

## Effets des métabolites de la vitamine D<sub>3</sub> sur les activités phosphatasiques de l'os

par Michèle LIEBERHERR, Michèle GARABEDIAN, Huguette GUILLOZO,  
Sonia BALSAN

Laboratoire des Tissus calcifiés (CNRS ER 126 et INSERM U. 30)  
Hôpital des Enfants Malades 149, rue de Sèvres 75015 Paris, France.

---

**Summary.** *Effects of vitamin D<sub>3</sub> metabolites on bone phosphatasic activities.*

The effects of acute or chronic administration of small doses (130 pmole) of 25-hydroxycholecalciferol, 24,25-dihydroxycholecalciferol, 1,25-dihydroxycholecalciferol on rat calvaria acid and alkaline phosphatase activities were investigated in weanling male albino Wistar rats raised on a vitamin D-deprived calcium-poor diet. The results indicate that each of these active metabolites had a different effect on calvaria phosphatase activities. 25-hydroxycholecalciferol promoted a significant increase, and 24,25-dihydroxycholecalciferol a decrease in the enzymatic activities. In 1,25-dihydroxycholecalciferol-treated animals pyrophosphatases were lower after one injection, but they did not differ from that of ethanol-injected control rats after seven daily doses. The observed modifications did not seem to be related to changes in serum calcium and/or phosphorus concentrations. A second set of experiments was designed to test the *in vitro* effects of these vitamin D<sub>3</sub> metabolites on normal rat calvaria phosphatases. The results showed that 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> and 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> at a 3.10<sup>-7</sup> M concentration significantly increased acid and alkaline phosphatase activities, while 25-(OH)D<sub>3</sub> had no activity at the same concentration.

---

### Introduction.

La majorité des travaux concernant l'activité biologique de la vitamine D et de ses dérivés porte sur les systèmes contrôlant l'homéostasie phosphocalcique (Deluca, 1976 ; Garabedian *et al.*, 1976 ; Kodiceck, 1974 ; Norman et Henry, 1974). L'os étant un des organes « cibles » de la vitamine D (Raisz *et al.*, 1972 ; Reynolds, Holick et Deluca, 1973), plusieurs auteurs ont utilisé les variations des activités phosphatasiques acides et alcalines de l'os comme un témoin de l'influence de substances telles que la parathormone (Tolnai, 1968 ; Vaes, 1968), la calcitonine (Messer *et al.*, 1973) et la vitamine A (Fell et Dingle, 1963) sur ce tissu. Ce modèle expérimental n'a pas encore été utilisé pour étudier l'action des métabolites de la vitamine D<sub>3</sub>.

Le présent travail comporte deux parties :

— l'étude des modifications des phosphatases acides et alcalines de l'os après administration *in vivo* de dose unique ou de doses répétées de 25-(OH)D<sub>3</sub>, 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>

ou de 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> à des rats soumis à un régime pauvre en calcium et sans vitamine D ;

— l'étude de l'action *in vitro* de ces métabolites sur les calvariums de rats âgés de 3 à 5 jours.

### Matériel et méthodes.

*Animaux.* — Pour les expériences *in vivo*, des rats Wistar au sevrage ont reçu un régime sans vitamine D contenant 0,30 p. 100 de phosphore et 0,47 p. 100 de calcium, pendant deux semaines, puis un régime pauvre en calcium (0,02 p. 100) et normal en phosphore (0,30 p. 100) (Suda *et al.*, 1970) pendant le temps de l'expérience. Après 5 jours de ce régime, deux types d'expériences ont été faites : 1) les rats ont reçu une seule injection i. p. de 25-(OH)D<sub>3</sub>, 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (130 pmoles dans 0,05 ml d'éthanol) ou d'éthanol seul (0,05 ml). 2) les animaux ont reçu quotidiennement pendant 7 jours 130 pmoles d'un des trois métabolites ou de l'éthanol.

Pour les expériences *in vitro*, nous avons utilisé des calvariums prélevés sur des rats Wistar normaux âgés de 3 à 5 jours.

*Métabolites de la vitamine D<sub>3</sub>.* — Les métabolites étudiés 25-(OH)D<sub>3</sub>, 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> et 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> d'origine synthétique ont été utilisés en solution dans l'éthanol. Dans toutes les expériences, *in vivo* et *in vitro*, les groupes témoins ont été traités avec le solvant éthanol.

*Expérimentation.* — 1) 24 h après la dernière injection des dérivés de la vitamine D<sub>3</sub>, les animaux ont été décapités. Le sang a été prélevé et centrifugé individuellement pour chaque rat. Les calvariums ont été immédiatement prélevés et immergés dans du saccharose 0,25 M. La calcémie a été déterminée par complexométrie (Marius Calcium Titrator) ; la phosphorémie a été mesurée par la méthode de Fiske et Subbarow adaptée à l'autoanalyseur Technicon. 2) Pour l'étude *in vitro*, les calvariums prélevés stérilement ont été incubés dans 4 ml de milieu Dulbecco, à 37 °C, sous atmosphère contrôlée (air : 95 p. 100, Co<sub>2</sub> : 5 p. 100), en présence des métabolites, d'éthanol, d'extrait parathyroïdien (PTE, Eli Lilly), de vitamine A (Palmitate, Hoffmann-La Roche) ou d'héparine (Choay).

*Préparation des homogénats de tissu osseux et dosage des phosphatases.* — Les calvariums de 3 rats dans chaque groupe ont été préparés, homogénéisés et centrifugés (Lieberherr *et al.*, 1973). « L'extrait cytoplasmique » obtenu a été utilisé pour la mesure des activités totales des phosphatases acides et alcalines. Les techniques utilisées pour ces dosages ont déjà été décrites (Vreven *et al.*, 1973). Pour la détermination des activités phosphatasiques acides, 3 substrats ont été utilisés : le β-glycérophosphate, le pyrophosphate inorganique et la caséine. Pour la phosphatase alcaline, le pyrophosphate inorganique a été utilisé comme substrat.

Les activités enzymatiques sont exprimées en unités/g de tissu, une unité correspondant à la décomposition d'1 μmole de substrat par mn. Certains résultats sont donnés en pourcentage par rapport aux valeurs obtenues chez les rats traités seulement à l'éthanol. Le test de Student a été utilisé pour l'étude statistique.

## Résultats.

### 1. Etude in vivo.

— Effets observés après une dose (130 pmoles de 25-(OH)D<sub>3</sub>, 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> ou 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. 24 h après l'administration de 25-(OH)D<sub>3</sub> ou de 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, les calcémies sont plus élevées ( $p < 0,001$ ) et les phosphorémies ( $p < 0,001$ ) plus basses chez les rats traités, comparativement aux animaux témoins. Ces deux paramètres ne sont pas modifiés chez les rats traités par le 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (tabl. 1). Après une injection de

TABLEAU 1

Calcémies (Ca) et phosphorémies (Pi) (mg/100 ml) observées 24 h après administration des métabolites de la vitamine D<sub>3</sub> (130 pmoles/j) ou du solvant à des rats soumis à un régime pauvre en calcium et sans vitamine D.

	130 pmoles			130 pmoles/j/7 j		
	Nombre d'animaux	Ca	Pi	Nombre d'animaux	Ca	Pi
Ethanol.....	6	6,9 ± 0,2	10,5 ± 0,3	12	7,1 ± 0,1	9,2 ± 0,2
25-(OH)D <sub>3</sub> .....	6	9,3 ± 0,3	8,2 ± 0,5	12	9,7 ± 0,1	7,9 ± 0,2
		$p < 0,001$	$p < 0,001$		$p < 0,001$	$p < 0,001$
24,25-(OH) <sub>2</sub> D ...	6	7,7 ± 0,5	9,4 ± 0,7	11	7,9 ± 0,2	8,7 ± 0,2
		n. s.	n. s.		$p < 0,01$	n. s.
1,25-(OH) <sub>2</sub> D ....	6	10,1 ± 0,2	8,8 ± 0,2	11	10,1 ± 0,1	8,5 ± 0,1
		$p < 0,001$	$p < 0,001$		$p < 0,001$	$p < 0,002$

Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart type.

TABLEAU 2

Effets d'une dose ou de doses répétées (7 jours) (130 pmoles) des métabolites de la vitamine D<sub>3</sub> sur les activités phosphatases mesurées dans les calvariums de rats

	Activités phosphatases des calvariums (en pourcentage des valeurs trouvées chez les rats témoins)					
	25-(OH)D <sub>3</sub>		24,25-(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>		1,25-(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	
	1 dose	7 doses	1 dose	7 doses	1 dose	7 doses
Pyrophosphatase alcaline (1)	124 ± 1,6 $p < 0,001$	130 ± 10 $p < 0,001$	89 ± 1,1 $p < 0,001$	72 ± 5 $p < 0,001$	80 ± 1,6 $p < 0,001$	99 ± 3 n. s.
Pyrophosphatase acide (1)	153 ± 10 $p < 0,001$	138 ± 1 $p < 0,001$	87 ± 0,1 $p < 0,001$	54 ± 0,5 $p < 0,001$	83 ± 5,8 $p < 0,02$	110 ± 8 n. s.
β-glycérophosphatase acide (1)	130 ± 1 $p < 0,001$	87 ± 13 n. s.	102 ± 4,3 n. s.	72 ± 3 $p < 0,001$	71 ± 6,5 $p < 0,001$	38 ± 4 $p < 0,001$
Phosphoprotéine-phosphatase acide (1)	124 ± 0,5 $p < 0,001$	166 ± 4 $p < 0,001$	87 ± 1,1 $p < 0,001$	43 ± 9 $p < 0,001$	97 ± 3,8 n. s.	122 ± 4 $p < 0,001$

Les valeurs représentent la moyenne ± écart type de la moyenne.

(1) Nombre d'animaux : 12.

25-(OH)D<sub>3</sub>, toutes les activités phosphatasiques sont augmentées. Par contre pour les rats traités par le 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> ou le 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, les activités phosphatasiques alcalines et la plupart des activités phosphatasiques acides sont diminuées (tabl. 2).

— *Effets après 7 jours de traitement par le 25-(OH)D<sub>3</sub>, le 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> ou le 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (130 pmoles/j).* Les calcémies, 24 h après la dernière injection, sont significativement plus élevées dans les trois groupes de rats traités par les métabolites (tabl. 1). L'administration répétée de 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> n'a pas d'effet sur la phosphorémie alors que 7 injections de 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> ou de 25-(OH)D<sub>3</sub> diminuent significativement la phosphorémie. Comme on le voit sur le tableau 2, excepté pour la β-glycérophosphatase, toutes les activités phosphatasiques sont significativement plus élevées chez les rats ayant reçu 7 injections de 25-(OH)D<sub>3</sub> que chez les contrôles traités par l'éthanol. La diminution observée après une injection de 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> est plus accentuée après administration répétée de ce métabolite. Pour le 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, les résultats obtenus sont différents après 7 doses : les activités phosphatasiques acides et alcalines ne sont pas significativement inférieures à celles de rats témoins sauf pour la β-glycéro-phosphatase acide dont l'activité demeure basse.

2. *Action in vitro des métabolites de la vitamine D<sub>3</sub> sur les activités phosphatasiques acides et alcalines des calvariums.* Les résultats sont différents de ceux de l'expérience précédente. Les calvariums incubés pendant 24 h en présence de 25-(OH)D<sub>3</sub> à la concentration de 3.10<sup>-7</sup> M ont des activités phosphatasiques non significativement différentes de

TABLEAU 3

*Effets « in vitro » des métabolites de la vitamine D, du PTE, de la vitamine A et de l'héparine sur les activités phosphatasiques des calvariums de rats*

	Nombre d'expériences	Activité totale (unités/g de tissu)			
		β-glycérophosphatase acide	Phosphoprotéine-phosphatase acide	Pyrophosphatase acide	Pyrophosphatase alcaline
Témoins	8	16,5 ± 1,5	154 ± 23	60,4 ± 12,6	36 ± 4
25-(OH)D <sub>3</sub> (3.10 <sup>-7</sup> M)	6	19,2 ± 0,9 n.s.	172,3 ± 17 n.s.	81,5 ± 15 n.s.	51,9 ± 11 n.s.
1,25-(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> (3.10 <sup>-7</sup> M)	4	21,2 ± 0,2 p < 0.05 *	239 ± 20 p < 0.05	109,6 ± 4,3 p < 0.05	63 ± 9,5 p < 0.01
24,25-(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> (3.10 <sup>-7</sup> M)	4	21,9 ± 2,1 p < 0.05	206,6 ± 24 n.s.	110,6 ± 15,9 p < 0.05	60 ± 9,6 p < 0.05
PTE (1 u/ml)	11	23,8 ± 1,1 p < 0.001	254,8 ± 18,5 p < 0.001	116 ± 8,3 p < 0.001	61,3 ± 4,3 p < 0.001
Vitamine A (27 u/ml)	4	22,9 ± 0,02 p < 0.02	228,2 ± 1,2 p < 0.05	110 ± 0,6 p < 0.02	62,7 ± 0,5 p < 0.001
Héparine 5 u/ml)	4	22,7 ± 0,01 p < 0.02	—	112,8 ± 0,4 p < 0.02	61,8 ± 0,2 p < 0.001

\* Valeurs significativement différentes de celles trouvées dans les calvariums témoins.

celles des témoins. Le  $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$  et le  $24,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$  à la concentration de  $3.10^{-7}$  M provoquent une augmentation significative des activités phosphatasiques acides et alcalines (tabl. 3).

Nous avons comparé ces résultats à ceux obtenus avec l'extrait parathyroïdien, la vitamine A et l'héparine, substances dont l'action sur l'os est connue. L'extrait parathyroïdien (PTE Eli Lilly), à la concentration de 1 u USP/ml dans le milieu, induit une forte augmentation de ces activités enzymatiques (tabl. 3). Des résultats comparables sont obtenus en présence de vitamine A (palmitate ; 27 u USP/ml) et d'héparine (Choay ; 5 u USP/ml).

## Discussion.

Les résultats des expériences faites *in vivo* montrent qu'à des doses physiologiques aussi faibles que 130 pmoles, le  $25\text{-(OH)D}_3$ , le  $24,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$  et le  $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$  ont une action différente sur les activités phosphatasiques acides et alcalines mesurées dans les calvariums de rats soumis à un régime pauvre en calcium (0.02 p. 100) et sans vitamine D : a) Après une injection ou 7 injections de  $25\text{-(OH)D}_3$ , les activités phosphatasiques sont significativement augmentées sauf celle de la  $\beta$ -glycérophosphatase ; b) Pour le  $24,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ , une diminution des activités est observée après une dose et persiste après 7 doses ; c) Le  $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$  provoque une diminution de ces activités après une seule dose. Cet effet s'accroît seulement pour la  $\beta$ -glycérophosphatase après 7 doses. Les autres activités phosphatasiques diffèrent peu de celles des témoins.

D'après ces résultats, il semble que le  $25\text{-(OH)D}_3$  ait une action différente de celle du  $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$  ou du  $24,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$  dans ce système. Ce fait suggère que le  $25\text{-(OH)D}_3$  à des doses physiologiques peut avoir une influence sur l'activité cellulaire, indépendamment de sa conversion en ses dérivés dihydroxylés.

Les modifications des activités phosphatasiques observées dans les différents groupes de rats traités par les métabolites de la vitamine  $\text{D}_3$ , ne semblent pas liées aux changements de la calcémie et/ou de la phosphorémie. Si le  $25\text{-(OH)D}_3$  et le  $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$  augmentent la calcémie et diminuent la phosphorémie de façon similaire, leur action sur les phosphatases osseuses est différente. Après 7 doses quotidiennes de  $24,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ , les phosphorémies des animaux ne sont pas significativement différentes de celles de rats témoins, alors que les activités phosphatasiques sont plus basses chez les animaux traités par le  $24,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ .

Les résultats des expériences *in vitro* montrent que les trois métabolites de la vitamine D, utilisés à la concentration de  $3.10^{-7}$  M, ont des effets différents de ceux observés dans l'étude *in vivo*. Le  $25\text{-(OH)D}_3$  n'a aucune action sur les activités phosphatasiques acides et alcalines, alors que le  $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$  et le  $24,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$  stimulent ces activités enzymatiques. Les activités stimulantes du  $24,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$  et du  $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$  sont comparables en intensité à celles de l'extrait parathyroïdien, de l'héparine ou de la vitamine A ajoutés *in vitro* dans le milieu d'incubation. Cependant, le mécanisme d'action de ces dihydroxymétabolites *in vitro* n'est pas connu. De même que pour le  $25\text{-(OH)D}_3$ , les effets observés *in vivo* du  $24,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$  et du  $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$  ne sont pas retrouvés *in vitro*, laissant supposer que leur activité *in vivo* nécessite d'autres facteurs

absents dans le milieu d'incubation. Les animaux utilisés pour l'étude *in vitro* sont normaux, alors que ceux de l'expérience *in vivo* sont en situation d'hyperparathyroïdie après 3 semaines de régime, sans vitamine D et pauvre en calcium. L'hormone parathyroïdienne, dont les interactions avec la vitamine D sont nombreuses, est un puissant activateur des phosphatases osseuses. De plus, certains auteurs ont montré que la présence de 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> et/ou de 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> pouvait moduler la fonction des glandes parathyroïdiennes (Care *et al.*, 1976 ; Henry *et al.*, 1975). L'activité *in vivo* du 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, et à un moindre degré du 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, pourrait faire intervenir une action sur la sécrétion de l'hormone parathyroïdienne. Enfin, des travaux préliminaires laissent envisager une interaction de l'extrait parathyroïdien et du 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> dans le calvarium même.

Réunion Groupe Développement INRA/Productions animales  
Montpellier, 17-18-mai 1977.

### Références

- CARE A. D., BATES R. F. L., PICKARD D. W., PEACOCK M., TOMLINSON S., O'RIORDAN J. L. H., MAWER E. B., TAYLOR C. M., DELUCA H. F., NORMAN A. W., 1976. The effects of vitamin D metabolites and their analogues on the secretion of parathyroid hormone. *Calcif. Tiss. Res.*, suppl. **21**, 142 s-147 s.
- DELUCA H. F., 1976. Recent advances in our understanding of the vitamin D endocrine system. *J. Lab. clin. Med.*, **87**, 7-26.
- FELL H. B., DINGLE G. T., 1963. Studies on the mode of action of excess vitamin A.6. Lysosomal protease and the degradation of cartilage matrix. *Biochem. J.*, **87**, 403-408.
- GARABEDIAN M., PEZANT E., MIRAVET L., FELLOTT C., BALSAN S., 1976. 1,25-dihydroxycholecalciferol effect on serum phosphorus homeostasis in rats. *Endocrinology*, **98**, 794-799.
- HENRY H. L., TAYLOR A. N., WECKSLER W. R., NORMAN A. W., 1975. Effect of vitamin D metabolites on parathyroid gland size, p. 293. *Fifth int. Congr. Endocrinology*. Brühlsche Univ. druckerei Ed., Geisen, W. Germany (Abstr.).
- KODICECK E., 1974. The story of vitamin D from vitamin to hormone. *Lancet*, **i**, **7853**, 325-329.
- LIEBERHERR M., VREVEN J., VAES G., 1973. The acid and alkaline phosphatases, inorganic pyrophosphatases and phosphoprotein-phosphatase of bone. I. Characterization and assay. *Biochim. biophys. Acta*, **293**, 160-169.
- MESSER H. H., ARMSTRONG W. D., SINGER L., 1973. Influence of calcitonin on bone phosphatases and phosphatase release in organ culture. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **143**, 690-692.
- NORMAN A. W., HENRY H., 1974. 1,25-dihydroxycholecalciferol, a hormonally active form of vitamin D<sub>3</sub>. *Rec. Progr. Horm. Res.*, **30**, 431-480.
- RAISZ L. G., TRUMMEL C. L., HOLICK M. F., DELUCA H. F., 1972. 1,25-dihydroxycholecalciferol : a potent stimulator of bone resorption in tissue culture. *Science*, **175**, 768-769.
- REYNOLDS J. J., HOLICK M. F., DELUCA H. F., 1973. The role of vitamin D metabolites in bone resorption. *Calcif. Tiss. Res.*, **12**, 295-301.
- SUDA T., DELUCA H. F., TANAKA Y., 1970. Biological activity of 25-hydroxyergocalciferol. *J. Nutr.*, **100**, 1049-1052.
- TOLNAI S., 1968. Effects of parathyroid hormone on bone acid hydrolases in tissue culture. *Canad. J. Physiol. Pharmac.*, **46**, 261-267.
- VAES G., 1968. On the mechanism of bone resorption : the action of PTH on the excretion and synthesis of lysosomal enzymes and the extracellular release of acid bone cells. *J. Cell Biol.*, **39**, 676-697.
- VREVEN J., LIEBERHERR M., VAES G., 1973. The acid and alkaline phosphatases, inorganic pyrophosphatases and phosphoproteinphosphatase of bone. II. Distribution in subcellular fractions of bone tissue homogenates and structure-linked latency. *Biochim. biophys. Acta*, **293**, 170-177.