, Pollack S, Yeh J, Aloia JF. Body fat content and 25-hydroxyvitamin D levels in healthy women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003 Jan;88(1):157-61.
271. Wortsman J, Matsuoka LY, Chen TC, Lu Z, Holick MF. Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. *Am J Clin Nutr*. 2000 Sep;72(3):690-3.
272. Ford ES, Ajani UA, McGuire LC, Liu S. Concentrations of serum vitamin D and the metabolic syndrome among U.S. adults. *Diabetes Care*. 2005 May;28(5):1228-30.
273. Barger-Lux MJ, Heaney RP, Dowell S, Chen TC, Holick MF. Vitamin D and its major metabolites: serum levels after graded oral dosing in healthy men. *Osteoporos Int*. 1998;8(3):222-30.
274. Rajakumar K, Fernstrom JD, Holick MF, Janosky JE, Greenspan SL. Vitamin D status and response to Vitamin D(3) in obese vs. non-obese African American children. *Obesity (Silver Spring)*. 2008 Jan;16(1):90-5.
275. Mawer EB, Backhouse J, Holman CA, Lumb GA, Stanbury SW. The distribution and storage of vitamin D and its metabolites in human tissues. *Clin Sci*. 1972 Sep;43(3):413-31.
276. Shi H, Norman AW, Okamura WH, Sen A, Zemel MB. 1alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 modulates human adipocyte metabolism via nongenomic action. *FASEB J*. 2001 Dec;15(14):2751-3.
277. Sun X, Zemel MB. Calcium and 1,25-dihydroxyvitamin D3 regulation of adipokine expression. *Obesity (Silver Spring)*. 2007 Feb;15(2):340-8.
278. Sun X, Zemel MB. 1Alpha,25-dihydroxyvitamin D3 modulation of adipocyte reactive oxygen species production. *Obesity (Silver Spring)*. 2007 Aug;15(8):1944-53.
279. Sun X, Morris KL, Zemel MB. Role of calcitriol and cortisol on human adipocyte proliferation and oxidative and inflammatory stress: a microarray study. *J Nutrigenet Nutrigenomics*. 2008;1(1-2):30-48.
280. Sun X, Zemel MB. Role of uncoupling protein 2 (UCP2) expression and 1alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 in modulating adipocyte apoptosis. *FASEB J*. 2004 Sep;18(12):1430-2.
281. Danik JS, Manson JE. Vitamin D and Cardiovascular Disease. *Curr Treat Options Cardiovasc Med*. 2012 Jun 12.
282. Forman JP, Giovannucci E, Holmes MD, Bischoff-Ferrari HA, Tworoger SS, Willett WC, et al. Plasma 25-hydroxyvitamin D levels and risk of incident hypertension. *Hypertension*. 2007 May;49(5):1063-9.
283. Ginde AA, Scragg R, Schwartz RS, Camargo CA, Jr. Prospective study of serum 25-hydroxyvitamin d level, cardiovascular disease mortality, and all-cause mortality in older U.S. Adults. *J Am Geriatr Soc*. 2009 Sep;57(9):1595-603.

284. Carthy EP, Yamashita W, Hsu A, Ooi BS. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ and rat vascular smooth muscle cell growth. *Hypertension*. 1989 Jun;13(6 Pt 2):954-9.
285. Krause R, Buhning M, Hopfenmuller W, Holick MF, Sharma AM. Ultraviolet B and blood pressure. *Lancet*. 1998 Aug 29;352(9129):709-10.
286. Gotsman I, Shauer A, Zwas DR, Hellman Y, Keren A, Lotan C, et al. Vitamin D deficiency is a predictor of reduced survival in patients with heart failure; vitamin D supplementation improves outcome. *Eur J Heart Fail*. 2012 Apr;14(4):357-66.
287. Cigolini M, Iagulli MP, Miconi V, Galiotto M, Lombardi S, Targher G. Serum 25-hydroxyvitamin D₃ concentrations and prevalence of cardiovascular disease among type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*. 2006 Mar;29(3):722-4.
288. Joergensen C, Reinhard H, Schmedes A, Hansen PR, Wiinberg N, Petersen CL, et al. Vitamin D levels and asymptomatic coronary artery disease in type 2 diabetic patients with elevated urinary albumin excretion rate. *Diabetes Care*. 2012 Jan;35(1):168-72.
289. Lee JH, Gadi R, Spertus JA, Tang F, O'Keefe JH. Prevalence of vitamin D deficiency in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*. 2011 Jun 1;107(11):1636-8.
290. Merke J, Hofmann W, Goldschmidt D, Ritz E. Demonstration of 1,25(OH)₂ vitamin D₃ receptors and actions in vascular smooth muscle cells in vitro. *Calcif Tissue Int*. 1987 Aug;41(2):112-4.
291. Hariharan S, Hong SY, Hsu A, MacCarthy EP, Gartside PS, Ooi BS. Effect of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on mesangial cell proliferation. *J Lab Clin Med*. 1991 May;117(5):423-9.
292. Melamed ML, Muntner P, Michos ED, Uribarri J, Weber C, Sharma J, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and the prevalence of peripheral arterial disease: results from NHANES 2001 to 2004. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008 Jun;28(6):1179-85.
293. Simon A, Garipey J, Chironi G, Megnien JL, Levenson J. Intima-media thickness: a new tool for diagnosis and treatment of cardiovascular risk. *J Hypertens*. 2002 Feb;20(2):159-69.
294. Targher G, Bertolini L, Padovani R, Zenari L, Scala L, Cigolini M, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D₃ concentrations and carotid artery intima-media thickness among type 2 diabetic patients. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2006 Nov;65(5):593-7.
295. Haussler MR, Myrtle JF, Norman AW. The association of a metabolite of vitamin D₃ with intestinal mucosa chromatin in vivo. *J Biol Chem*. 1968 Aug 10;243(15):4055-64.
296. Baker AR, McDonnell DP, Hughes M, Crisp TM, Mangelsdorf DJ, Haussler MR, et al. Cloning and expression of full-length cDNA encoding human vitamin D receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 May;85(10):3294-8.
297. Clemens TL, Garrett KP, Zhou XY, Pike JW, Haussler MR, Dempster DW. Immunocytochemical localization of the 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor in target cells. *Endocrinology*. 1988 Apr;122(4):1224-30.
298. Ishida H, Norman AW. Demonstration of a high affinity receptor for 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in rat pancreas. *Mol Cell Endocrinol*. 1988 Dec;60(2-3):109-17.
299. Szpirer J, Szpirer C, Riviere M, Levan G, Marynen P, Cassiman JJ, et al. The Sp1 transcription factor gene (SP1) and the 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor gene (VDR) are colocalized on human chromosome arm 12q and rat chromosome 7. *Genomics*. 1991 Sep;11(1):168-73.
300. Miyamoto K, Kesterson RA, Yamamoto H, Taketani Y, Nishiwaki E, Tatsumi S, et al. Structural organization of the human vitamin D receptor chromosomal gene and its promoter. *Mol Endocrinol*. 1997 Jul;11(8):1165-79.
301. Ozono K, Sone T, Pike JW. The genomic mechanism of action of 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *J Bone Miner Res*. 1991 Oct;6(10):1021-7.
302. Pike JW, Meyer MB, Bishop KA. Regulation of target gene expression by the vitamin D receptor - an update on mechanisms. *Rev Endocr Metab Disord*. 2012 Mar;13(1):45-55.
303. Masuyama H, Jefcoat SC, Jr., MacDonald PN. The N-terminal domain of transcription factor IIB is required for direct interaction with the vitamin D receptor and participates in vitamin D-mediated transcription. *Mol Endocrinol*. 1997 Feb;11(2):218-28.

304. Mellon WS, DeLuca HF. An equilibrium and kinetic study of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ binding to chicken intestinal cytosol employing high specific activity 1,25-dehydroxy[³H-26, 27] vitamin D₃. *Arch Biochem Biophys.* 1979 Oct 1;197(1):90-5.
305. Saijo T, Ito M, Takeda E, Huq AH, Naito E, Yokota I, et al. A unique mutation in the vitamin D receptor gene in three Japanese patients with vitamin D-dependent rickets type II: utility of single-strand conformation polymorphism analysis for heterozygous carrier detection. *Am J Hum Genet.* 1991 Sep;49(3):668-73.
306. Kitanaka S, Takeyama K, Murayama A, Kato S. The molecular basis of vitamin D-dependent rickets type I. *Endocr J.* 2001 Aug;48(4):427-32.
307. Kitanaka S, Takeyama K, Murayama A, Sato T, Okumura K, Nogami M, et al. Inactivating mutations in the 25-hydroxyvitamin D₃ 1 α -hydroxylase gene in patients with pseudovitamin D-deficiency rickets. *N Engl J Med.* 1998 Mar 5;338(10):653-61.
308. Haussler MR, Jurutka PW, Mizwicki M, Norman AW. Vitamin D receptor (VDR)-mediated actions of 1 α ,25(OH)₂vitamin D₃: genomic and non-genomic mechanisms. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2011 Aug;25(4):543-59.
309. Mizwicki MT, Norman AW. The vitamin D sterol-vitamin D receptor ensemble model offers unique insights into both genomic and rapid-response signaling. *Sci Signal.* 2009;2(75):re4.
310. Haussler MR, Whitfield GK, Haussler CA, Hsieh JC, Thompson PD, Selznick SH, et al. The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed. *J Bone Miner Res.* 1998 Mar;13(3):325-49.
311. Costa EM, Feldman D. Homologous up-regulation of the 1,25 (OH)₂ vitamin D₃ receptor in rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 1986 Jun 13;137(2):742-7.
312. Costa EM, Feldman D. Measurement of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor turnover by dense amino acid labeling: changes during receptor up-regulation by vitamin D metabolites. *Endocrinology.* 1987 Mar;120(3):1173-8.
313. Hirst M, Feldman D. Glucocorticoid regulation of 1,25(OH)₂vitamin D₃ receptors: divergent effects on mouse and rat intestine. *Endocrinology.* 1982 Oct;111(4):1400-2.
314. Nielsen HK, Eriksen EF, Storm T, Mosekilde L. The effects of short-term, high-dose treatment with prednisone on the nuclear uptake of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in monocytes from normal human subjects. *Metabolism.* 1988 Feb;37(2):109-14.
315. Pols HA, van Leeuwen JP, Schilte JP, Visser TJ, Birkenhager JC. Heterologous up-regulation of the 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor by parathyroid hormone (PTH) and PTH-like peptide in osteoblast-like cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988 Oct 14;156(1):588-94.
316. Zineb R, Zhor B, Odile W, Marthe RR. Distinct, tissue-specific regulation of vitamin D receptor in the intestine, kidney, and skin by dietary calcium and vitamin D. *Endocrinology.* 1998 Apr;139(4):1844-52.
317. Brown AJ, Zhong M, Finch J, Ritter C, Slatopolsky E. The roles of calcium and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in the regulation of vitamin D receptor expression by rat parathyroid glands. *Endocrinology.* 1995 Apr;136(4):1419-25.
318. Masuyama H, MacDonald PN. Proteasome-mediated degradation of the vitamin D receptor (VDR) and a putative role for SUG1 interaction with the AF-2 domain of VDR. *J Cell Biochem.* 1998 Dec 1;71(3):429-40.
319. Wang DG, Fan JB, Siao CJ, Berno A, Young P, Sapolsky R, et al. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science.* 1998 May 15;280(5366):1077-82.
320. Weber JL. Human DNA polymorphisms and methods of analysis. *Curr Opin Biotechnol.* 1990 Dec;1(2):166-71.
321. Stephens JC, Schneider JA, Tanguay DA, Choi J, Acharya T, Stanley SE, et al. Haplotype variation and linkage disequilibrium in 313 human genes. *Science.* 2001 Jul 20;293(5529):489-93.

322. Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein LD, Marth G, et al. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*. 2001 Feb 15;409(6822):928-33.
323. Durrin LK, Haile RW, Ingles SA, Coetzee GA. Vitamin D receptor 3'-untranslated region polymorphisms: lack of effect on mRNA stability. *Biochim Biophys Acta*. 1999 Mar 30;1453(3):311-20.
324. Ongphiphadhanakul B, Rajatanavin R, Chanprasertyothin S, Chailurkit L, Piaseu N, Teerarungsikul K, et al. Vitamin D receptor gene polymorphism is associated with urinary calcium excretion but not with bone mineral density in postmenopausal women. *J Endocrinol Invest*. 1997 Nov;20(10):592-6.
325. Arai H, Miyamoto K, Taketani Y, Yamamoto H, Iemori Y, Morita K, et al. A vitamin D receptor gene polymorphism in the translation initiation codon: effect on protein activity and relation to bone mineral density in Japanese women. *J Bone Miner Res*. 1997 Jun;12(6):915-21.
326. Francis RM, Harrington F, Turner E, Papiha SS, Datta HK. Vitamin D receptor gene polymorphism in men and its effect on bone density and calcium absorption. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1997 Jan;46(1):83-6.
327. Whitfield GK, Remus LS, Jurutka PW, Zitzer H, Oza AK, Dang HT, et al. Functionally relevant polymorphisms in the human nuclear vitamin D receptor gene. *Mol Cell Endocrinol*. 2001 May 25;177(1-2):145-59.
328. Morrison NA, Yeoman R, Kelly PJ, Eisman JA. Contribution of trans-acting factor alleles to normal physiological variability: vitamin D receptor gene polymorphism and circulating osteocalcin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Aug 1;89(15):6665-9.
329. Faraco JH, Morrison NA, Baker A, Shine J, Frossard PM. ApaI dimorphism at the human vitamin D receptor gene locus. *Nucleic Acids Res*. 1989 Mar 11;17(5):2150.
330. Jurutka PW, Remus LS, Whitfield GK, Thompson PD, Hsieh JC, Zitzer H, et al. The polymorphic N terminus in human vitamin D receptor isoforms influences transcriptional activity by modulating interaction with transcription factor IIB. *Mol Endocrinol*. 2000 Mar;14(3):401-20.
331. Wall JD, Pritchard JK. Assessing the performance of the haplotype block model of linkage disequilibrium. *Am J Hum Genet*. 2003 Sep;73(3):502-15.
332. Filus A, Trzmiel A, Kuliczowska-Plaksej J, Tworowska U, Jedrzejuk D, Milewicz A, et al. Relationship between vitamin D receptor BsmI and FokI polymorphisms and anthropometric and biochemical parameters describing metabolic syndrome. *Aging Male*. 2008 Sep;11(3):134-9.
333. Egan JB, Thompson PA, Vitanov MV, Bartik L, Jacobs ET, Haussler MR, et al. Vitamin D receptor ligands, adenomatous polyposis coli, and the vitamin D receptor FokI polymorphism collectively modulate beta-catenin activity in colon cancer cells. *Mol Carcinog*. 2010 Apr;49(4):337-52.
334. Hustmyer FG, DeLuca HF, Peacock M. ApaI, BsmI, EcoRV and TaqI polymorphisms at the human vitamin D receptor gene locus in Caucasians, blacks and Asians. *Hum Mol Genet*. 1993 Apr;2(4):487.
335. Lins TC, Vieira RG, Grattapaglia D, Pereira RW. Population analysis of vitamin D receptor polymorphisms and the role of genetic ancestry in an admixed population. *Genet Mol Biol*. 2011 Jul;34(3):377-85.
336. Rezende VB, Barbosa F, Jr., Montenegro MF, Sandrim VC, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. An interethnic comparison of the distribution of vitamin D receptor genotypes and haplotypes. *Clin Chim Acta*. 2007 Sep;384(1-2):155-9.
337. Reis AF, Hauache OM, Velho G. Vitamin D endocrine system and the genetic susceptibility to diabetes, obesity and vascular disease. A review of evidence. *Diabetes Metab*. 2005 Sep;31(4 Pt 1):318-25.
338. Ishida H, Cunningham NS, Henry HL, Norman AW. The number of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptors is decreased in both intestine and kidney of genetically diabetic db/db mice. *Endocrinology*. 1988 Jun;122(6):2436-43.

339. Patel SR, Xu Y, Koenig RJ, Hsu CH. Effect of glucose on the function of the calcitriol receptor and vitamin D metabolism. *Kidney Int.* 1997 Jul;52(1):79-86.
340. Piepkorn B, Kann P, Forst T, Andreas J, Pfutzner A, Beyer J. Bone mineral density and bone metabolism in diabetes mellitus. *Horm Metab Res.* 1997 Nov;29(11):584-91.
341. Hauache OM, Lazaretti-Castro M, Andreoni S, Gimeno SG, Brandao C, Ramalho AC, et al. Vitamin D receptor gene polymorphism: correlation with bone mineral density in a Brazilian population with insulin-dependent diabetes mellitus. *Osteoporos Int.* 1998;8(3):204-10.
342. Oh JY, Barrett-Connor E. Association between vitamin D receptor polymorphism and type 2 diabetes or metabolic syndrome in community-dwelling older adults: the Rancho Bernardo Study. *Metabolism.* 2002 Mar;51(3):356-9.
343. Bid HK, Konwar R, Aggarwal CG, Gautam S, Saxena M, Nayak VL, et al. Vitamin D receptor (FokI, BsmI and TaqI) gene polymorphisms and type 2 diabetes mellitus: a North Indian study. *Indian J Med Sci.* 2009 May;63(5):187-94.
344. Pratley RE, Thompson DB, Prochazka M, Baier L, Mott D, Ravussin E, et al. An autosomal genomic scan for loci linked to prediabetic phenotypes in Pima Indians. *J Clin Invest.* 1998 Apr 15;101(8):1757-64.
345. Hitman GA, Mannan N, McDermott MF, Aganna E, Ogunkolade BW, Hales CN, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms influence insulin secretion in Bangladeshi Asians. *Diabetes.* 1998 Apr;47(4):688-90.
346. Thomas GN, Tomlinson B, Critchley JA. Modulation of blood pressure and obesity with the dopamine D2 receptor gene TaqI polymorphism. *Hypertension.* 2000 Aug;36(2):177-82.
347. Renzaho AM, Halliday JA, Nowson C. Vitamin D, obesity, and obesity-related chronic disease among ethnic minorities: a systematic review. *Nutrition.* 2011 Sep;27(9):868-79.
348. Ye WZ, Reis AF, Dubois-Laforgue D, Bellanne-Chantelot C, Timsit J, Velho G. Vitamin D receptor gene polymorphisms are associated with obesity in type 2 diabetic subjects with early age of onset. *Eur J Endocrinol.* 2001 Aug;145(2):181-6.
349. Bell NH, Epstein S, Greene A, Shary J, Oexmann MJ, Shaw S. Evidence for alteration of the vitamin D-endocrine system in obese subjects. *J Clin Invest.* 1985 Jul;76(1):370-3.
350. Xu H, Xiong DH, Xu FH, Zhang YY, Lei SF, Deng HW. Association between VDR ApaI polymorphism and hip bone mineral density can be modified by body mass index: a study on postmenopausal Chinese women. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2005 Jan;37(1):61-7.
351. Ochs-Balcom HM, Chennamaneni R, Millen AE, Shields PG, Marian C, Trevisan M, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms are associated with adiposity phenotypes. *Am J Clin Nutr.* 2011 Jan;93(1):5-10.
352. Tworowska-Bardzinska U, Lwow F, Kubicka E, Laczanski L, Jedrzejuk D, Dunajska K, et al. The vitamin D receptor gene BsmI polymorphism is not associated with anthropometric and biochemical parameters describing metabolic syndrome in postmenopausal women. *Gynecol Endocrinol.* 2008 Sep;24(9):514-8.
353. Pilz S, Tomaschitz A, Marz W, Drechsler C, Ritz E, Zittermann A, et al. Vitamin D, cardiovascular disease and mortality. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2011 Nov;75(5):575-84.
354. Chen S, Glenn DJ, Ni W, Grigsby CL, Olsen K, Nishimoto M, et al. Expression of the vitamin d receptor is increased in the hypertrophic heart. *Hypertension.* 2008 Dec;52(6):1106-12.
355. Schnatz PF, Nudy M, O'Sullivan DM, Jiang X, Cline JM, Kaplan JR, et al. Coronary artery vitamin D receptor expression and plasma concentrations of vitamin D: their association with atherosclerosis. *Menopause.* 2012 May 21.
356. Yuan W, Pan W, Kong J, Zheng W, Szeto FL, Wong KE, et al. 1,25-dihydroxyvitamin D3 suppresses renin gene transcription by blocking the activity of the cyclic AMP response element in the renin gene promoter. *J Biol Chem.* 2007 Oct 12;282(41):29821-30.
357. Xiang W, Kong J, Chen S, Cao LP, Qiao G, Zheng W, et al. Cardiac hypertrophy in vitamin D receptor knockout mice: role of the systemic and cardiac renin-angiotensin systems. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2005 Jan;288(1):E125-32.

358. Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Dans T, Avezum A, Lanas F, et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet*. 2004 Sep 11-17;364(9438):937-52.
359. Van Schooten FJ, Hirvonen A, Maas LM, De Mol BA, Kleinjans JC, Bell DA, et al. Putative susceptibility markers of coronary artery disease: association between VDR genotype, smoking, and aromatic DNA adduct levels in human right atrial tissue. *FASEB J*. 1998 Oct;12(13):1409-17.
360. Kammerer CM, Dualan AA, Samollow PB, Perisse AR, Bauer RL, MacCluer JW, et al. Bone mineral density, carotid artery intimal medial thickness, and the vitamin D receptor BsmI polymorphism in Mexican American women. *Calcif Tissue Int*. 2004 Oct;75(4):292-8.
361. Laaksonen M, Karkkainen M, Outila T, Vanninen T, Ray C, Lamberg-Allardt C. Vitamin D receptor gene BsmI-polymorphism in Finnish premenopausal and postmenopausal women: its association with bone mineral density, markers of bone turnover, and intestinal calcium absorption, with adjustment for lifestyle factors. *J Bone Miner Metab*. 2002;20(6):383-90.
362. Ortlepp JR, Lauscher J, Hoffmann R, Hanrath P, Joost HG. The vitamin D receptor gene variant is associated with the prevalence of type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease. *Diabet Med*. 2001 Oct;18(10):842-5.
363. Ortlepp JR, von Korff A, Hanrath P, Zerres K, Hoffmann R. Vitamin D receptor gene polymorphism BsmI is not associated with the prevalence and severity of CAD in a large-scale angiographic cohort of 3441 patients. *Eur J Clin Invest*. 2003 Feb;33(2):106-9.
364. Shanker J, Maitra A, Arvind P, Nair J, Dash D, Manchiganti R, et al. Role of vitamin D levels and vitamin D receptor polymorphisms in relation to coronary artery disease: the Indian atherosclerosis research study. *Coron Artery Dis*. 2011 Aug;22(5):324-32.
365. Pan XM, Li DR, Yang L, Wang EY, Chen TY, Liu YJ, et al. No association between vitamin D receptor polymorphisms and coronary artery disease in a Chinese population. *DNA Cell Biol*. 2009 Oct;28(10):521-5.
366. St-Arnaud R, Messerlian S, Moir JM, Omdahl JL, Glorieux FH. The 25-hydroxyvitamin D 1-alpha-hydroxylase gene maps to the pseudovitamin D-deficiency rickets (PDDR) disease locus. *J Bone Miner Res*. 1997 Oct;12(10):1552-9.
367. Daiger SP, Schanfield MS, Cavalli-Sforza LL. Group-specific component (Gc) proteins bind vitamin D and 25-hydroxyvitamin D. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1975 Jun;72(6):2076-80.
368. White P, Cooke N. The multifunctional properties and characteristics of vitamin D-binding protein. *Trends Endocrinol Metab*. 2000 Oct;11(8):320-7.
369. Bouillon R, Van Assche FA, Van Baelen H, Heyns W, De Moor P. Influence of the vitamin D-binding protein on the serum concentration of 1,25-dihydroxyvitamin D₃. Significance of the free 1,25-dihydroxyvitamin D₃ concentration. *J Clin Invest*. 1981 Mar;67(3):589-96.
370. Haddad J. Traffic, binding and cellular access of vitamin D sterols. *Bone and Mineral Research*. 1987;5:291-305.
371. Verboven C, Rabijns A, De Maeyer M, Van Baelen H, Bouillon R, De Ranter C. A structural basis for the unique binding features of the human vitamin D-binding protein. *Nat Struct Biol*. 2002 Feb;9(2):131-6.
372. Hirschfeld J. The Gc-system. Immuno-electrophoretic studies of normal human sera with special reference to a new genetically determined system (Gc). *Prog Allergy*. 1962;6:155-86.
373. Cleve H. The variants of the group-specific component. A review of their distribution in human populations. *Isr J Med Sci*. 1973 Sep-Oct;9(9):1133-46.
374. Thomas WC, Jr., Morgan HG, Connor TB, Haddock L, Bills CE, Howard JE. Studies of antiricketic activity in sera from patients with disorders of calcium metabolism and preliminary observations on the mode of transport of vitamin D in human serum. *J Clin Invest*. 1959 Jul;38(7):1078-85.

375. Mikkelsen M, Jacobsen P, Henningsen K. Possible localization of Gc-System on chromosome 4. Loss of long arm 4 material associated with father-child incompatibility within the Gc-System. *Hum Hered.* 1977;27(2):105-7.
376. Braun A, Kofler A, Morawietz S, Cleve H. Sequence and organization of the human vitamin D-binding protein gene. *Biochim Biophys Acta.* 1993 Dec 14;1216(3):385-94.
377. Hirschfeld J, Beckman L. A new group-specific serum system (Gc-groups) in relation to blood and serum groups. *Acta Genet Stat Med.* 1960;10:48-53.
378. Constans J, Gouaillard C, Bouissou C, Dugoujon JM. Polymorphism of the vitamin D binding protein (DBP) among primates: an evolutionary analysis. *Am J Phys Anthropol.* 1987 Jul;73(3):365-77.
379. Cleve H, Constans J. The mutants of the vitamin-D-binding protein: more than 120 variants of the GC/DBP system. *Vox Sang.* 1988;54(4):215-25.
380. Kamboh MI, Ferrell RE. Ethnic variation in vitamin D-binding protein (GC): a review of isoelectric focusing studies in human populations. *Hum Genet.* 1986 Apr;72(4):281-93.
381. Braun A, Bichlmaier R, Cleve H. Molecular analysis of the gene for the human vitamin-D-binding protein (group-specific component): allelic differences of the common genetic GC types. *Hum Genet.* 1992 Jun;89(4):401-6.
382. Constans J, Viau M, Bouissou C. Affinity differences for the 25-OH-D₃ associated with the genetic heterogeneity of the vitamin D-binding protein. *FEBS Lett.* 1980 Feb 25;111(1):107-11.
383. Jiang H, Xiong DH, Guo YF, Shen H, Xiao P, Yang F, et al. Association analysis of vitamin D-binding protein gene polymorphisms with variations of obesity-related traits in Caucasian nuclear families. *Int J Obes (Lond).* 2007 Aug;31(8):1319-24.
384. Fang Y, van Meurs JB, Arp P, van Leeuwen JP, Hofman A, Pols HA, et al. Vitamin D binding protein genotype and osteoporosis. *Calcif Tissue Int.* 2009 Aug;85(2):85-93.
385. LaRonde-LeBlanc N, Resto M, Gerratana B. Regulation of active site coupling in glutamine-dependent NAD(+) synthetase. *Nat Struct Mol Biol.* 2009 Apr;16(4):421-9.
386. Belenky P, Bogan KL, Brenner C. NAD⁺ metabolism in health and disease. *Trends Biochem Sci.* 2007 Jan;32(1):12-9.
387. Rizzi M, Nessi C, Mattevi A, Coda A, Bolognesi M, Galizzi A. Crystal structure of NH₃-dependent NAD⁺ synthetase from *Bacillus subtilis*. *EMBO J.* 1996 Oct 1;15(19):5125-34.
388. Chuenchor W, Doukov TI, Resto M, Chang A, Gerratana B. Regulation of the intersubunit ammonia tunnel in *Mycobacterium tuberculosis* glutamine-dependent NAD⁺ synthetase. *Biochem J.* 2012 Apr 15;443(2):417-26.
389. Hara N, Yamada K, Terashima M, Osago H, Shimoyama M, Tsuchiya M. Molecular identification of human glutamine- and ammonia-dependent NAD synthetases. Carbon-nitrogen hydrolase domain confers glutamine dependency. *J Biol Chem.* 2003 Mar 28;278(13):10914-21.
390. Wang TJ, Zhang F, Richards JB, Kestenbaum B, van Meurs JB, Berry D, et al. Common genetic determinants of vitamin D insufficiency: a genome-wide association study. *Lancet.* 2010 Jul 17;376(9736):180-8.
391. Ahn J, Yu K, Stolzenberg-Solomon R, Simon KC, McCullough ML, Gallicchio L, et al. Genome-wide association study of circulating vitamin D levels. *Hum Mol Genet.* Jul 1;19(13):2739-45.
392. Engelman CD, Meyers KJ, Ziegler JT, Taylor KD, Palmer ND, Haffner SM, et al. Genome-wide association study of vitamin D concentrations in Hispanic Americans: the IRAS family study. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2010 Oct;122(4):186-92.
393. Robien K, Butler LM, Wang R, Beckman KB, Walek D, Koh WP, et al. Genetic and environmental predictors of serum 25-hydroxyvitamin D concentrations among middle-aged and elderly Chinese in Singapore. *Br J Nutr.* 2012 May 15:1-10.
394. McGrath JJ, Saha S, Burne TH, Eyles DW. A systematic review of the association between common single nucleotide polymorphisms and 25-hydroxyvitamin D concentrations. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2010 Jul;121(1-2):471-7.

395. Berry D, Hypponen E. Determinants of vitamin D status: focus on genetic variations. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2011 Jul;20(4):331-6.
396. Wolf M, Betancourt J, Chang Y, Shah A, Teng M, Tamez H, et al. Impact of activated vitamin D and race on survival among hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol*. 2008 Jul;19(7):1379-88.
397. Bhan I, Burnett-Bowie SA, Ye J, Tonelli M, Thadhani R. Clinical measures identify vitamin D deficiency in dialysis. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2010 Mar;5(3):460-7.
398. Jean G, Terrat JC, Vanel T, Hurot JM, Lorriaux C, Mayor B, et al. Daily oral 25-hydroxycholecalciferol supplementation for vitamin D deficiency in haemodialysis patients: effects on mineral metabolism and bone markers. *Nephrol Dial Transplant*. 2008 Nov;23(11):3670-6.
399. Velayoudom-Cephe FL, Larifla L, Donnet JP, Maimaitiming S, Deloumeaux J, Blanchet A, et al. Vitamin D deficiency, vitamin D receptor gene polymorphisms and cardiovascular risk factors in Caribbean patients with type 2 diabetes. *Diabetes Metab*. 2011 Jul 14.
400. Somjen D, Katzburg S, Stern N, Kohen F, Sharon O, Limor R, et al. 25 hydroxy-vitamin D(3)-1alpha hydroxylase expression and activity in cultured human osteoblasts and their modulation by parathyroid hormone, estrogenic compounds and dihydrotestosterone. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2007 Nov-Dec;107(3-5):238-44.
401. Gautier A, Bonnet F, Dubois S, Massart C, Grosheny C, Bachelot A, et al. Associations between visceral adipose tissue, inflammation and sex steroid concentrations in men. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2012 Apr 3.
402. Siiteri PK, Murai JT, Hammond GL, Nisker JA, Raymoure WJ, Kuhn RW. The serum transport of steroid hormones. *Recent Prog Horm Res*. 1982;38:457-510.
403. Daughaday WH. Steroid-protein interactions. *Physiol Rev*. 1959 Oct;39:885-902.
404. Mercier C, Alfsen A, Baulieu EE. [Proteins binding testosterone in the blood of pregnant women]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D*. 1967 Jan 4;264(1):122-4.
405. Murphy BE. Binding of testosterone and estradiol in plasma. *Can J Biochem*. 1968 Apr;46(4):299-302.
406. Walsh KA, Titani K, Takio K, Kumar S, Hayes R, Petra PH. Amino acid sequence of the sex steroid binding protein of human blood plasma. *Biochemistry*. 1986 Nov 18;25(23):7584-90.
407. Grishkovskaya I, Avvakumov GV, Sklenar G, Dales D, Hammond GL, Muller YA. Crystal structure of human sex hormone-binding globulin: steroid transport by a laminin G-like domain. *EMBO J*. 2000 Feb 15;19(4):504-12.
408. Hammond GL, Robinson PA, Sugino H, Ward DN, Finne J. Physicochemical characteristics of human sex hormone binding globulin: evidence for two identical subunits. *J Steroid Biochem*. 1986 Apr;24(4):815-24.
409. Khan MS, Knowles BB, Aden DP, Rosner W. Secretion of testosterone-estradiol-binding globulin by a human hepatoma-derived cell line. *J Clin Endocrinol Metab*. 1981 Aug;53(2):448-9.
410. Ritzen EM, French FS. Demonstration of an androgen binding protein (ABP) in rabbit testis: secretion in efferent duct fluid and passage into epididymis. *J Steroid Biochem*. 1974 Apr;5(2):151-4.
411. Hammond GL. Diverse roles for sex hormone-binding globulin in reproduction. *Biol Reprod*. 2011 Sep;85(3):431-41.
412. Hammond GL, Underhill DA, Rykse HM, Smith CL. The human sex hormone-binding globulin gene contains exons for androgen-binding protein and two other testicular messenger RNAs. *Mol Endocrinol*. 1989 Nov;3(11):1869-76.
413. Berube D, Seralini GE, Gagne R, Hammond GL. Localization of the human sex hormone-binding globulin gene (SHBG) to the short arm of chromosome 17 (17p12----p13). *Cytogenet Cell Genet*. 1990;54(1-2):65-7.

414. Rosner W, Hryb DJ, Khan MS, Nakhla AM, Romas NA. Sex hormone-binding globulin. Binding to cell membranes and generation of a second messenger. *J Androl.* 1992 Mar-Apr;13(2):101-6.
415. Lee IR, Dawson SA, Wetherall JD, Hahnel R. Sex hormone-binding globulin secretion by human hepatocarcinoma cells is increased by both estrogens and androgens. *J Clin Endocrinol Metab.* 1987 Apr;64(4):825-31.
416. Edmunds SE, Stubbs AP, Santos AA, Wilkinson ML. Estrogen and androgen regulation of sex hormone binding globulin secretion by a human liver cell line. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1990 Dec 10;37(5):733-9.
417. Clark JH, Peck EJ, Jr., Anderson JN. Oestrogen receptors and antagonism of steroid hormone action. *Nature.* 1974 Oct 4;251(5474):446-8.
418. Nisker JA, Hammond GL, Davidson BJ, Frumar AM, Takaki NK, Judd HL, et al. Serum sex hormone-binding globulin capacity and the percentage of free estradiol in postmenopausal women with and without endometrial carcinoma. A new biochemical basis for the association between obesity and endometrial carcinoma. *Am J Obstet Gynecol.* 1980 Nov 15;138(6):637-42.
419. Beck-Peccoz P, Roncoroni R, Mariotti S, Medri G, Marcocci C, Brabant G, et al. Sex hormone-binding globulin measurement in patients with inappropriate secretion of thyrotropin (IST): evidence against selective pituitary thyroid hormone resistance in nonneoplastic IST. *J Clin Endocrinol Metab.* 1990 Jul;71(1):19-25.
420. Toscano V, Balducci R, Bianchi P, Guglielmi R, Mangiantini A, Sciarra F. Steroidal and non-steroidal factors in plasma sex hormone binding globulin regulation. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1992 Oct;43(5):431-7.
421. [Detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults]. *Rev Panam Salud Publica.* 2001 May;9(5):338-44.
422. Hills SA, Balkau B, Coppack SW, Dekker JM, Mari A, Natali A, et al. The EGIR-RISC STUDY (The European group for the study of insulin resistance: relationship between insulin sensitivity and cardiovascular disease risk): I. Methodology and objectives. *Diabetologia.* 2004 Mar;47(3):566-70.
423. Balkau B, Charles MA, Drivsholm T, Borch-Johnsen K, Wareham N, Yudkin JS, et al. Frequency of the WHO metabolic syndrome in European cohorts, and an alternative definition of an insulin resistance syndrome. *Diabetes Metab.* 2002 Nov;28(5):364-76.
424. Odawara M, Yamashita K. Insulin resistance and WHO criteria for impaired glucose tolerance. *Lancet.* 1995 Feb 18;345(8947):450.
425. Consensus Development Conference on Insulin Resistance. 5-6 November 1997. American Diabetes Association. *Diabetes Care.* 1998 Feb;21(2):310-4.
426. Bloomgarden ZT. American Association of Clinical Endocrinologists (AACE) consensus conference on the insulin resistance syndrome: 25-26 August 2002, Washington, DC. *Diabetes Care.* 2003 Apr;26(4):1297-303.
427. Dimitriadis G, Mitrou P, Lambadiari V, Maratou E, Raptis SA. Insulin effects in muscle and adipose tissue. *Diabetes Res Clin Pract.* 2011 Aug;93 Suppl 1:S52-9.
428. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia.* 1985 Jul;28(7):412-9.
429. Laaksonen DE, Niskanen L, Punnonen K, Nyysönen K, Tuomainen TP, Salonen R, et al. Sex hormones, inflammation and the metabolic syndrome: a population-based study. *Eur J Endocrinol.* 2003 Dec;149(6):601-8.
430. Kalme T, Seppala M, Qiao Q, Koistinen R, Nissinen A, Harrela M, et al. Sex hormone-binding globulin and insulin-like growth factor-binding protein-1 as indicators of metabolic syndrome, cardiovascular risk, and mortality in elderly men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005 Mar;90(3):1550-6.
431. Haffner SM, Katz MS, Stern MP, Dunn JF. The relationship of sex hormones to hyperinsulinemia and hyperglycemia. *Metabolism.* 1988 Jul;37(7):683-8.

432. Pugeat M, Crave JC, Elmidani M, Nicolas MH, Garoscio-Cholet M, Lejeune H, et al. Pathophysiology of sex hormone binding globulin (SHBG): relation to insulin. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1991;40(4-6):841-9.
433. Haffner SM, Shaten J, Stern MP, Smith GD, Kuller L. Low levels of sex hormone-binding globulin and testosterone predict the development of non-insulin-dependent diabetes mellitus in men. MRFIT Research Group. Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Am J Epidemiol*. 1996 May 1;143(9):889-97.
434. Plymate SR, Jones RE, Matej LA, Friedl KE. Regulation of sex hormone binding globulin (SHBG) production in Hep G2 cells by insulin. *Steroids*. 1988 Oct;52(4):339-40.
435. Loukovaara M, Carson M, Adlercreutz H. Regulation of production and secretion of sex hormone-binding globulin in HepG2 cell cultures by hormones and growth factors. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995 Jan;80(1):160-4.
436. Birkeland KI, Hanssen KF, Torjesen PA, Vaaler S. Level of sex hormone-binding globulin is positively correlated with insulin sensitivity in men with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 1993 Feb;76(2):275-8.
437. Peiris AN, Stagner JL, Plymate SR, Vogel RL, Heck M, Samols E. Relationship of insulin secretory pulses to sex hormone-binding globulin in normal men. *J Clin Endocrinol Metab*. 1993 Feb;76(2):279-82.
438. Bonnet F, Balkau B, Malecot JM, Picard P, Lange C, Fumeron F, et al. Sex hormone-binding globulin predicts the incidence of hyperglycemia in women: interactions with adiponectin levels. *Eur J Endocrinol*. 2009 Jul;161(1):81-5.
439. Peter A, Kantartzis K, Machann J, Schick F, Staiger H, Machicao F, et al. Relationships of circulating sex hormone-binding globulin with metabolic traits in humans. *Diabetes*. 2010 Dec;59(12):3167-73.
440. Haffner SM, Karhapaa P, Mykkanen L, Laakso M. Insulin resistance, body fat distribution, and sex hormones in men. *Diabetes*. 1994 Feb;43(2):212-9.
441. Haffner SM. Sex hormone-binding protein, hyperinsulinemia, insulin resistance and noninsulin-dependent diabetes. *Horm Res*. 1996;45(3-5):233-7.
442. Haffner SM, Valdez RA, Morales PA, Hazuda HP, Stern MP. Decreased sex hormone-binding globulin predicts noninsulin-dependent diabetes mellitus in women but not in men. *J Clin Endocrinol Metab*. 1993 Jul;77(1):56-60.
443. Lindstedt G, Lundberg PA, Lapidus L, Lundgren H, Bengtsson C, Bjorntorp P. Low sex-hormone-binding globulin concentration as independent risk factor for development of NIDDM. 12-yr follow-up of population study of women in Gothenburg, Sweden. *Diabetes*. 1991 Jan;40(1):123-8.
444. Gabbay KH, Hasty K, Breslow JL, Ellison RC, Bunn HF, Gallop PM. Glycosylated hemoglobins and long-term blood glucose control in diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*. 1977 May;44(5):859-64.
445. Brand JS, Wareham NJ, Dowsett M, Folkard E, van der Schouw YT, Luben RN, et al. Associations of endogenous testosterone and SHBG with glycated haemoglobin in middle-aged and older men. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2011 May;74(5):572-8.
446. de Moor P, Joossens JV. An inverse relation between body weight and the activity of the steroid binding -globulin in human plasma. *Steroidologia*. 1970;1(3):129-36.
447. Akin F, Bastemir M, Kaptanoglu B. Relationship between insulin and sex hormone-binding globulin levels during weight loss in obese women. *Ann Nutr Metab*. 2007;51(6):557-62.
448. Espeland MA, Hogan PE, Fineberg SE, Howard G, Schrott H, Waclawiw MA, et al. Effect of postmenopausal hormone therapy on glucose and insulin concentrations. PEPI Investigators. Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions. *Diabetes Care*. 1998 Oct;21(10):1589-95.

449. Bonds DE, Lasser N, Qi L, Brzyski R, Caan B, Heiss G, et al. The effect of conjugated equine oestrogen on diabetes incidence: the Women's Health Initiative randomised trial. *Diabetologia*. 2006 Mar;49(3):459-68.
450. Kalish GM, Barrett-Connor E, Laughlin GA, Gulanski BI. Association of endogenous sex hormones and insulin resistance among postmenopausal women: results from the Postmenopausal Estrogen/Progestin Intervention Trial. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003 Apr;88(4):1646-52.
451. Longcope C, Herbert PN, McKinlay SM, Goldfield SR. The relationship of total and free estrogens and sex hormone-binding globulin with lipoproteins in women. *J Clin Endocrinol Metab*. 1990 Jul;71(1):67-72.
452. Selva DM, Hogeveen KN, Innis SM, Hammond GL. Monosaccharide-induced lipogenesis regulates the human hepatic sex hormone-binding globulin gene. *J Clin Invest*. 2007 Dec;117(12):3979-87.
453. Pugeat M, Moulin P, Cousin P, Fimbel S, Nicolas MH, Crave JC, et al. Interrelations between sex hormone-binding globulin (SHBG), plasma lipoproteins and cardiovascular risk. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1995 Jun;53(1-6):567-72.
454. Firtser S, Juonala M, Magnussen CG, Jula A, Loo BM, Marniemi J, et al. Relation of total and free testosterone and sex hormone-binding globulin with cardiovascular risk factors in men aged 24-45 years. The Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *Atherosclerosis*. 2012 May;222(1):257-62.
455. Pugeat M, Nader N, Hogeveen K, Raverot G, Dechaud H, Grenot C. Sex hormone-binding globulin gene expression in the liver: drugs and the metabolic syndrome. *Mol Cell Endocrinol*. 2010 Mar 5;316(1):53-9.
456. Azrad M, Gower BA, Hunter GR, Nagy TR. Intra-abdominal adipose tissue is independently associated with sex-hormone binding globulin in premenopausal women. *Obesity (Silver Spring)*. 2012 May;20(5):1012-5.
457. Akin F, Bastemir M, Alkis E, Kaptanoglu B. SHBG levels correlate with insulin resistance in postmenopausal women. *Eur J Intern Med*. 2009 Mar;20(2):162-7.

VIII.ANNEXES: LISTE DES TABLEAUX, ILLUSTRATIONS, ABREVIATIONS

- **Liste des figures**

Figure 1: Photolyse du 7DHC en pré-vitamine D3

Figure 2: Photobiologie de la vitamine D3 au niveau de la peau

Figure 3: Evolution des concentrations de 25(OH)D après administration de vitamine D2 ou D3

Figure 4: Rôle des cytochromes dans le métabolisme de la vitamine D au niveau de la peau

Figure 5: Rôle des différents cytochromes au niveau de la synthèse rénale et extrarénale de la 1,25(OH)D

Figure 6: Etapes de synthèse, effets biologiques et niveaux de régulation de la 1,25(OH)D

Figure 7: Résumé des effets principaux de FGF23 au niveau rénal

Figure 8: Cibles rénales (8A) et extra-rénales (8B) du FGF23

Figure 9: Résumé des mécanismes de l'insulinosécrétion impliquant la vitamine D

Figure 10: Situations d'hypovitaminose D et conséquences vasculaires

Figure 11: Domaines fonctionnels du VDR

Figure 12: Sites des polymorphismes principaux du gène codant pour le VDR

Figure 13: Structure du gène GC et variants Gc1F, Gc1S et Gc2

Figure 14: Réactions catalysées par la NADSYN1

Figure 15: Métabolisme de la vitamine D et place des variants génétiques

Figure 16: Structure tertiaire de la SHBG

Figure 17: Structure du gène de la SHBG

- **Liste des tableaux:**

Tableau 1: Dispositifs de dosage de la vitamine D en France

Tableau 2: Classification des atteintes osseuses associées à l'insuffisance rénale d'après le KDIGO

Tableau 3: Situations physiologiques et pathologiques associées à des variations plasmatiques de SHBG

Tableau 4: Normes des concentrations sériques de SHBG en fonction de l'âge et du sexe

- **Liste des abréviations**

1,25(OH)D: 1,25 hydroxyvitamine D

25(OH)D: 25-hydroxyvitamine D

7-DHC: 7-déhydrocholestérol

ABP: androgen binding protein

ADA : association américaine du diabète

AFSSAPS : agence française de sécurité sanitaire des produits de santé

ALB/AFP: albumine / alpha-fœtoprotéine

ANC: apports nutritionnels conseillés

ANREF: apports nutritionnels de référence

Anti GAD: anti glutamate acide décarboxylase

bHLH: basic helix-loop-helix

cGMP: cyclic guanosine monophosphate

CYP: cytochrome

DBP: vitamin D binding protein

DT2 : diabète de type 2

E₂ : œstradiol

ECaC: canal épithélial calcique

EGF: epidermal growth factor

EGIR: European group for the study of insulin resistance

EPIC: European prospective investigation into Cancer

FGF 23: fibroblastic growth factor 23

GAT: glutamines aminotransférases

GC: group component

GH: growth hormone (hormone de croissance)

HDL-CT: high-density lipoprotein - cholesterol

HNF-4: hepatocyte nuclear factor 4 gamma

HSP: heat Shock Proteins

HTA: hypertension artérielle

ICA: islet cell antibody (anticorps anti-îlots).

IDBPs: intra cellular vitamin D binding proteins

IMC: indice de masse corporelle

INVS: Institut de veille sanitaire

IOM: Institute of medicine

KDIGO: kidney disease improving global outcomes

LBD: ligand binding domain

LDL-CT: Low-Density Lipoprotein Cholestérol

LPL: lipoprotéine lipase

MAP: mitogen activated protein

MARRS: membrane-associated rapid response steroid binding protein

MSDA: metabolic syndrome, type II diabetes and atherosclerosis congress

NAD⁺: nicotinamide adénine di nucléotide

NADSYN1 : nicotinamide adénine dinucléotide synthétase 1

NCEP ATP III: national cholesterol education program

NHANES: national health nutrition examination survey

OMS: organisation mondiale de la Santé

PA: pression artérielle

PKC : protéine kinase C

PCR-RFLP: polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism

PPAR-RE: PPAR-response element

PPARs: Peroxisome-proliférateur receptor

PTH rp: parathyroid hormone-related peptides

PXR: pregnane X receptor

RAF kinase: rapidly accelerated fibrosarcoma kinase

RAP: receptor associated protein

ROS: reactive oxygen species

SBP: sex binding protein

SCF: scientific committee for Food

SHBG: sex hormone binding globulin

SNP: single nucleotide polymorphism

SOPK: syndrome des ovaires polykystiques

TeBP: Testosterone Binding Protein

TRPV5: Transient Receptor Potential channel Vanilloid subtype 5

TRPV6: Transient Receptor Potential channel Vanilloid subtype 6

UI: unités

UKPDS: United Kingdom Prospective Diabetes Study

UV: ultra-violets

VDBP: vitamin D binding protein

VDR: vitamin D receptor

VDRE: vitamin D receptor element

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

IX. GLOSSAIRE

Allèle: forme variante d'un gène au niveau d'un locus sur un chromosome. Dans nos cellules, chaque gène est présent sous forme de 2 allèles, l'un d'origine paternel et l'autre d'origine maternel. Des allèles différents sont associés ou responsable de propriétés fonctionnelles différentes de la protéine codée.

Calbindin: protéine retrouvée dans la cellule bêta des îlots de Langerhans pancréatiques, qui intervient comme facteur de régulation de la libération d'insuline en modifiant les flux calciques.

Cholécalciférol: forme D3 de la vitamine D.

Cohorte EPIC-Norfolk: cohorte formée à partir de la population de Norfolk (en Virginie, Etats-Unis) pour l'étude européenne sur le cancer (EPIC).

CYP24A1: cytochrome ou enzyme 24-hydroxylase rénale.

CYP27B1: cytochrome ou enzyme 1-alpha-hydroxylase rénale.

Déséquilibre de liaison: condition dans laquelle les fréquences des haplotypes dans une population s'écartent des valeurs qu'elles auraient eues si les allèles des loci définissant les haplotypes étaient combinés au hasard.

Enzyme de restriction: enzymes qui reconnaissent une séquence spécifique de l'ADN et coupent l'ADN à ce site. Les variations génétiques de ce site sont les RFLP, utilisés comme marqueurs pour les études génétiques.

Ergocalciférol: forme D2 de la vitamine D.

Génotype: ensemble de l'information génétique portée par les gènes (allèles paternels et maternels) et exprimée ou non sous forme de protéines.

GRIO : questionnaire du groupe de recherche sur les ostéoporoses, qui permet l'évaluation de l'apport alimentaire en calcium et vitamine D.

Haplotype: ensemble de marqueurs génétiques présents sur un chromosome. Certains haplotypes peuvent être en déséquilibre de liaison.

HOMA-IR : index d'insulinorésistance calculé selon la formule suivante : [insuline à jeun (mU/ml) x glucose à jeun (mmol/l)/22,5].

HSP (heat shock proteins ou protéines de choc thermique) : protéines chaperonnes caractérisée par leur inductibilité par la chaleur. Elles interviennent dans la protection, le maintien et la régulation des fonctions des protéines auxquelles elles sont associées.

IMC : l'indice de masse corporelle est obtenu par le rapport Poids (Kg) /Taille (cm)².

Intron : région de l'DNA où le gène n'est pas traduit en protéine (régions non codantes). Ce sont des transcrits de l'ARNm, enlevés par épissage lors de la maturation de l'ARN. Après épissage, l'ARNm se compose uniquement de séquences traduites en protéine et appelées exons.

Involucrine: protéine majeure de la couche cornée des kératinocytes épidermiques.

Kinases RAF: enzyme capable de modifier chimiquement des protéines en leur ajoutant des groupements de phosphate. Elle appartient à la famille de trois sérine- thréonine kinases spécifiques participant à des cascades de signaux intracellulaires responsables de la prolifération ou de la différenciation cellulaire.

Locus : emplacement physique précis et invariable sur un chromosome.

MAP (mitogen activated protein) : protéines associées aux microtubules.

MAP-kinases: protéine-kinases qui catalysent la phosphorylation des protéines MAP. On les désigne aussi par le sigle ERK (*extracellular signal regulated kinase*).

Mégaline: protéine située à la surface des cellules du tube contourné proximal du rein. Elle facilite l'endocytose du complexe vitamine D/VDR.

NCEP ATP III: National Cholesterol Education Program correspondant au programme de lutte contre le cholestérol aux Etats Unis.

NPT2b: co-transporteur sodium–phosphate.

Phénotype: caractéristique observable d'un individu.

Polymorphismes: variations dans la séquence de l'ADN situées au niveau d'un locus.

RAF kinase (Rapidly Accelerated Fibrosarcoma kinase): protéines de la famille des serine/threonine kinases, qui participent à la transmission des signaux intracellulaires de la voie RAS-RAF-MEK-ERK.

RANKL (receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand): cytokine qui stimule la résorption osseuse par les ostéoclastes.

rs: définit l'origine des variants alléliques pour chaque SNP.

Single nucleotide polymorphism (SNP): variation simple d'une paire de base (substitution nucléotidique) qui se produit dans l'ADN humain à une fréquence d'une fois toutes les 1000 bases. Ces variations peuvent être utilisées comme marqueurs pour des études génétiques. La grande majorité des SNP est silencieuse (sans signification fonctionnelle). Les SNP dans les régions codantes d'un gène pourraient modifier la structure des protéines et/ou leur fonction.

SKIP: protéines impliquées dans de nombreuses cascades de signalisation cellulaire conduisant à la prolifération, l'apoptose, la différenciation, la sécrétion, le trafic vésiculaire et la mobilité cellulaire. Une surexpression de SKIP pourrait jouer un rôle de régulateur négatif dans la voie de signalisation de l'insuline.

Structure triène: hydrocarbure ayant trois liaisons éthylénique.

TRPV6 (Transient receptor potential vanilloid type 6) : canal ionique de la membrane cellulaire de l'épithélium intestinal, dont l'expression est régulée par la 1,25(OH)D.

UKPDS (United Kingdom Prospective Diabetes Study) : L'UKPDS est l'étude la plus importante sur le diabète en terme de durée (plus de 20 ans) et de nombre de sujets recrutés (plus de 5 000). Elle a démontré que l'amélioration du contrôle glycémique diminuait les complications micro-vasculaires de 25 %.

α -klotho: protéine exprimé au niveau des tubules distaux du rein et impliquée dans la régulation de l'activité de différentes protéines de surface cellulaire.

X. LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

- **FL Vélayoudom-Céphise**, J Plumasseau, L Corvo, V Chingan, J Bangou, P Thicot, C Massart, JP Donnet, L Foucan. Profil métabolique et statut vitaminique D d'une population afro-caribéenne non diabétique. Société Francophone de Diabétologie (Nice 2012), publié dans Diabetes Metabolism spécial issue, Mars 2012, P 125.
- **FL Velayoudom**, L Larifla, J.P Donnet, S Maimaitiming, J Deloumeaux, A Blanchet, C Messerschmitt, S Benabdallah, C Massart, S Merle, R Chout, L Foucan. Prévalence du déficit en vitamine D dans une population caribéenne de diabétique de type 2 : association aux facteurs de risque cardiovasculaire. Société Francophone de Diabétologie (Genève 2011), publié dans Diabetes Metabolism spécial issue, Mars 2011, P0036.
- **F-L.Vélayoudom-Céphise**, L.Larifla, J-P. Donnet, S. Maimaitiming, J.Deloumeaux, A.Blanchet, C.Massart, Naima Munoz-Bellili, S.Merle, R. Chout, F.Bonnet, L.Foucan. Vitamin D deficiency, vitamin D receptor gene polymorphisms and cardiovascular risk factors in Caribbean patients with type 2 diabetes. Diabetes & Metabolism 2011. 37(6):540-5.
- F Bonnet, **FL Vélayoudom-Céphise**, D Simon, C Lange, C Massart, B Balkau, PH Ducluzeau. Corrélation inverse entre la SHBG (sex hormon binding globulin), la glycémie à jeun et l'HbA1C: effet indépendant du contenu intra-hépatique en graisses. Société Francophone de Diabétologie (Nice 2012), CO 27.
- **FL Velayoudom**, C Messerschmitt, L Larifla, S Maimaitiming, S Benabdallah, A Blanchet, P Kangambega, J Bangou, J Deloumeaux, S Merle, J.P Donnet, C Massart, F Bonnet, L Foucan. Prévalence du déficit en vitamine D et étude de 2 polymorphismes du récepteur de la vitamine D chez des diabétiques de type 2 en Guadeloupe : association à l'IMC. 11èmes journées thématiques de Biologie Médicale de la Guadeloupe, Décembre 2010.
- L. Foucan, **FL Velayoudom**, S. Maimaitiming, J Deloumeaux, C Massart, J.P Donnet. Obésité, déficit en vitamine D et effets des polymorphismes du gène du récepteur de la

vitamine D chez des sujets diabétiques de type 2 en Guadeloupe. IVème Congrès international d'épidémiologie, Marseille, Septembre 2010.

- **FL Velayoudom**, C Messerschmitt, L Larifla, S Maimaitiming, S Benabdallah, A Blanchet, P Kangambega, J Deloumeaux, S Merle, J.P Donnet, C Massart, F Bonnet, L Foucan. Associations between Obesity, Vitamin D Deficiency, Vitamin D receptor (VDR) polymorphisms in Caribbean type 2 diabetic subjects. Congrès de la MSDA (Metabolic Syndrome, type II Diabetes and Atherosclerosis congress, 7th Edition), Marrakesh, Mai 2010, P30.

- F.Bonnet, **FL. Vélayoudom Céphise**, A. Gautier, S. Dubois, C. Massart, A.Camara, L. Larifla, B. Balkau, PH Ducluzeau. Sexual steroids, intra-hepatic fat and FGF-21 in the association between SHBG and metabolic features. Article en cours de soumission à la revue « European Journal of Endocrinology ».

- **F-L Vélayoudom-Céphise**, J. Ducros, H.Mérault, L. Harrami, L. Foucan. 25(OH)D, 1,25(OH)D and metabolic features in Afro-Caribbean patients undergoing hemodialysis. Article soumis à la revue « Annals of Nutrition and Metabolism ».

- L. Foucan, **FL Vélayoudom-Céphise**, L Larifla, C Armand, J.Deloumeaux, C Fagour, J Bangou, H Merault, M Portlis, J Plumasseau, L Liu, F Bonnet, J Ducros. Relation between Polymorphisms in GC and NADSYN1 genes and Overweight, Dyslipidemia, and Vitamin D status in Non-diabetics. Article soumis à la revue « Obesity ».

Profil métabolique associé au statut en vitamine D et polymorphismes des gènes codant son récepteur et son transporteur spécifique dans une population Caraïbienne.

Paramètres associés à la « Sex Hormone Binding Globulin » dans une population dysmétabolique Caucásienne.

En Guadeloupe, la prévalence du diabète est deux fois plus élevée qu'en France hexagonale, avec une prédominance féminine. En dehors des facteurs environnementaux, la vitamine D et certains polymorphismes de gènes impliqués dans son métabolisme seraient associés à un risque de pathologies métaboliques. Les androgènes sont également associés aux anomalies du métabolisme glucidique, soit directement, soit via leur transporteur SHBG (Sex Hormone Binding Protein).

Nous avons émis les hypothèses de recherche suivantes :

1/ le statut en vitamine D et les polymorphismes des gènes impliqués dans son métabolisme pourraient être associés aux paramètres métaboliques chez des sujets Afro-Caraïbéens (AC). Ils expliqueraient l'importance des pathologies cardiométaboliques en Guadeloupe.

2/ la SHBG pourrait être associée aux anomalies du métabolisme glucidique, indépendamment des stéroïdes sexuels.

Nos travaux sont présentés dans 4 études. Nous avons mis en évidence une prévalence élevée du déficit en vitamine D chez les sujets AC diabétiques de type 2. Nous avons trouvé une association significative entre le statut vitaminique D et le risque cardiométabolique chez ces sujets, mais aussi dans une population de sujets en hémodialyse chronique. Les polymorphismes des gènes impliqués dans le métabolisme de la vitamine D sont aussi associés à ce risque. Chez les sujets dysmétaboliques, une relation entre la SHBG, la graisse intra-hépatique, les hépatokines et les paramètres métaboliques a été mise en évidence, indépendamment des stéroïdes sexuels. En conclusion, la vitamine D et la SHBG pourraient être des marqueurs d'intérêt pour le dépistage des sujets à haut risque cardiométabolique.

Mots-clés : vitamine D, *VDR*, *GC*, *NADSYN1*, polymorphismes génétiques, SHBG, diabète de type 2, risque cardiométabolique

Metabolic profile associated with vitamin D status and polymorphisms in the vitamin D receptor and transporter genes in a Caribbean population Parameters associated with the "Sex Hormone Binding Globulin" in a dysmetabolic Caucasian population

In Guadeloupe, the prevalence of diabetes is two times higher than in Metropolitan France, with a female predominance. Apart from environmental factors, vitamin D and polymorphisms of genes involved in vitamin D metabolism would be associated with increased risk of metabolic diseases. Androgens are also associated with abnormal glucose metabolism, directly or through the Sex Hormone Binding Protein (SHBG).

Our main hypotheses were:

1/ Vitamin D status and polymorphisms of genes involved in its metabolism may be associated with metabolic parameters in Afro-Caribbean (AC). They could explain the importance of cardiometabolic diseases in Guadeloupe.

2/ SHBG may be associated with abnormal glucose metabolism, independently of sex steroids. Our research is presented in four studies. We have demonstrated a high prevalence of vitamin D deficiency in AC patients with type 2 diabetes. We found a significant association between vitamin D status and cardiometabolic risk in these subjects, but also in a population of patients undergoing in chronic hemodialysis. Polymorphisms in genes involved in vitamin D metabolism are also associated with this risk. In dysmetabolic patients, a relationship between SHBG, intrahepatic fat, hépatokines and metabolic parameters was demonstrated, independently of sex steroids hormones. In conclusion, vitamin D and SHBG may be markers of interest for screening patients at high cardiometabolic risk.

Keywords: vitamin D, *VDR*, *GC*, *NADSYN1*, genetic polymorphisms, SHBG, type 2 diabetes, cardiometabolic risk