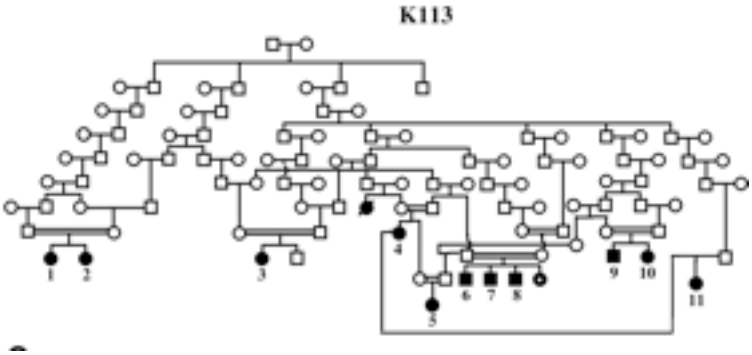
I. Rôle de la paracelline-1 dans l'Hypomagnésémie hypercalciurie familiale (HHF)

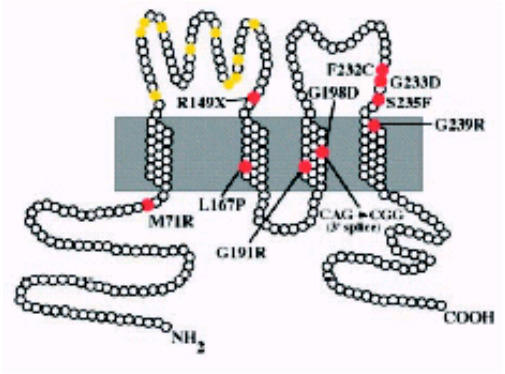
Démarche analytique devant une fuite urinaire de Mg

Exemple de l'hypomagnésémie et hypercalciurie avec néphrocalcinose précoce

Une fratrie atteinte de cette maladie congénitale



Autosomique récessif

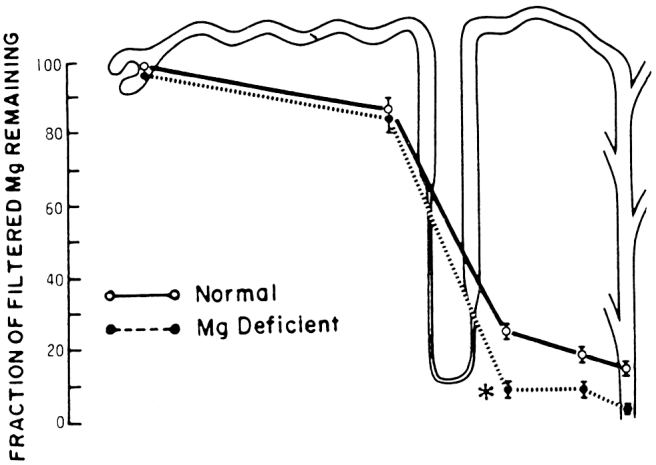


1999 : découverte de mutations de PCLN-1 dans l'hypomagnésémie hypercalciurie familiale

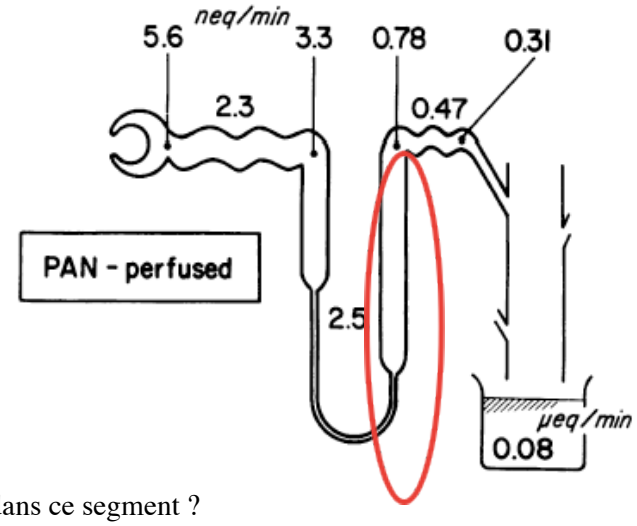
Fuite rénale de Mg: Quelle région du néphron pourrait en être responsable ?

L'anse large ascendante de Henle réabsorbe la majorité du magnésium. Si on a une hypomagnésémie ou hypermagnésémie, il va falloir se concentrer sur cette partie du néphron.

Réabsorption tubulaire segmentaire du magnésium



Anse large ascendante de Henle



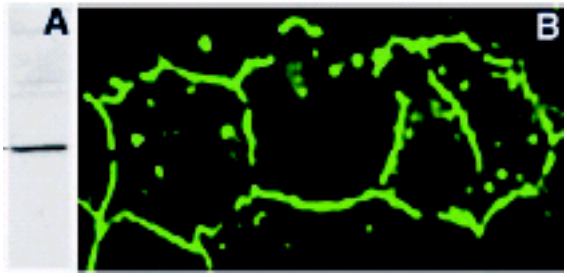
Comment est réabsorbé le Mg dans ce segment ?

Transcellulaire?

Paracelluraire?

On utilise un systeme d'anticorps pour mettre en évidence la localisation de la paracelline-1.

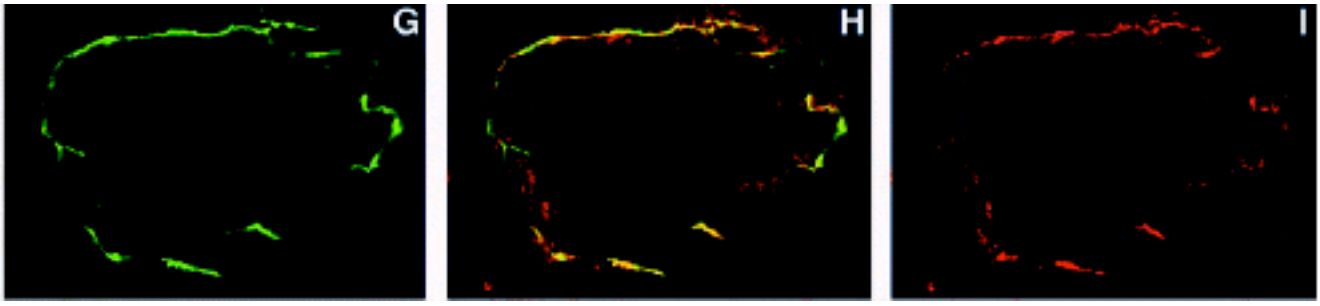
On exprimer un gène dans la cellule qui va produire des protéines. On fabrique des immunoglobines spécifiques de la paracelline. Ces anticorps sont marqués par une fluorescence verte qui montre ainsi la localisation de la paracelline.



Quelle est la localisation cellulaire de la paracelline-1 dans l'anse de Henlé?

marquage membranaire = paracelline se trouve en **paracellualire**

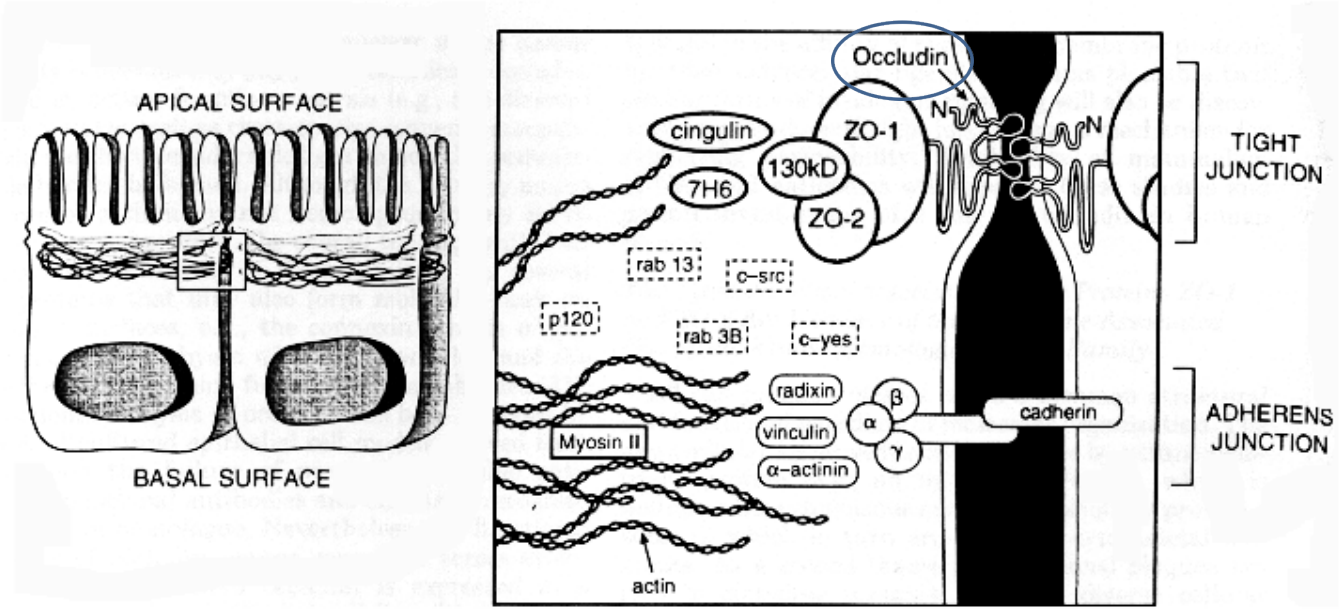
Quelles sont les proteines associées à la paracelline?
On utilise ici la microscopie confocale.



Occludine — Colocalisation — Paracelline-1

Ac anti-occludine = vert — Colocalisation = orange — Ac anti paracelline = rouge

On observe une colocalisation de l'occludine et de la paracelline, ces 2 proteines sont proches l'une de l'autre. Ce sont des protéines des jonctions intercellulaires.

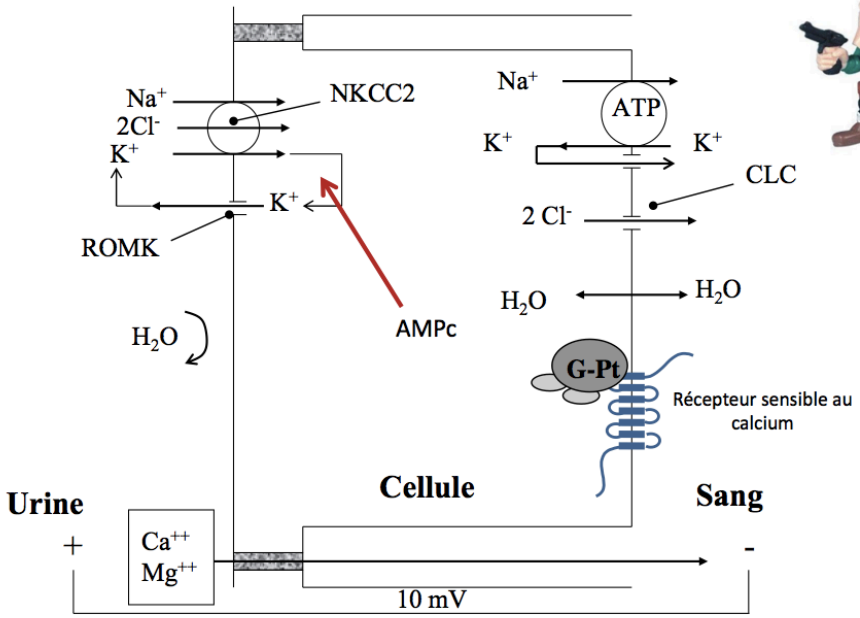


L'hypomagnésémie de l'HHF est associée à une mutation dans le gène codant pour la paracelline.
Le Mg filtré est essentiellement réabsorbé dans l'anse large de Henlé
La paracelline est une protéine des jonctions serrées de l'anse de Henlé.

Comment montrer que la réabsorption de Mg est bloquée chez les patients atteints d'HHF ?

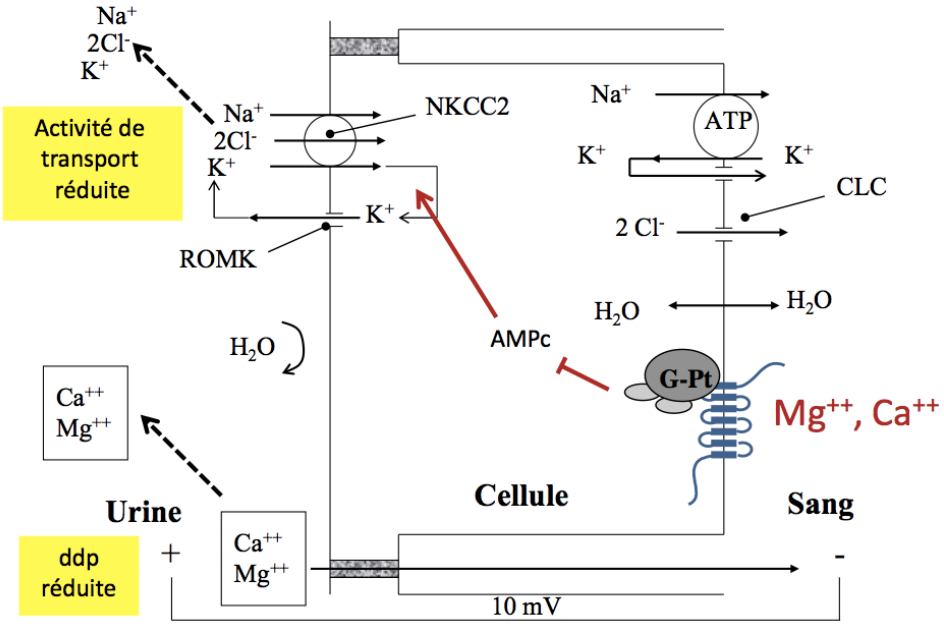
Fonctionnement de l'anse large ascendante de Henle





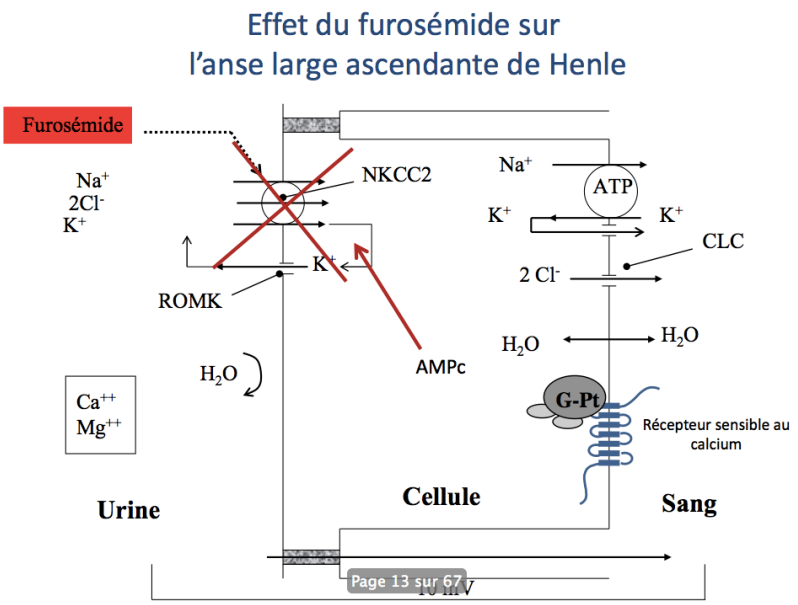
La pompe à sodium va créer un gradient électrique favorable à la réabsorption du Ca2+ et du Mg2+.
En effet, le cotransporteur NKCC2 fait rentrer un ion positif et 2 ions négatifs, ce qui va positiver la lumière du néphron et ainsi pousser par le gradient Ca2+ et Mg2+ vers le sang. La réabsorption du calcium et du magnésium est paracellulaire par le fait du fonctionnement électrique de ce transporteur.

Effet du Mg sur l'anse large ascendante de Henle



En stimulant le récepteur sensible au calcium ou magnésium (**en mettant du magnésium ou calcium dans le sang**), on va inhiber la synthèse de l'AMPc qui diminue le fonctionnement du système de NKCC2:
-Activité de transport réduite
- ddp transépithéliale réduite

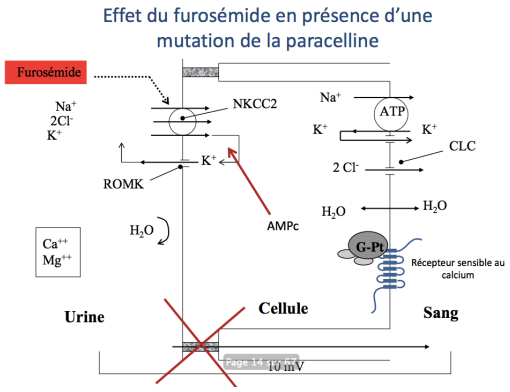
2 conséquences: augmentation de l'excrétion de Ca2+, Mg2+ et K+, Na+, Cl-



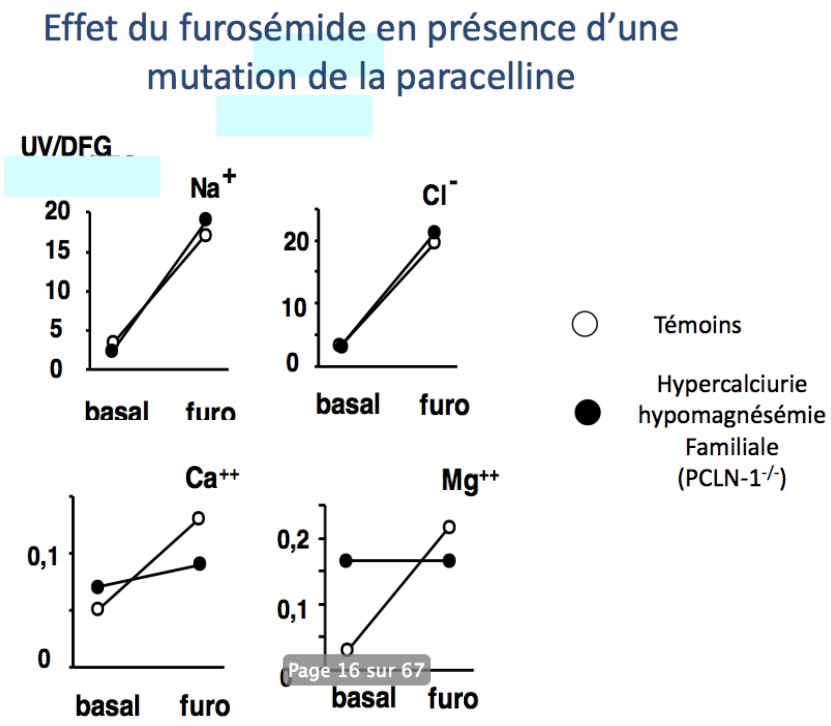
Si on ajoute du **furosémide,** on va inactiver le transporteur sodium-potassium-chlore ce qui va annuler le gradient électrique transepithélial:

Consequences: fuite du Ca2+, Mg2+ et Na+, Cl-, K +dans les urines.

Dans les 2 cas précédents (ajout de Mg2+/Ca2+ ou furosémide), on a une augmentation de l'excrétion sodium, potassium, magnésium, calcium et chlore.



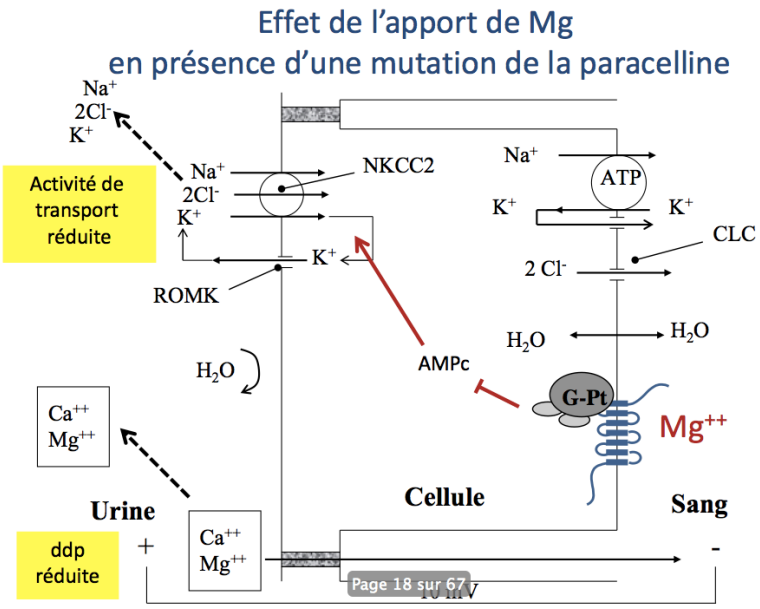
Si la paracelline est mutée, on peut s'attendre à ce que le passage du Ca++ et Mg++ soit impossible. Donc ce n'est as en polarisant par la furosémide ou le magnésium qu'on va modifier quoique ce soit sur le mouvement du calcium et du magnésium.



On mesure l'effet du furosémide lorsqu'il y a la mutation paracelline.

<u>Chez le sujet normal</u>,
Effet diurétique + fuite cations divalents on aura une augmentation de:
- natriurèse
- chlorurie
- magnésurie
- calciurie

<u>Chez le sujet anormal</u> (HHF):
Effet diurétique seul
- Augmentation de la natriurèse et le chlorurie
- la magnesurie et calciurie restent inchangées

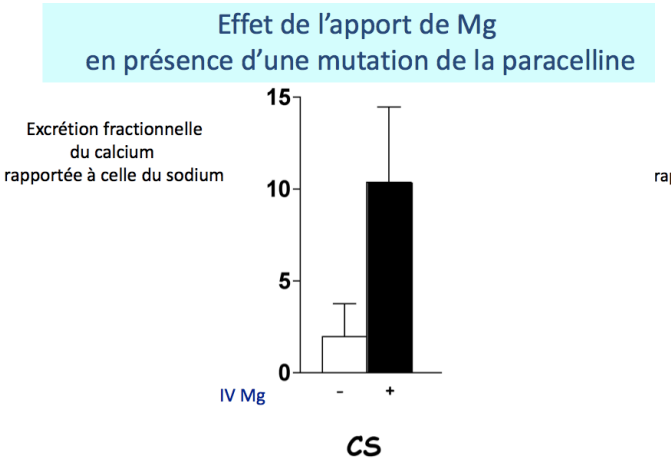


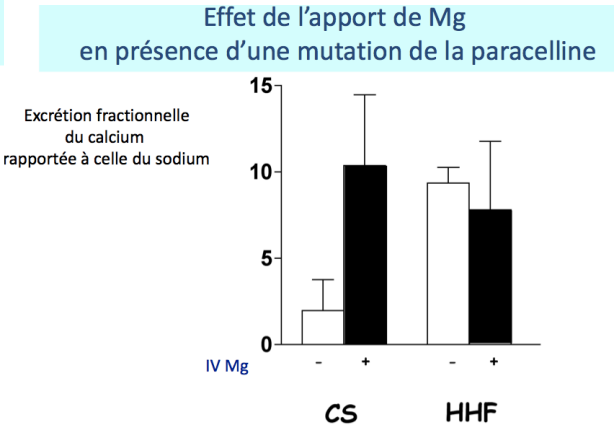
On mesure de l'administration de MgCl2.

Chez le sujet normal: on a uen augmentation de la
- natriurèse
- calciurie
- FeCa/FeNa

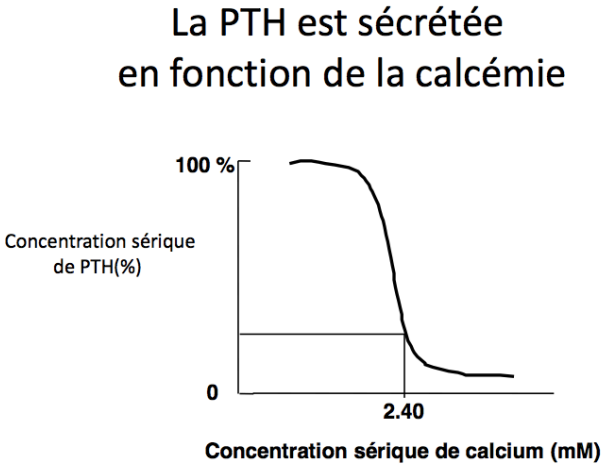
Patient atteint d'HHF

- Natriurèse élevée et inchangée
- Calciurie élevée et inchangée
- FeCa/FeNa inchangée





II. Rôle du récepteur sensible au Ca et au Mg dans les épithéliums rénaux et coliques



Dans le contrôle hormonal de la calcémie et de la phosphatémie sont impliqués de nombreux tissus: glandes parathyroides, reins, intestins.
Les variations de calcémie vont provoquer des variations de parathormone qui vont impacter sur des organes cibles pour corriger le déficit en calcium dans la circulation.
On a donc une relation exemplaire entre la concentration de calcium sérique et de parathormone sérique. Lorsque notre calcémie diminue, la parathormone augmente jusqu'à un pallier. La parathormone augmente très vite et est hypercalcémiante

Cette constatation soulève une question: Existerait-il un récepteur sensible au Ca sur les glandes parathyroïdes ?

Pour répondre à cette problématique, on va procéder par:

-> Criblage de banque d'ADN : démarche analytique fondamentale, retenir +++++ PAR COEUR

But : identifier une molécule dont on suppose la présence dans un tissu sur des arguments fonctionnels
Ici notre argument fonctionnel est la relation PTH/Calcémie

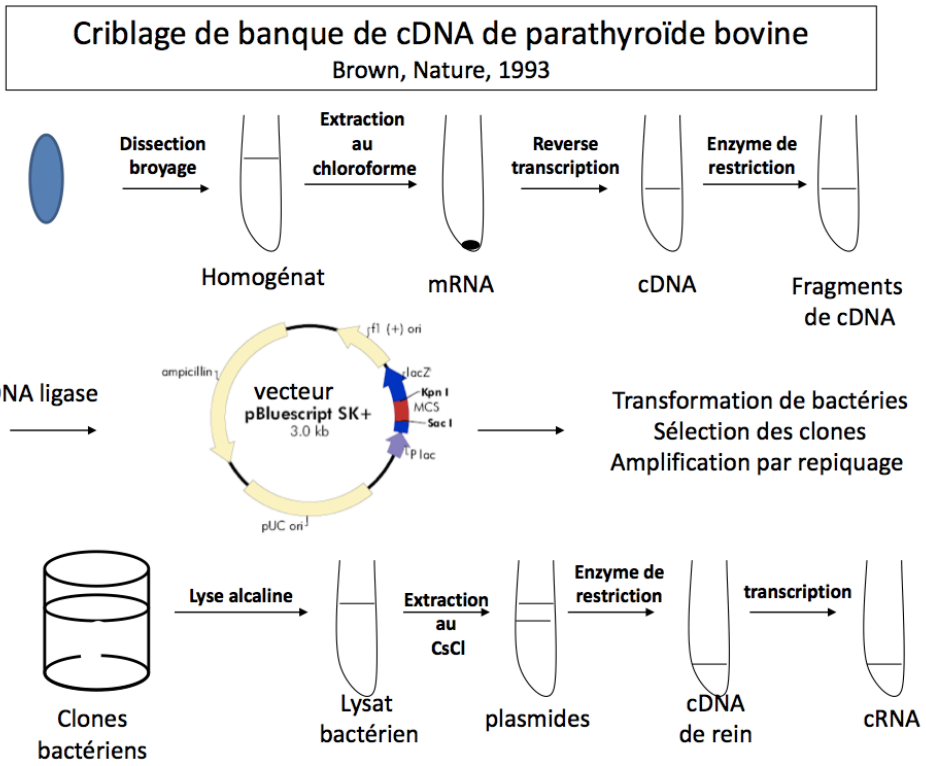
Méthode : broyat tissulaire des glandes parathyroides dans notre exemple, extraction d'ARNm, transcription inverse en ADNc, découpage, insertion dans des vecteurs

Clonage : transfection de bactéries par les vecteurs, sélection des clones transfectés, amplification des clones

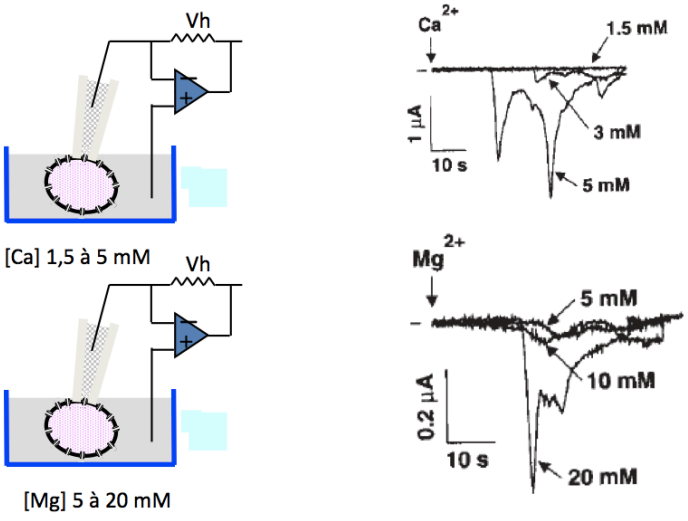
Expression hétérologue : extraction de l'ADN des clones, ablation du vecteur, transcription en ARNc et injection dans des systèmes cellulaires

Etude fonctionnelle (ici, patch-clamp) pour savoir si on a un courant qui correspond à une recepteur sensible au calcium

Application : récepteur sensible au calcium

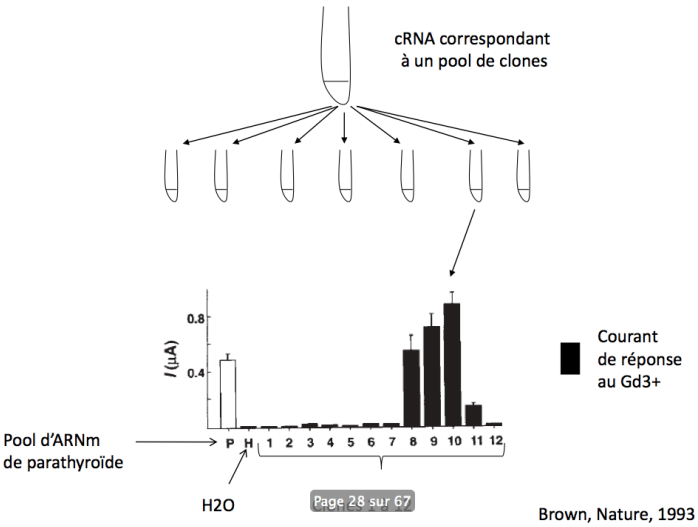


Préparation de parathyroïde bovine:
Récepteur sensible au calcium et au Mg



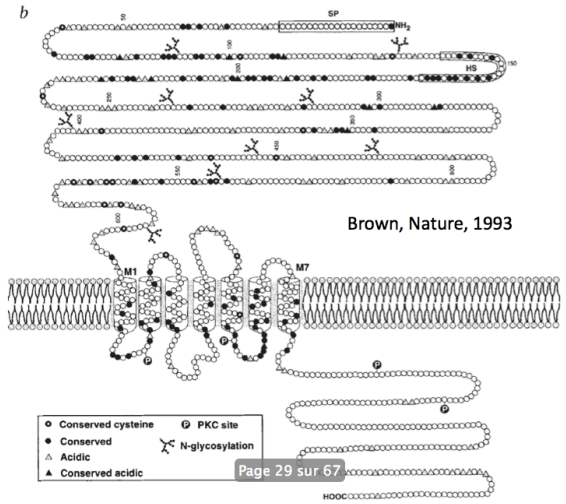
On observe une dépolarisation de la membrane cellulaire en présence de calcium = pic dans le patch clamp.
On a donc bien un récepteur sensible au calcium

On observe le courant notamment en 10



On identifie et séquence l'ADN:
on obtient une séquence moléculaire avec 7 segments transmembranaires une partie extra et intra cellulaire -> récepteur sensible au calcium

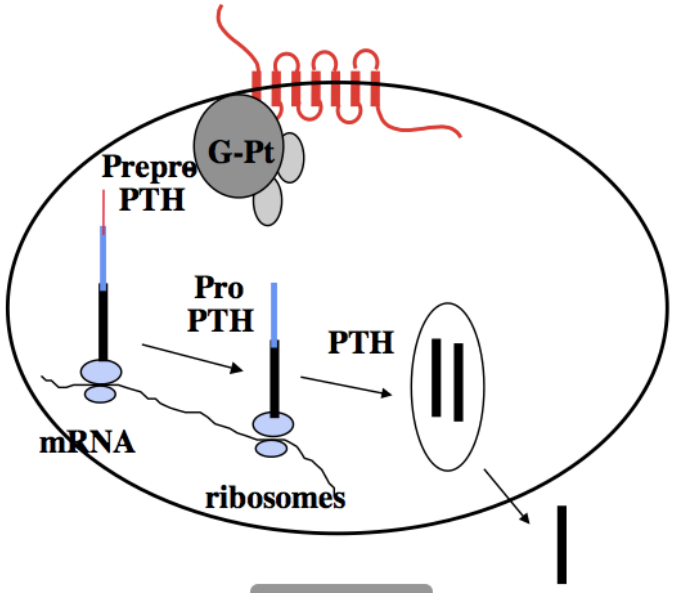
Récepteur sensible aux cations divalents



NB: Toute à l'heure, quand on est passé de la fraterie à la paracelline, il y avait toute cette analyse entre les 2..

Récepteur sensible aux cations divalents

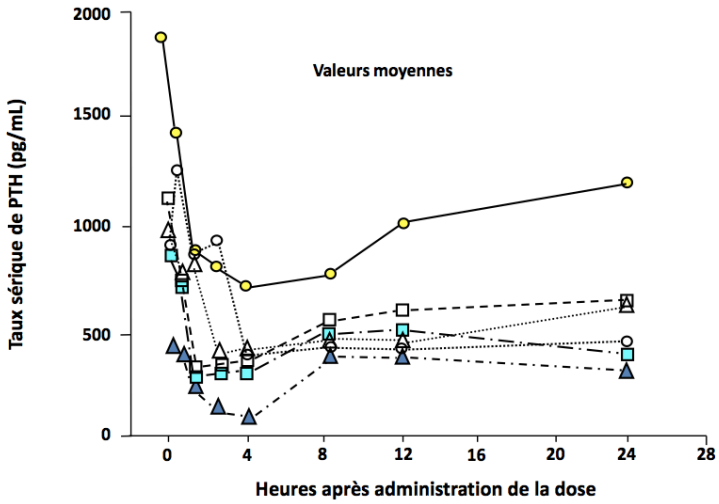
Cellule parathyroïdienne



On a notre récepteur sensible au calcium lié à une protéine G qui va stimuler l'expression de parathormone: d'abord la prépro PTH puis la pro PTH et enfin la PTH

Développement d'un médicament: Cinacalcet, antagoniste du récepteur sensible au calcium

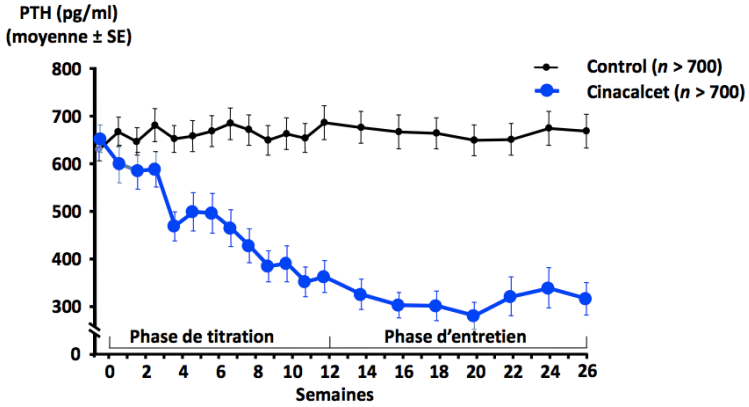
Réponse à une dose orale unique de 100 mg de cinacalcet chez l'homme



Médicament utilisé chez des patients qui ont une hyperparathyroidie primitive

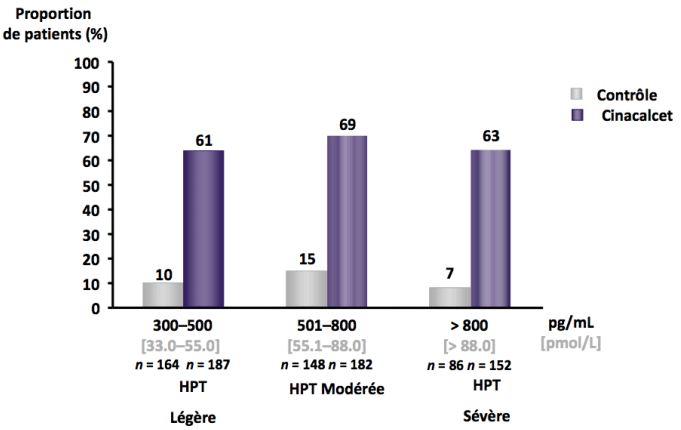
On observe en heure après l'administration de calcinet, qu'il y a une variation de la concentration en parathormone dans le sang. Les patients ici ne sont pas sains, ce sont des insuffisants rénaux. quand on leur donne du Cinacalet, on a une diminution rapide en parathormone.

Effet du cinacalcet sur la PTH



Ce médicament marche vite et marche sur le long terme.

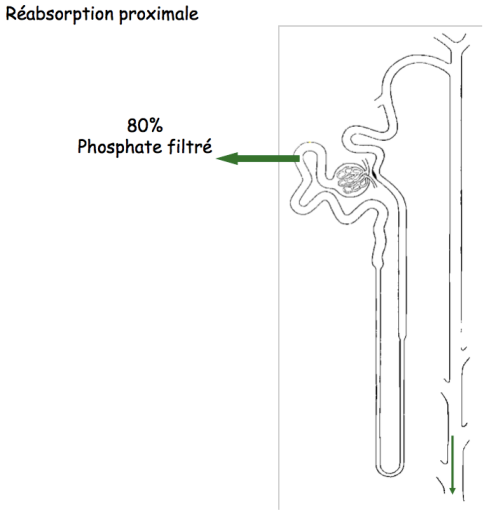
Proportion de patients atteignant une réduction ≥ 30% de PTH



Une autre manière de vérifier que ce médicament fonctionne, c'est de noter le pourcentage de patients qui vont avoir une réduction de la parathormone dans le sang en fonction de la sévérité de leur hyperparathyroide. Si ils sont légèrement, modérément ou sévèrement malade, il y a à peu près 2/3 des patients qui ont du cinacalnet. Ca signifie la prescritpion de ce medicament n'est pas lié au niveau de la maladie initiale.

III. Rôle du cotransporteur Na-Pi

Les phosphates



Le phosphate est uniquement réabsorbé au niveau du segment proximal du néphron.

Qu'est qui permet de filtré les 80% de phosphate au niveau du tube proximal?

-> Présence d'un cotransporteur Na-Pi

Toute à l'heure pour le récepteur calcium, on a broyé des parathyroides, ici on va prélever des reins.
Le tubule proximal représente 80% de la masse du cortex rénal, donc on isole ɔule proximal.

Criblage de banque d'ADN

But : identifier une molécule dont on suppose la présence dans un tissu sur des arguments fonctionnels

Méthode : broyat tissulaire, extraction d'ARNm, transcription inverse en ADNc, découpage, insertion dans des vecteurs

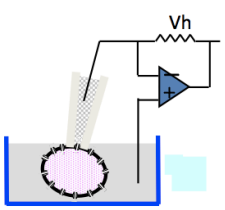
Clonage : transfection de bactéries par les vecteurs, sélection des clones transfectés, amplification des clones

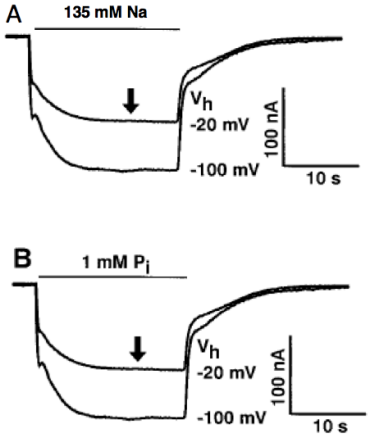
Expression hétérologue : extraction de l'ADN des clones, ablation du vecteur, transcription en ARNc et injection dans des systèmes cellulaires

Etude fonctionnelle (ici, patch-clamp)

Application : transporteur NaPi de type 2

Préparation de vésicules de bordure en brosse : cotransport sodium-phosphate

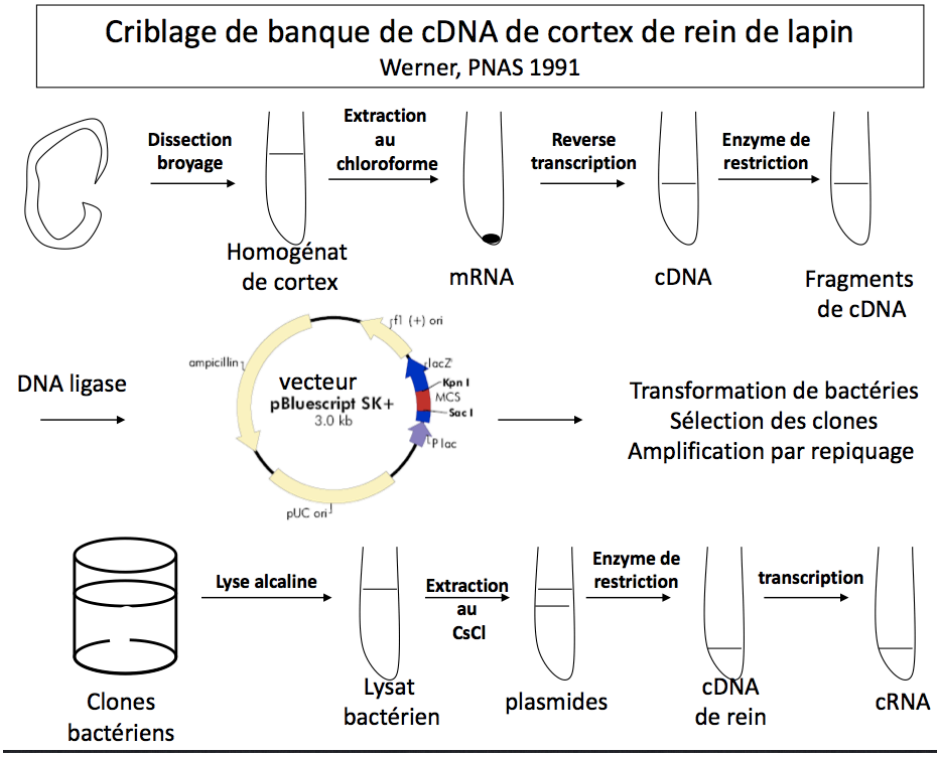


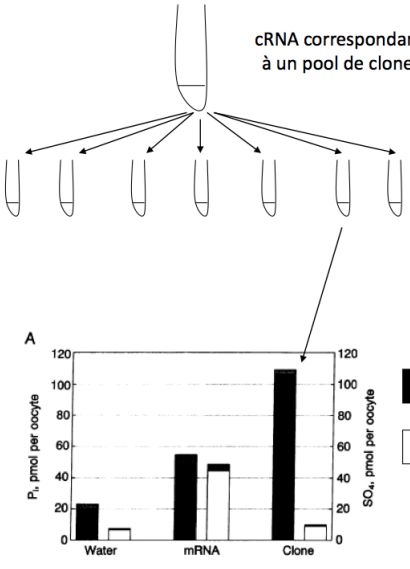


Patch clamp:
On a une vésicule du tubule proximal, on va mettre du phosphate dans le premier bain et du sodium dan sle deuxieme bain.
Lorsque qu'on ajoute du sodium dans le 1er bain ou du phosphate dans le 2e bain, on observe un courant.

Ce qui signifie que si on n'a que du phosphate ou que du sodium dans un bain, on n'a pas de courant. Il faut

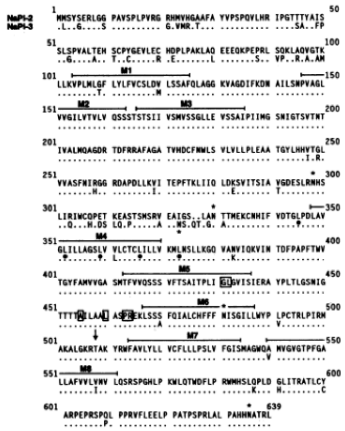
donc les 2 pour avoir un courant.





Un des clones que l'on a isolé transporte beaucoup plus que tous les autres clones le Pi, on aura donc dans ce clone l'ADN qui code pour le cotransporteur Na-Pi.

Werner, PNAS 1991

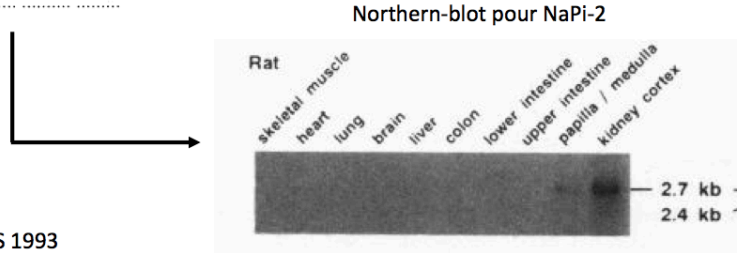


Séquençage du cDNA du clone sélectionnné

Plusieurs séquences correspondant à des gènes

Synthèse de sondes spécifiques

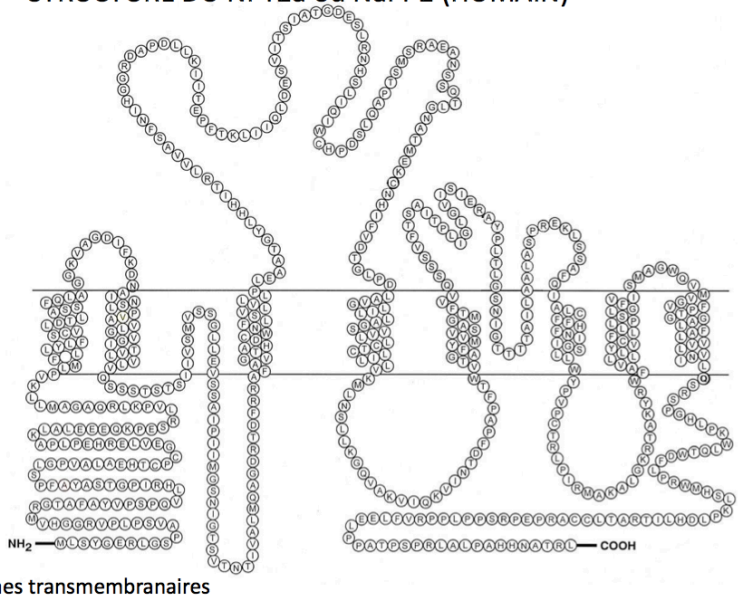
Northern-blot pour NaPi-2



Magagnin, PNAS 1993

On séquence l'ADNc.
Pour savoir quel est le gène impliqué dans le co-transporteur Na-Pi, on fait des sondes qui sont ARNc spécifiques d'ADN des différents tissus: cerveaux, foie, poumons, colon et le rein. Et il va y avoir une fluorescence pour le rein.
On a donc identifié notre gène.

STRUCTURE DU NPT2a ou NaPi-2 (HUMAIN)

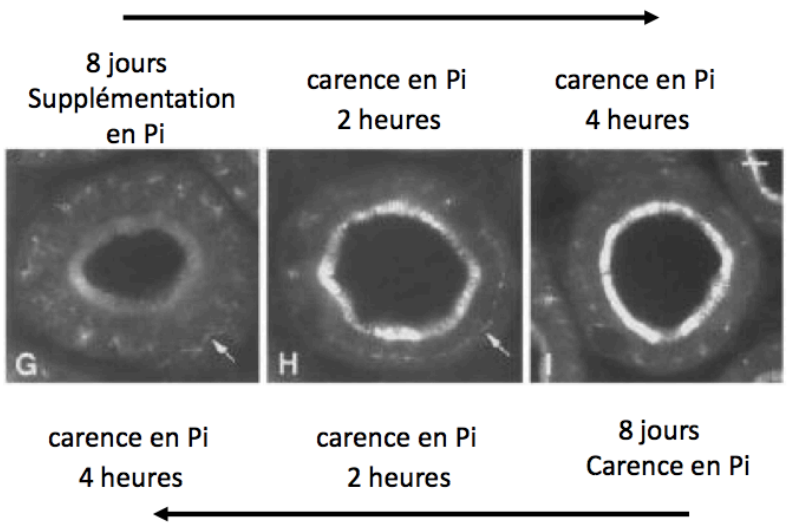


640 a.a.
8 domaines transmembranaires
Localisation: pôle apical du tube proximal exclusivement

640 acides aminés, 8 domaines transmembranaires, localisation pole apical du tube proximal exclusivement

On fabrique des anticorps contre ce système là.
On a les protéines en grandes quantité dans les bactéries, on peut immuniser les animaux avec cette protéine en injectant le lysat bactérien dans des animaux. Ils vont fabriquer des immunoglobines que l'on va pourvoir coupler à des système de fluorescence par coloration chimique. On pourra alors localiser notre protéine chez l'animal.
On localise notre

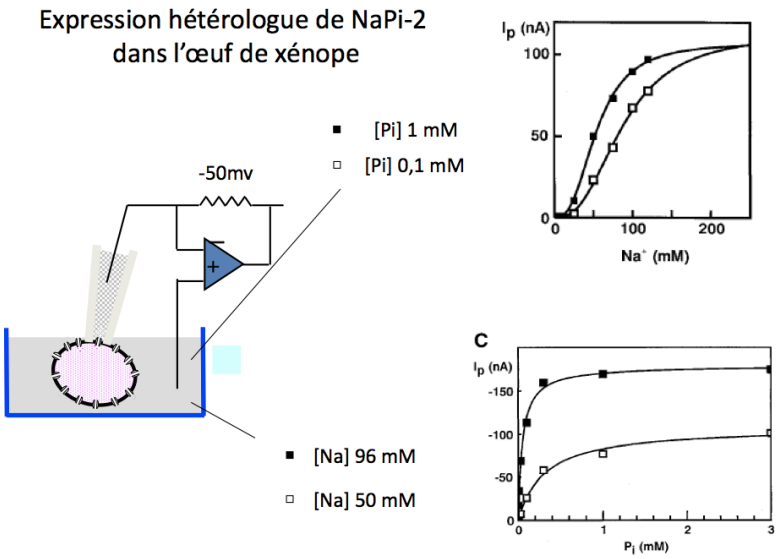
Apports alimentaires en Pi et expression de NaPi-2



On a mis notre anticorps dans 3 situations différentes:

- Un animal qui est carencé en phosphate -> l'intensité du signal sur la bordure en brosse est très forte
- Lorsqu'on supplémente en phosphate -> l'intensité du signal disparait

=> il y a une régulation de l'expression de Na-Pi par les apports alimentaires en phosphates.



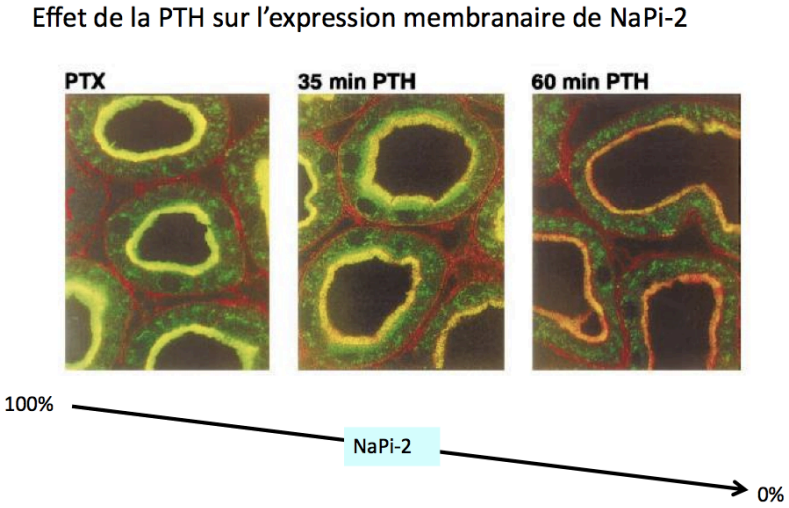
On a cloné le gène du cotransporteur NaPi et on regarde si il marche dans des systèmes hétérologue. On va injecté l'ARNc dans des oeufs de xénopes, et on mesure le courant sodique et phosphatique en faisant varier les concentrations de Na et Pi.

Carré blanc: faible concentration
Carré noire: forte concentration
1er graphique:
L'intensité du courant va augmenter avec la quantité de sodium que l'on met dans le bain mais elle augmente plus vite si on met une forte concentration de phoshate dans le bain.
2e graphique:
Si on met une faible concentration de sodium dans notre systeme, on a beau mettre de forte concentration de phosphate, le cotransorteur ne transportera pas plus. Par contre si on met une forte concentration de sodium, on transportera plus.

Dans les 2 cas, on arrive à un courant d'intensité maximal -> saturation.

Le système est saturable: pour le montrer dans la rein, on mesure la quantité excrété par le rein et on fait varier la quantité présente dans le plasma. On injecte du phosphate dans le sang (augmentation phosphatémie) et on mesure le phosphate excrété. Ce phosphate excrété augmente en proportion de la phosphatémie, il faut une certaine phosphatémie pour excréter le phosphate dans les urines.

Phosphate filtré - phosphate excrété = phosphate réabsorbé



La parathormone mesure aussi l'expression membranaire NaPi-2.
Le NaPi est en jaune. On donne de la PTH est regarde l'expression de NaPi-2 à différents temps.

La PTH empêche l'expression de NaPi.
Lors de parathyroidectomie: forte expression de NaPi 2.
Une hyperparathyroidie donne une hyperphosphaturie et hyposphatémie.

Carence en PTH: augmentation du seuil de réabsorption
Excès en PTH: dimunition du seuil de réabsorption

Souris NPT2a$^{-/-}$
(inactivation du gène codant pour NaPi-2)

Beck, PNAS1998

Hypophosphatémie avec fuite rénale (TmPi abaissé)
Anomalie du remodelage osseux (↘ ostéoclastes)
Hypercalciurie et néphrolithiase (Chau, J Bone Miner Res 2003)
Augmentation du calcitriol et pas de la PTH

↓

Néphrolithiase chez l'homme ?

↓ Séquençage du gène chez l'homme (hypophosphatémie avec PTH normale)

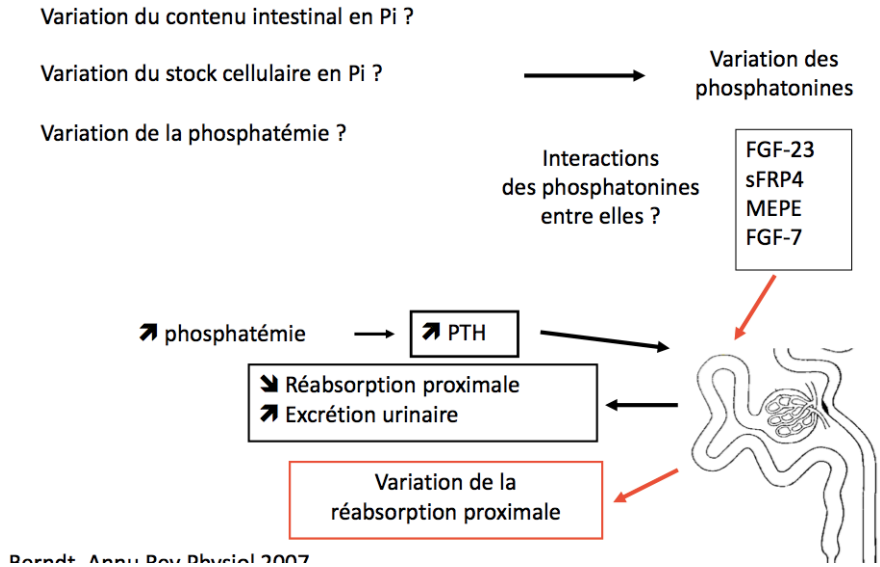
Ala48Phe exon 3 chez un patient

↓ mutagénèse dirigée et transport de Pi

Diminution du transport de phosphate (Prié, NEJM 2002)

Chez les patients qui avaient une hypophosphatémie, des lithiase et une PTH normale, on est allé chercher une mutation sur le gène codant pour NaPi-2. On a trouvé chez 3 patients une mutation. Par mutagénèse dirigée, on a introduit cette mutation dans un morceau ARNc que l'on a injecté dans un oeuf de xénope pour voir si cette mutation était responsable de l'activité de NaPi-2. On a effectivement trouver une diminution du transport de phosphate.

Régulation de la phosphatémie : modification de la capacité de réabsorption rénale

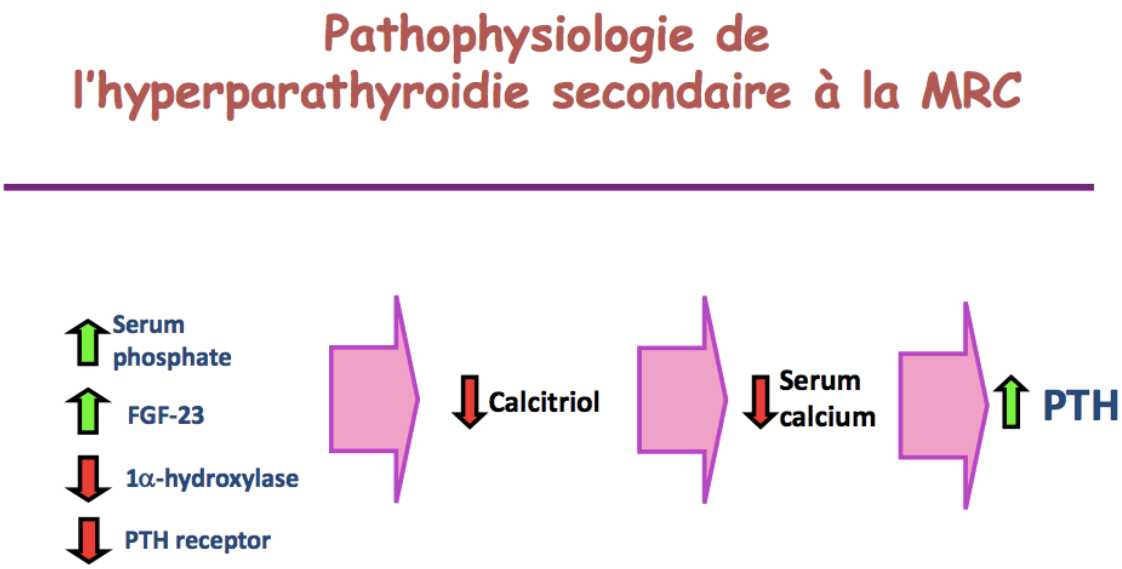


La régulation de la phosphatémie est extrêmement compliquée, la recherche est très active.
On suppose qu'il y a des phosphatonines hormones qui vont réguler le comportement rénal du phosphate.
Comment ces phosphatonines sont sécrétées, d'ou elle sortent? On ne sait pas si c'est la variation du contenu intestial en Pi, le stock cellulaire ou la phosphatémie qui va faire varier les phosphatonines.

IV. Les Biomarqueurs: Phosphates et FGF-23

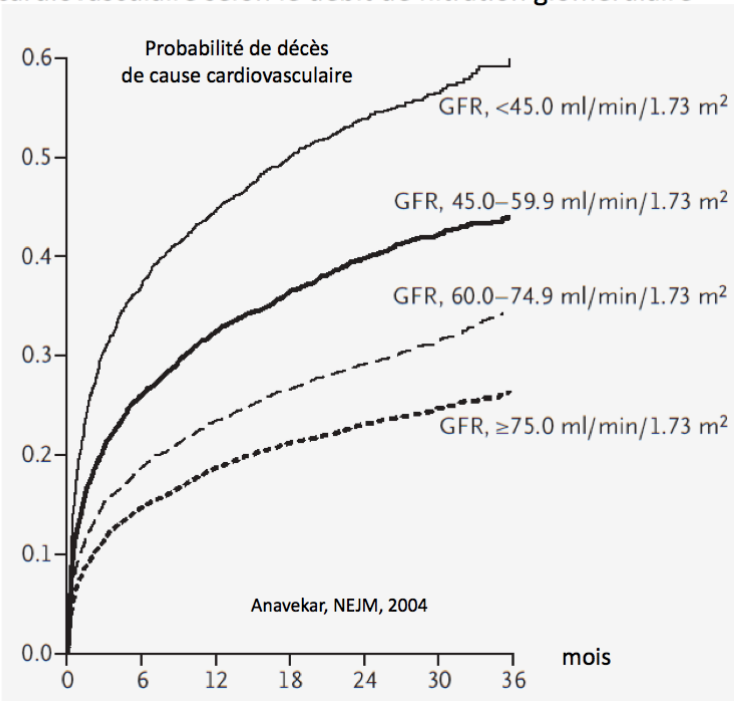
Les phosphates et le FGF-23 sont des marqueurs qui sont intéressants dans les maladies rénales chroniques et le vieillissement vasculaire qui sont liés

Les maladies rénales chroniques sont la réduction de la filtration glomérulaire qui va induire des anomalies du métabolisme phosphocalcique: Hyperparathyroidie secondaire par diminution de la capacité à réabsorber le calcium, diminution de la capacité d'élimination de phosphate -> hyperphosphatémie. Ce processus calcifie les vaisseaux.

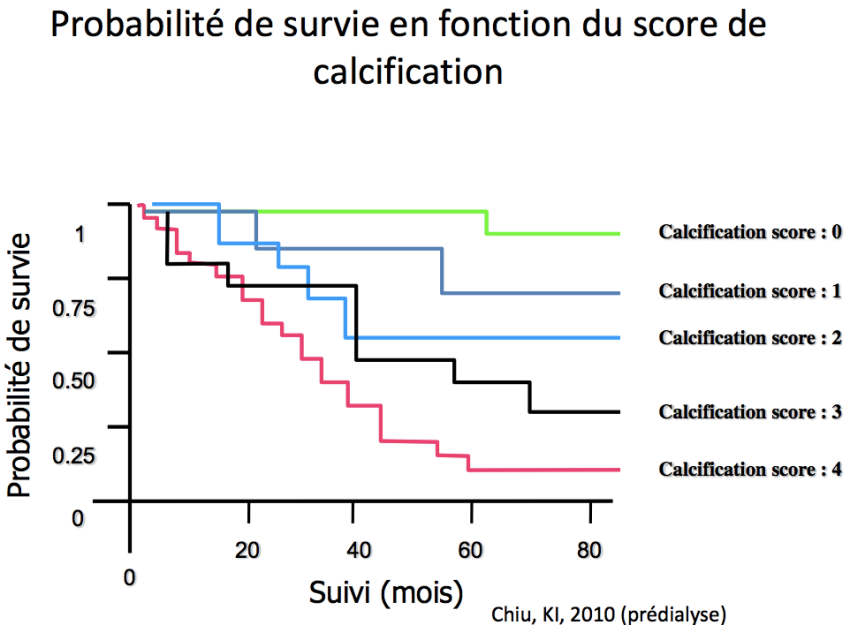


1alpha hydoxylase = enzyme de la vitamine D qui la transforme en calcitriol
le calcitriol permet l'augmentation de la calcémie
l'hypocalcémie stimule la PTH.

Mortalité cardiovasculaire selon le débit de filtration glomérulaire



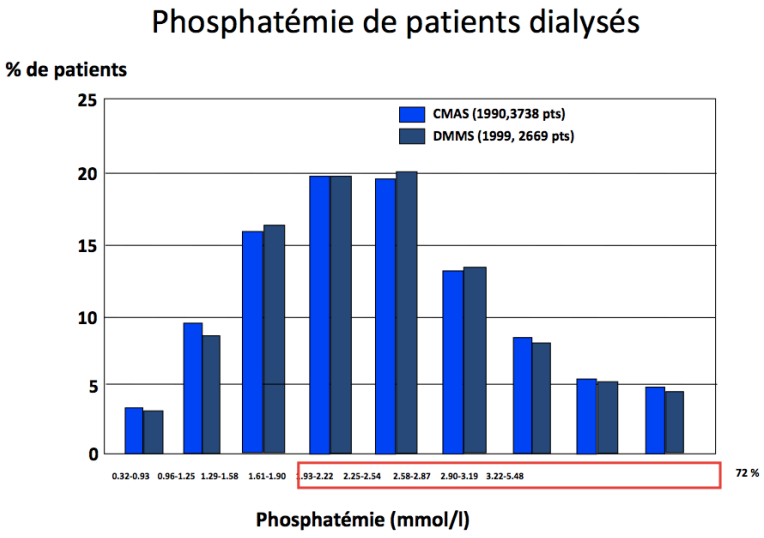
Plus on est insuffisant rénal, plus on meurt. Si on est à un stade avancé dans la maladie rénal, on a 60% de probabilité de décès à 3ans face à 20% si on est à un stade d'insuffisance rénale correct



Plus le score de calcification augmente, moins la probabilité de survie est élevée.

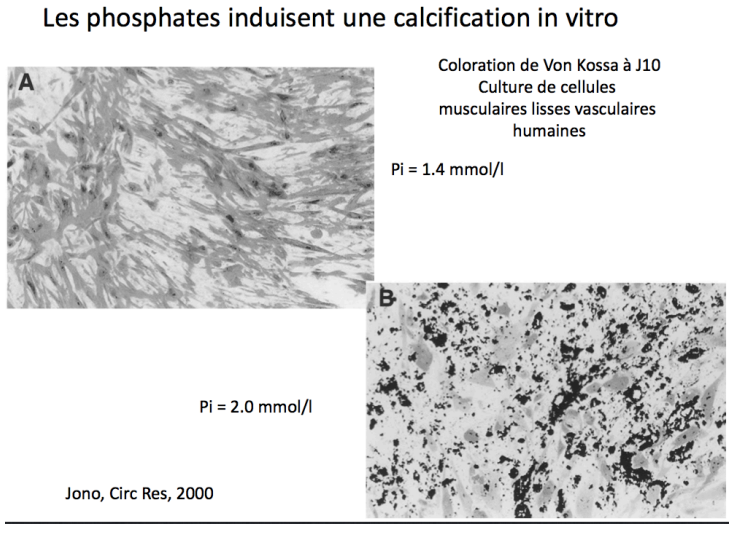
On va agir sur les biomarqueurs pour améliorer la fonction rénale et ainsi la survie

a) La phosphatémie



On va doser et agir sur la phosphatémie.
Les dialysés sont des patients qui ont une extrême insuffisance rénale. On voit ici que parmis les patients dialysés, 72% de ces patients ont une phosphatémie anormalement augmenté. Les dialysés sont les sujets les plus à risque cardiovasculaire calcifiés.

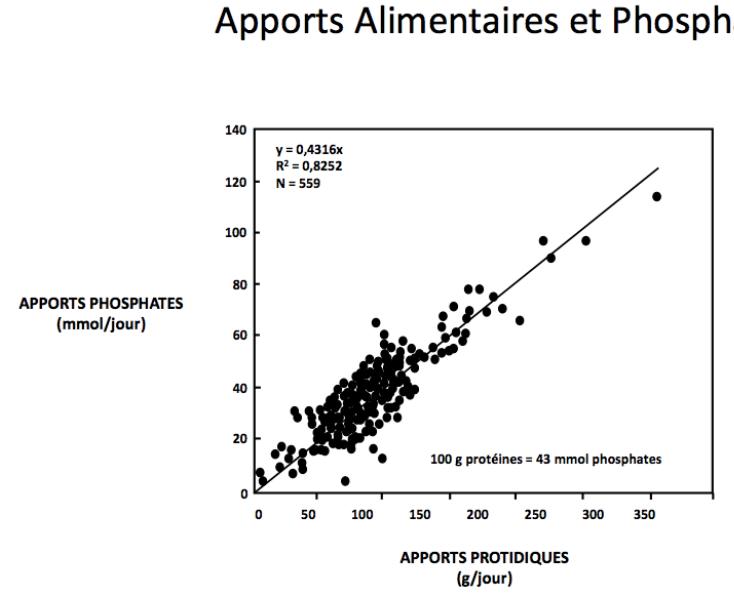
On se demande alors si la phosphatémie est responsable d'une augmentation de calcification vasculaire



On cultive des cellules musculaires avec une concentration de phosphates soit de 1,4 mmol/L soit 2mmol/L et on colore le calcium après 10 jours.
Le noir représente le calcium.

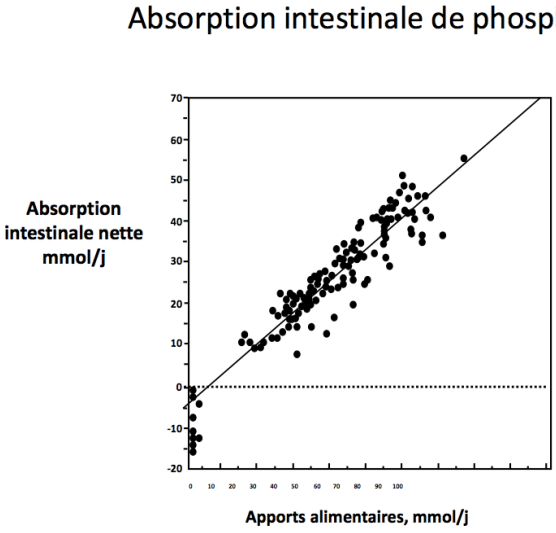
On remarque que la phosphatémie aurait bien un rôle dans la calcification.

Comment baisser la phosphatémie?

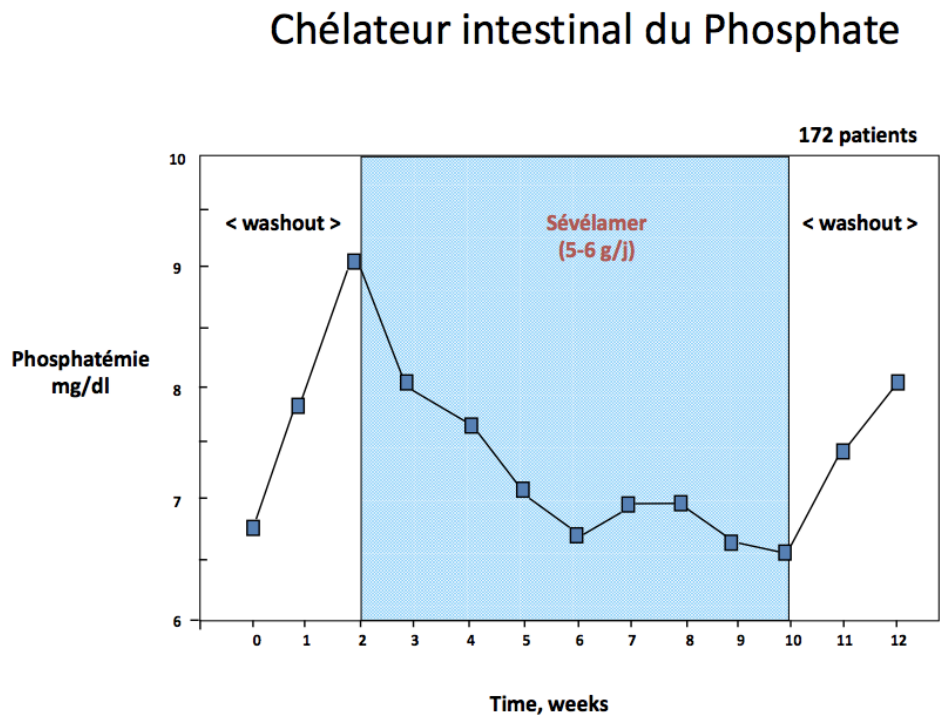


Les apports protéiques et en phosphates sont strictement parallèle.
C'est a dire que pour manger moins de phosphate, il faut manger moins de protéines, on va se dénutrire et quand on est insuffisant rénal on va mourir plus vite.

donc ce n'est pas la bonne solution



Plus on apporte de phosphate, plus on va les absorber.



La solution est la chélation intestinal du phosphate.

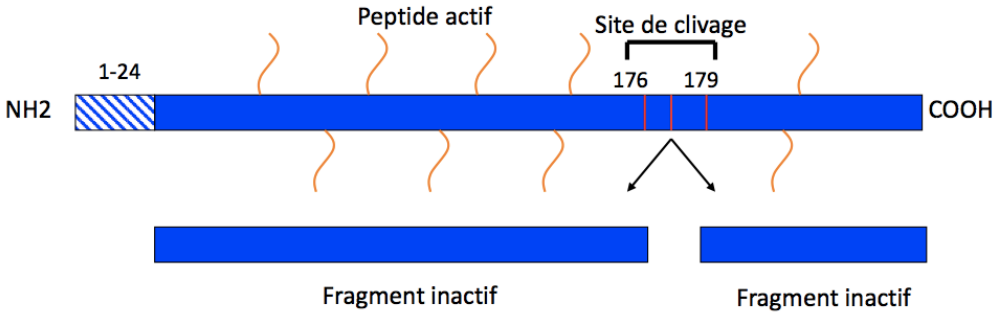
Le sévélamer va baisser rapidement et maintient une phosphatémis basse pendant plusieurs semaines.

Lorsqu'on arrete e sévélamer, la phosphatémie réaugmente.

b) FGF-23

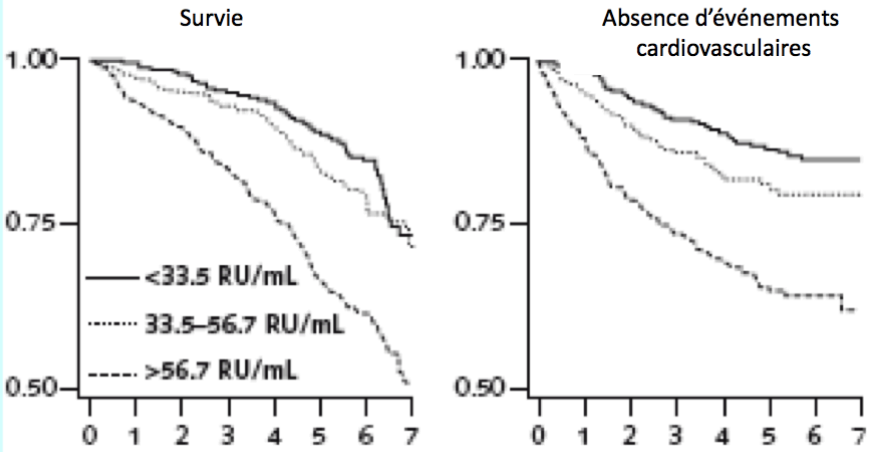
Un biomarqueur : Fibroblast Growth Factor 23

Protéine circulante, présente chez un sujet normal
Synthétisée par les cellules osseuses



On active le gène codant pour le FGF-23 chez la souris, on voit qu'elle meurt plus vite, qu'elle se calcifie plus vite et que leur phosphatémie augmente.

FGF23 mortalité et événements cardiovasculaires

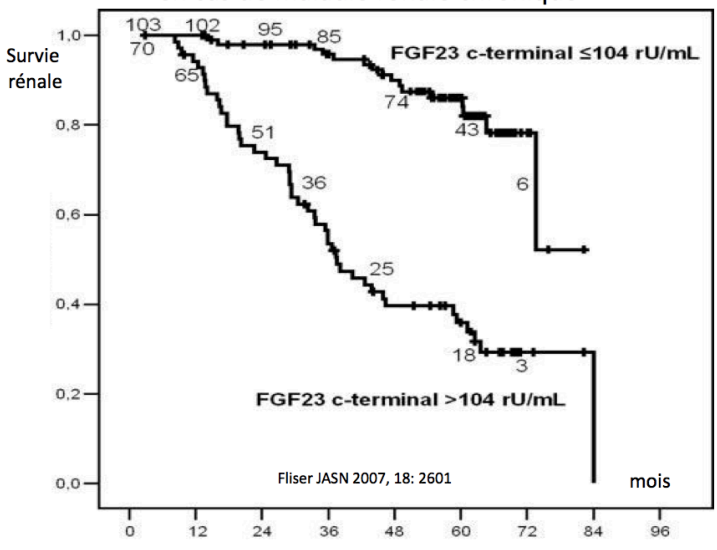


Etude chez des patients normaux:

Moins on a de FGF-23, mieux on survie.
Plus on a de FGF-23, moins on survie.

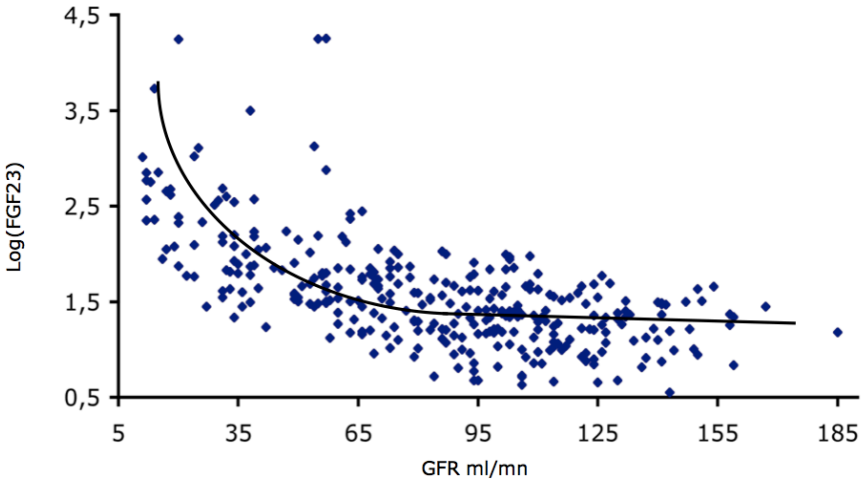
Cette survie est corrélé à la survenue de la non fréquence des évènements cardiovasculaires.

FGF23 et survie rénale en cas de maladie rénale chronique



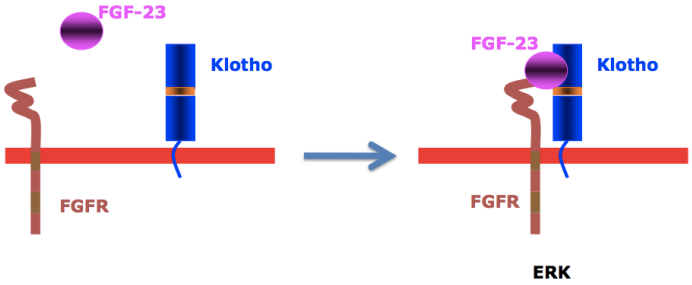
Etude chez des patients avec maladie rénale chronique:
La survie des reins est conditionnée par la concentration de FGF-23, si on a une faible concentration de FGF-23, les reins survivent longtemps. Si elle est forte, on perd le rein.

Concentration de FGF23 selon le degré de maladie rénale chronique



Plus on est insuffisant rénal, plus on a de FGF-23

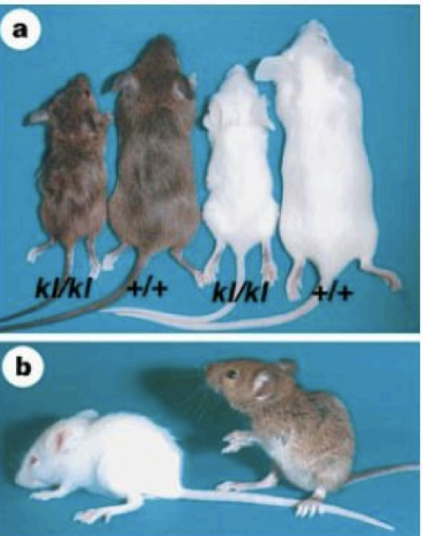
KLOTHO: CO-RECEPTEUR DU FGF23

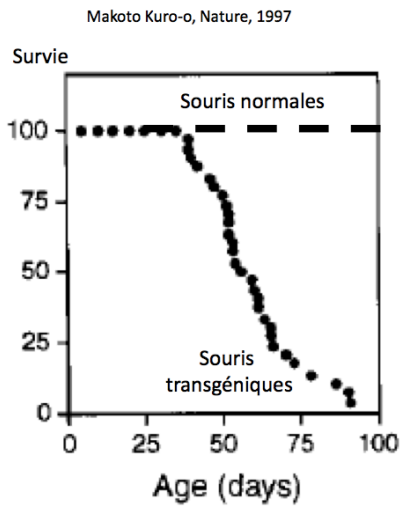


Co-récepteur du FGF-23: protéine membranaire appelée KLOTHO.
Lorsque le FGF-23 arrive, il se fixe à son recepteur membranaire et à Klotho. Ca déclenche une cascade de signalisation intracellulaire.

Présent dans:
tube distal, parathyroide, muscle,
pancreas, cerveau, hypophyse, gonades, duodenum

Effets de l'inactivation du gène codant pour la protéine Klotho





Lorsqu'on inactive Klotho, on augmente la mortalité.

Leçon des souris génétiquement modifiées

	FGF23 KO	Klotho KO	MRC	FGF23 KO + chélateur du Pi
Pi	↗	↗	↗	N
Durée de vie	↘	↘	↘	N
Calcifications vasculaires	↗	↗	↗	absentes

Klotho, FGF23 et MRC : les questions actuelles

augmentation FGF23
Défaut d'élimination urinaire ou adaptation à l'hyperphosphatémie ?

diminution Klotho
Effet de la maladie rénale ou de l'accumulation de FGF 23 ?

Conclusion : points forts à retenir

Le criblage de banque d'ADN

Fonctionnement du récepteur sensible au Ca
Régulation du cotransporteur NaPi-2 par le FGF23 et la PTH