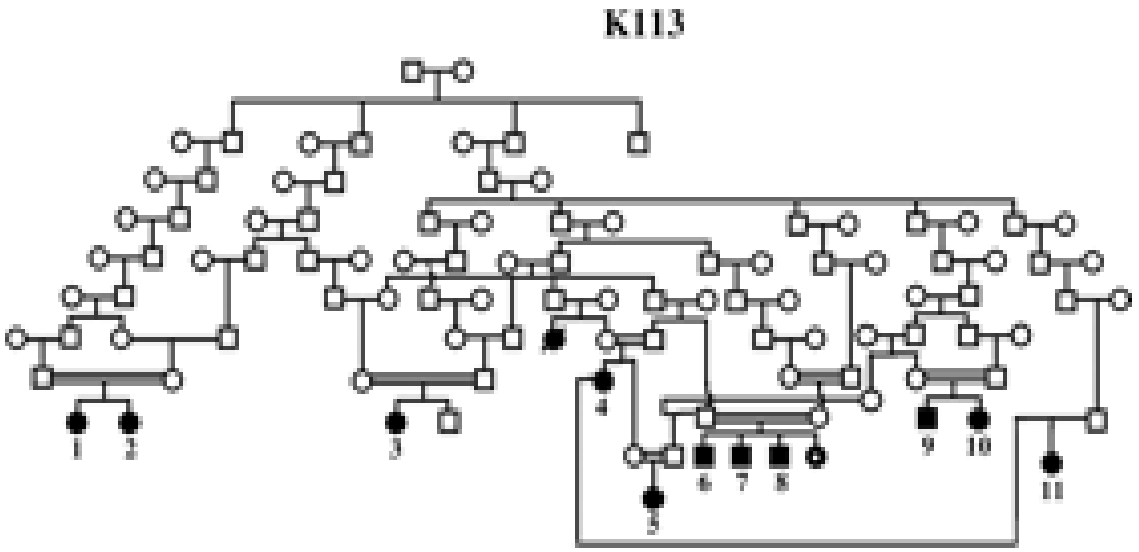
Métabolisme phosphocalcique normal et rein (calcium, magnésium, phosphates)

Dr Guillaume Favre
Service de Néphrologie
IRCAN, équipe « vieillissement et diabète »

Démarche analytique devant une fuite urinaire de Mg

Exemple de
l'hypomagnésémie
et hypercalciurie
avec **néphrocalcinose précoce**

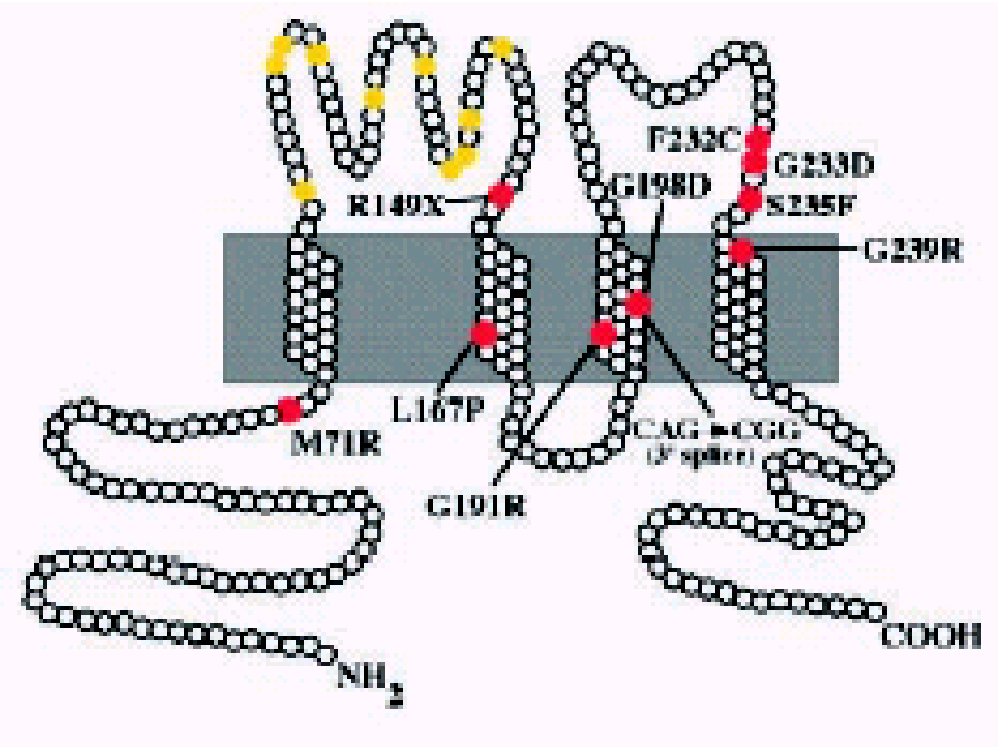
Une fratrie atteinte de cette maladie congénitale



Autosomique récessif

Simon et al Science 1999;285:103-106

Rôle de la paracelline –1 dans l'HHF



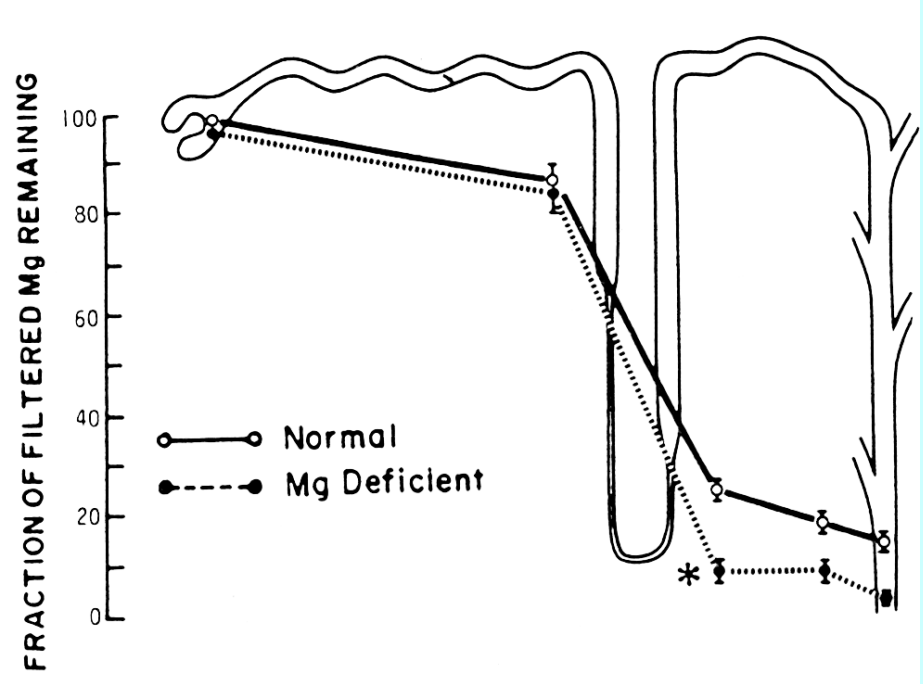
1999 : découverte de mutations de PCLN-1
dans l'hypomagnésémie hypercalciurie familiale

Simon et al Science 1999;285:103-106

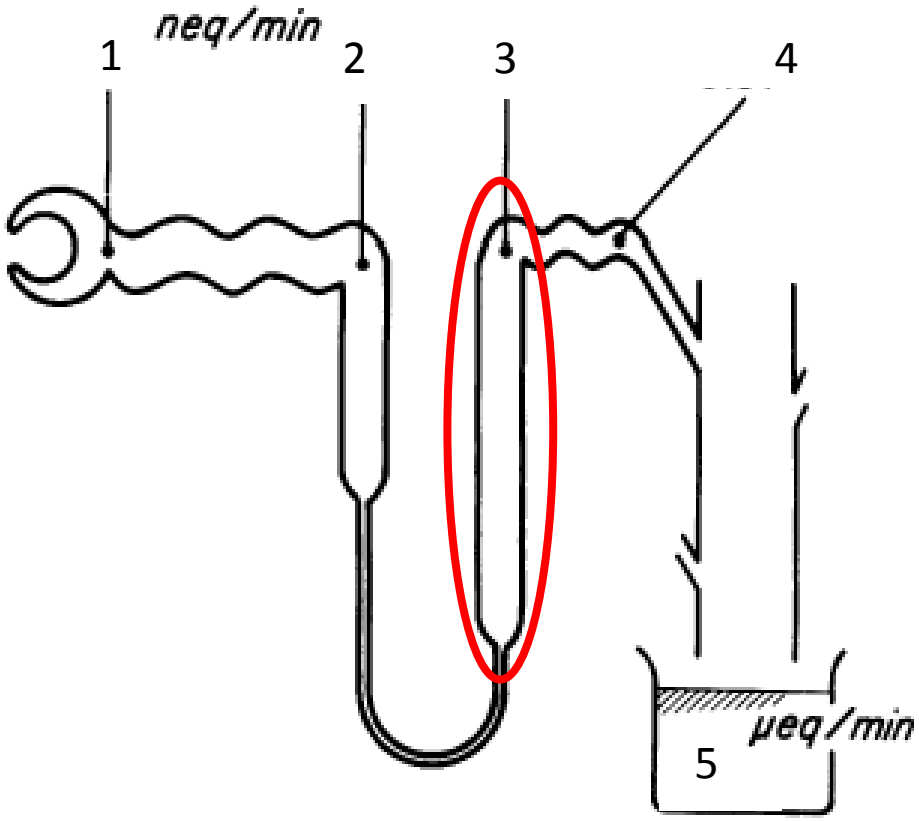
Fuite rénale de Mg

Quelle région du néphron pourrait en être responsable ?

Réabsorption tubulaire segmentaire du magnésium



Anse large ascendante de Henle

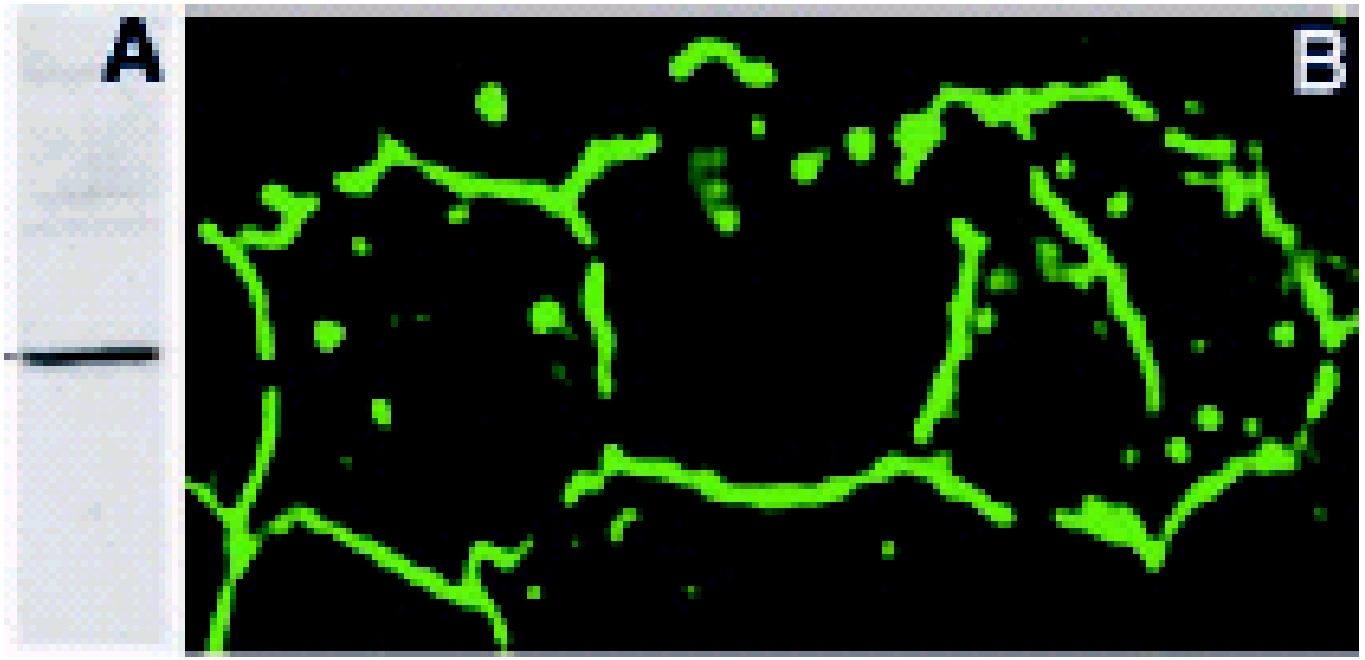


Comment est réabsorbé le Mg dans ce segment ?

Transcellulaire ?

Paracellulaire ?

Localisation de la Paracelline -1 dans l'anse de Henle

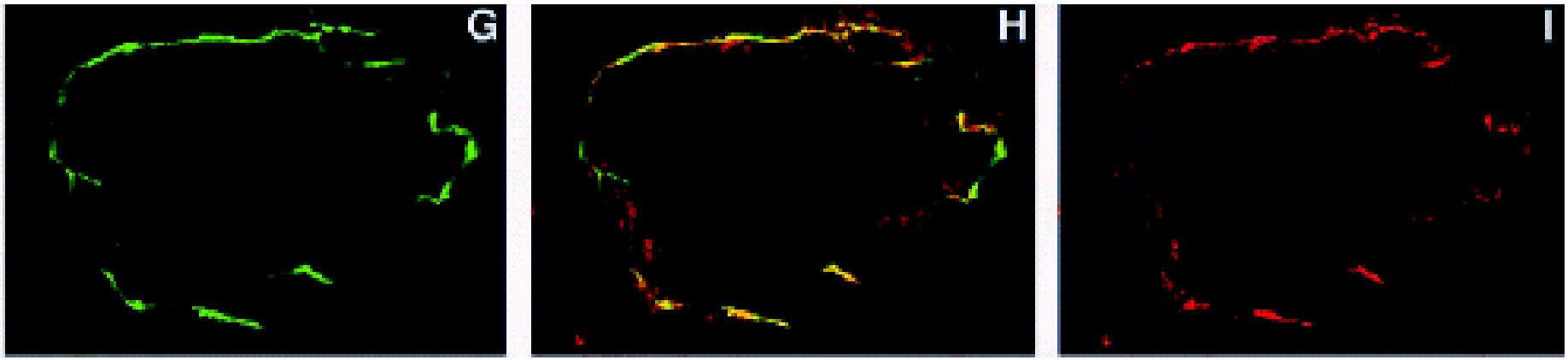


Localisation paracellulaire

Quelles sont les protéines associées à la paracelline ?

Simon et al. Science 1999;285:103-106

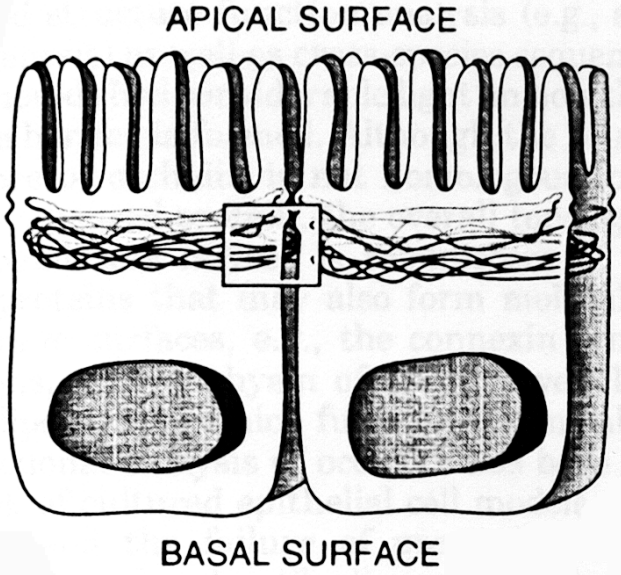
Simon et al. Science 1999;285:103-106

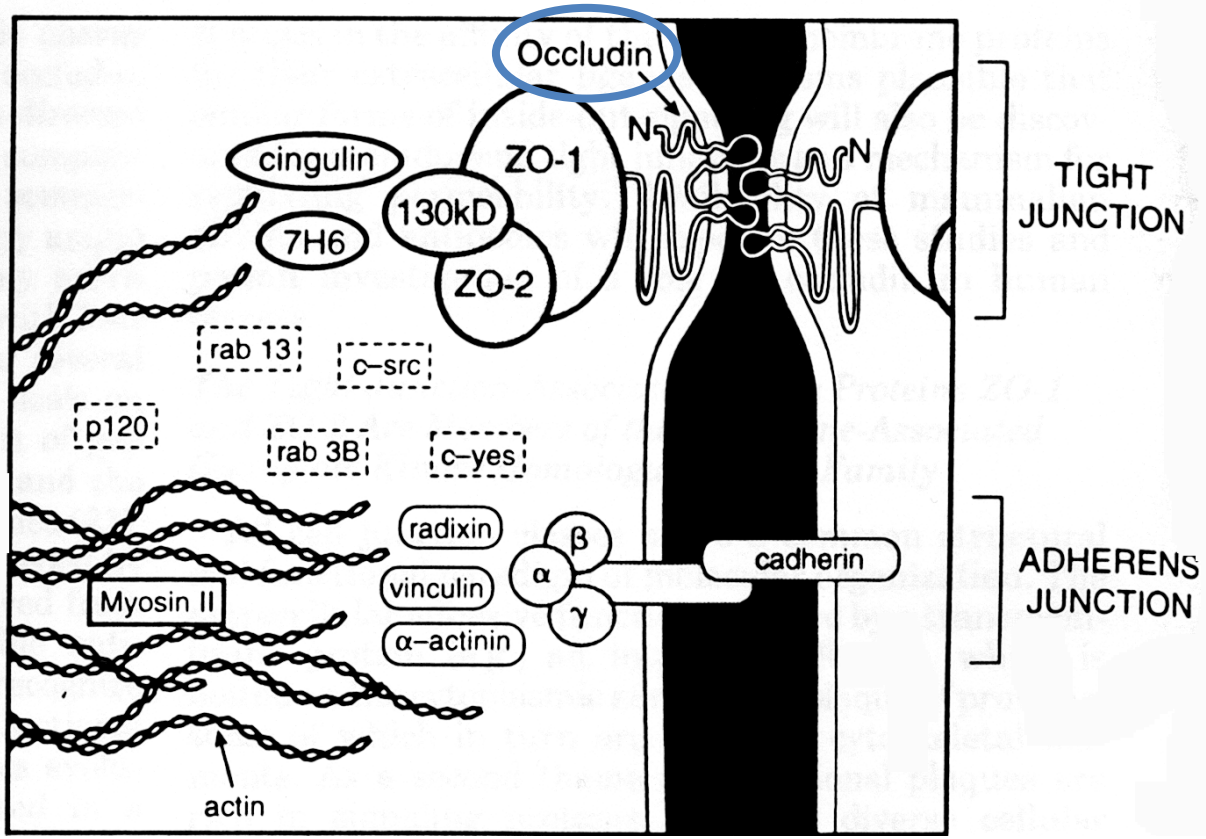


Occludine Colocalisation **Paracelline-1**

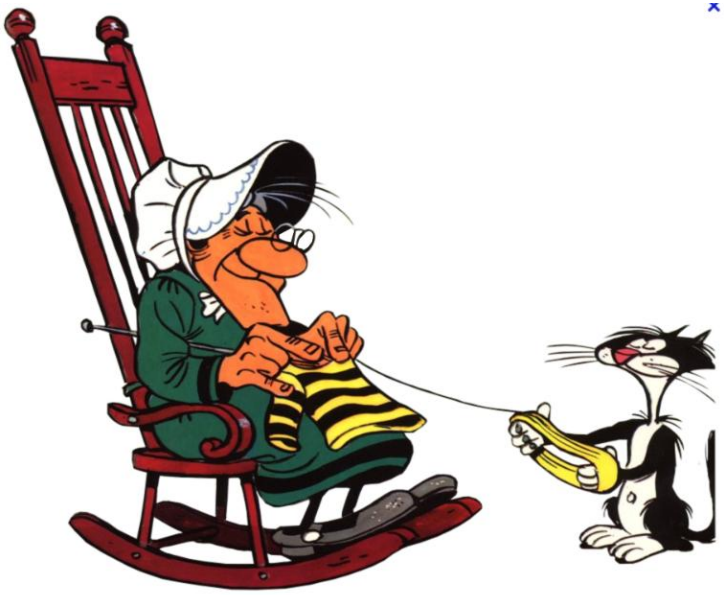
Co-localisation occludine-paracelline -1

Les protéines des jonctions intercellulaires





On en est où ?



L'hypomagnésémie de l'HHF est associée à une mutation dans le gène codant pour la paracelline

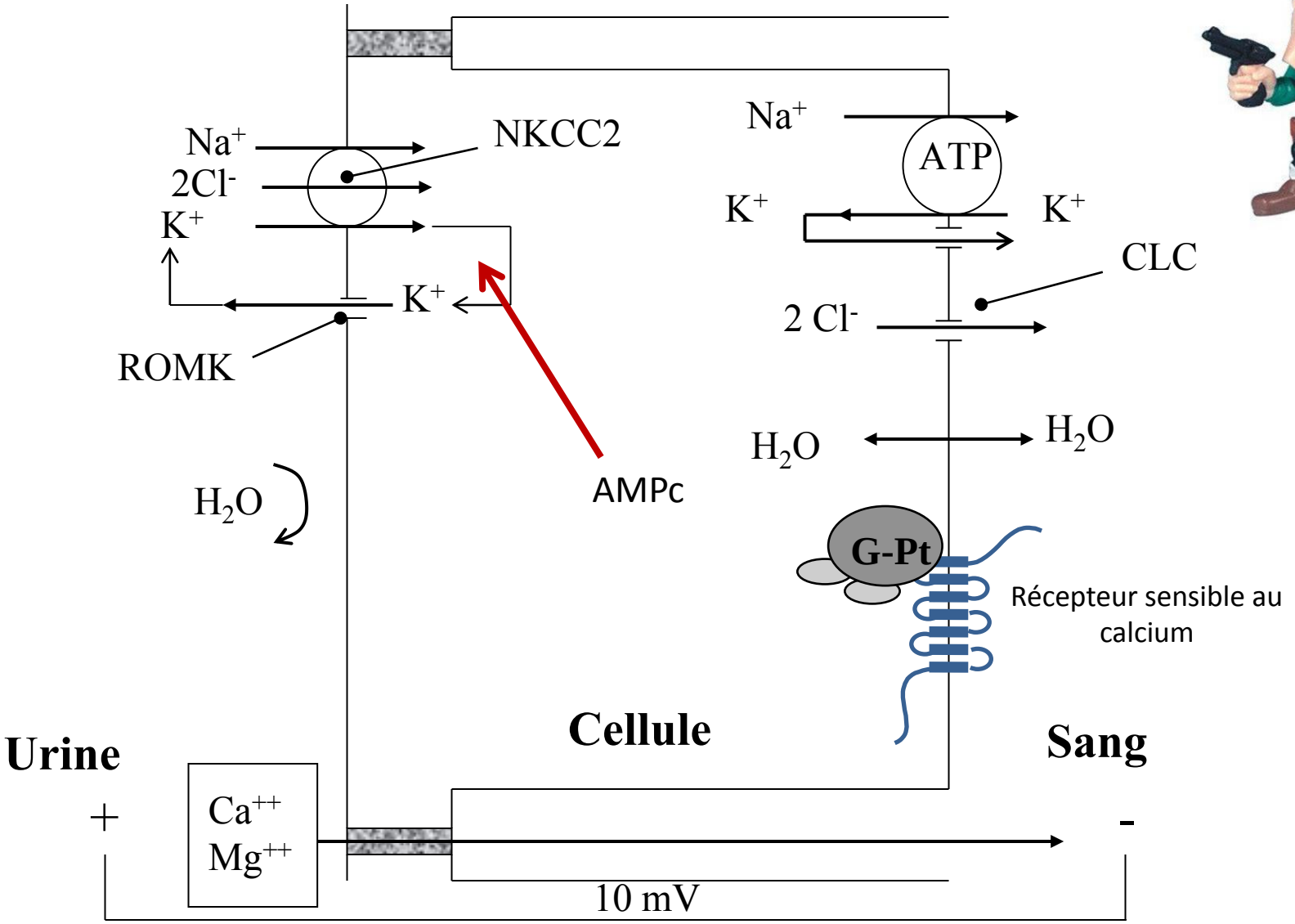
Le Mg filtré est essentiellement réabsorbé dans l'anse large de Henle

La paracelline est une protéine des jonctions serrées de l'anse de Henle

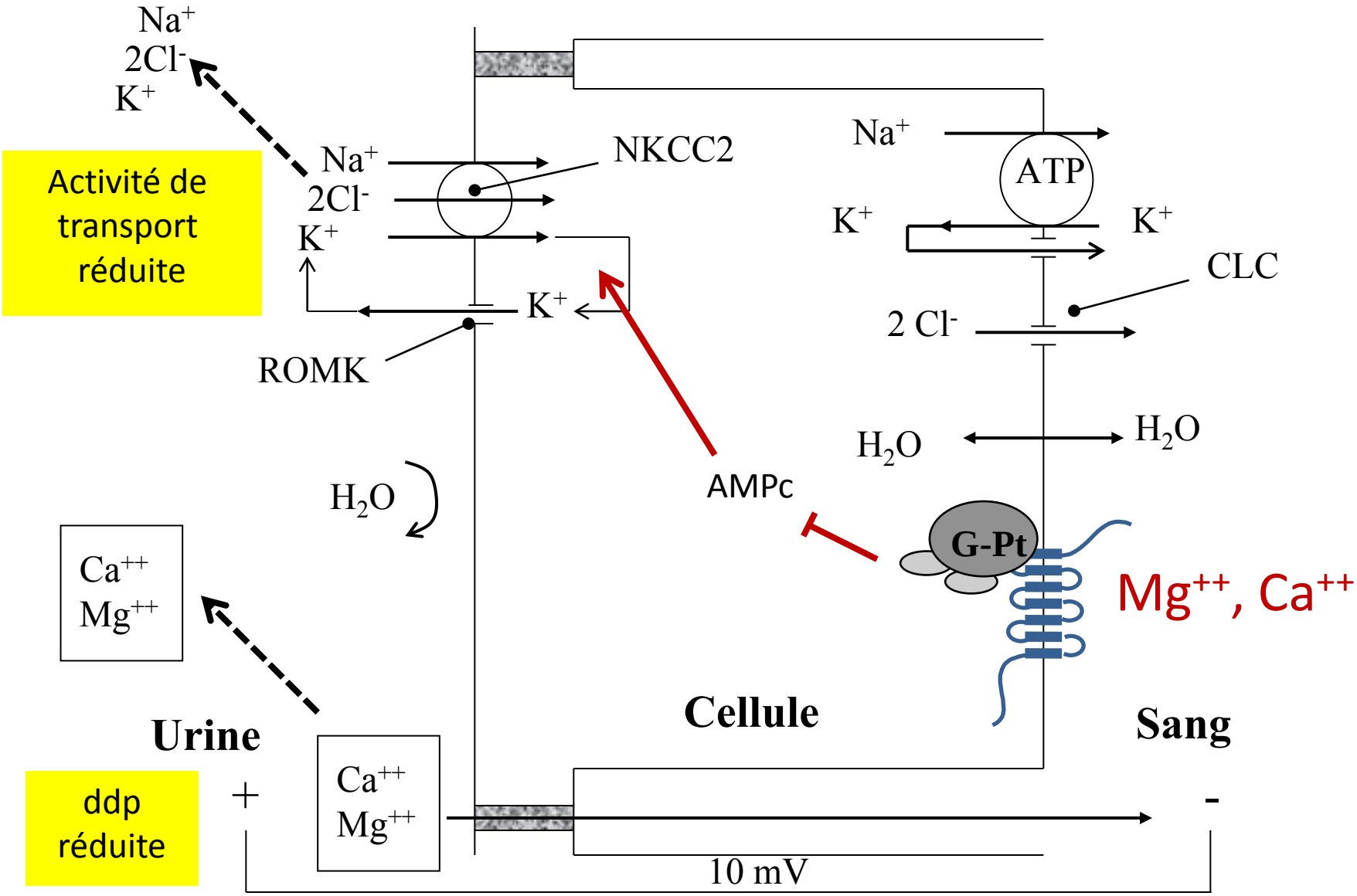
Comment montrer que la réabsorption de Mg est bloquée chez les patients atteints d'HHF ?

Fonctionnement de l'anse large ascendante de Henle

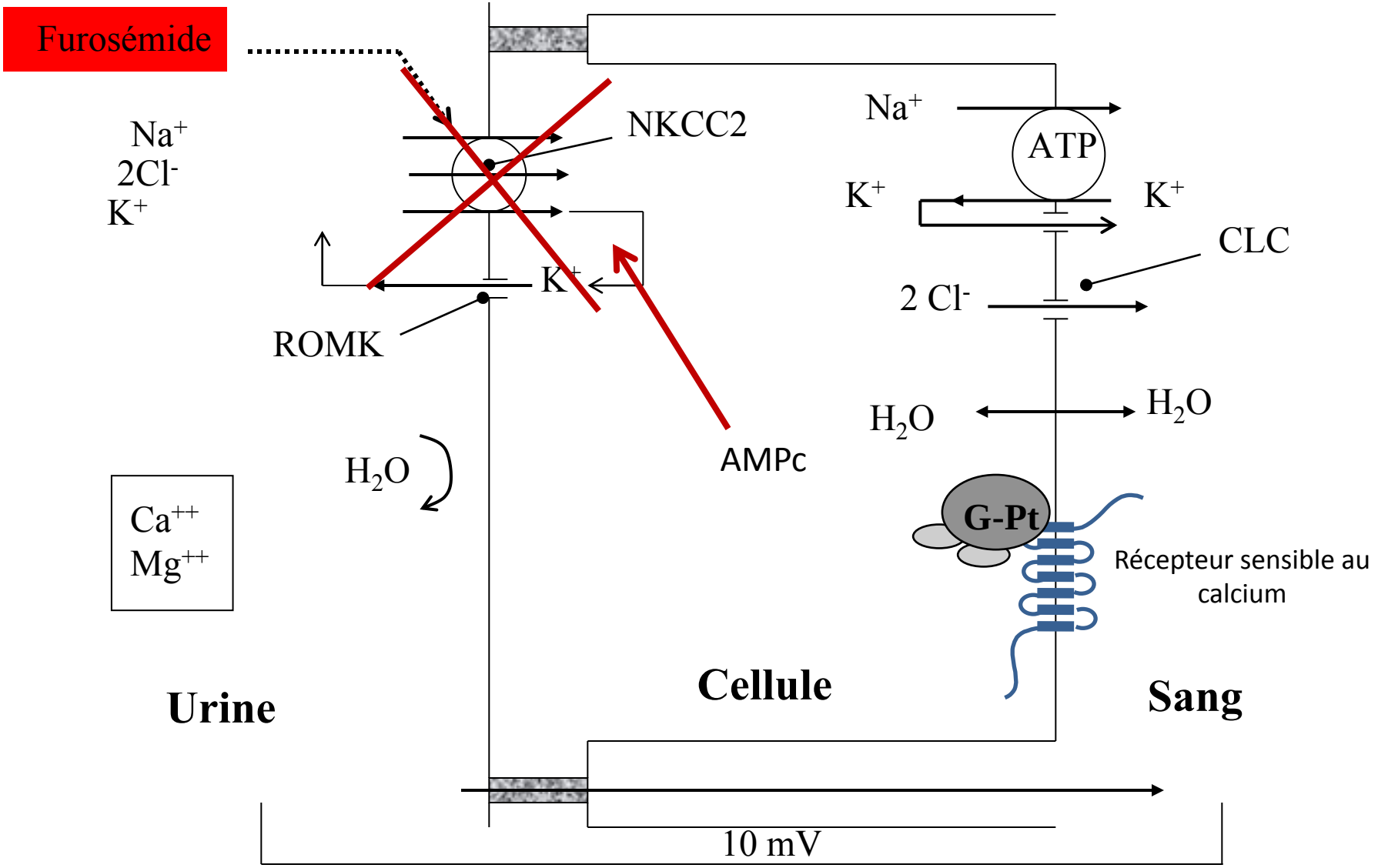




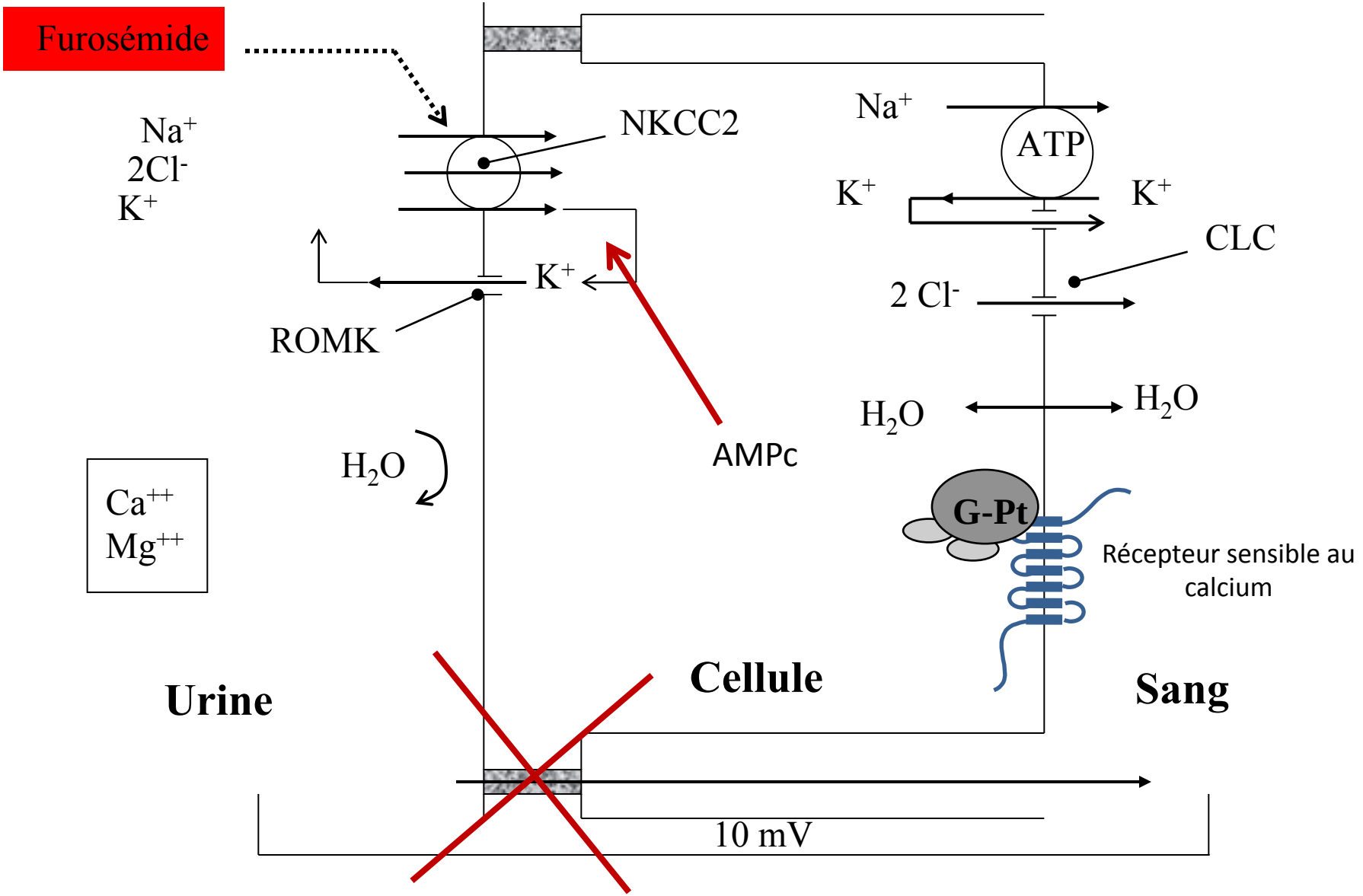
Effet du Mg sur l'anse large ascendante de Henle



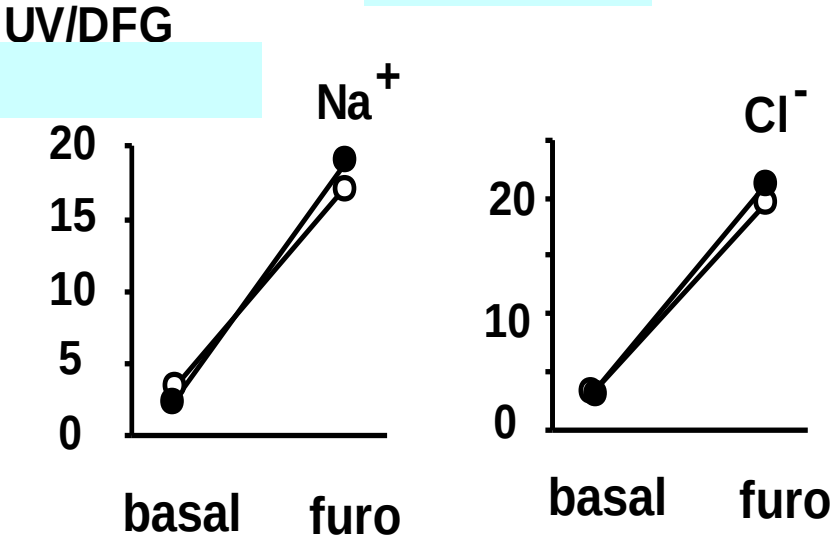
Effet du furosémide sur l'anse large ascendante de Henle



Effet du furosémide en présence d'une mutation de la paracelline



Effet du furosémide en présence d'une mutation de la paracelline

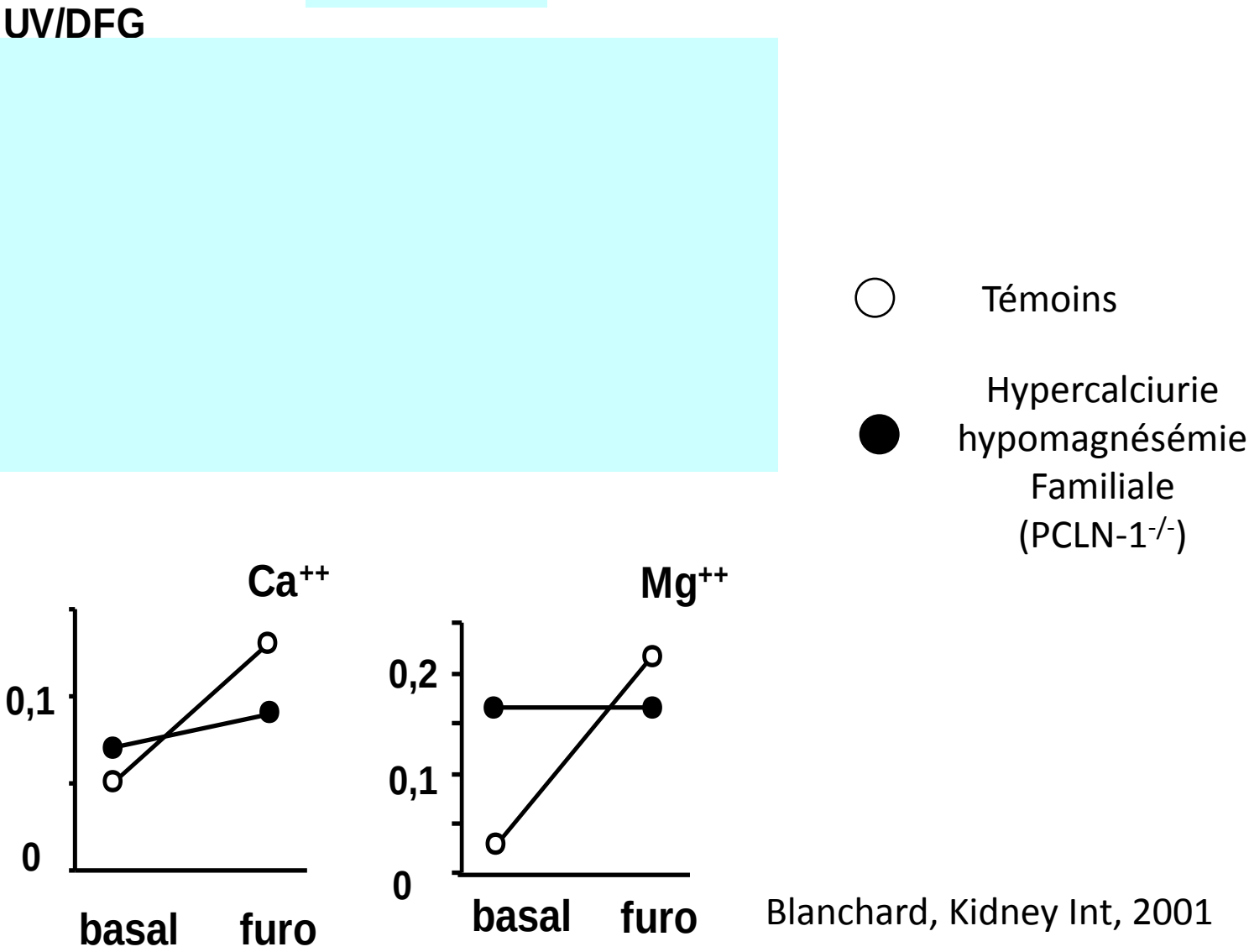


○ Témoins

● Hypercalciurie hypomagnésémie Familiale (PCLN-1$^{-/-}$)

Blanchard, Kidney Int, 2001

Effet du furosémide en présence d'une mutation de la paracelline



Blanchard, Kidney Int, 2001

Effet du furosémide en présence d'une mutation de la paracelline

Sujet normal
(effet diurétique + fuite de cations divalents)

↗ natriurèse

↗ chlorurie

↗ magnésurie

↗ calciurie

Patient atteint d'HHF
(effet diurétique seul)

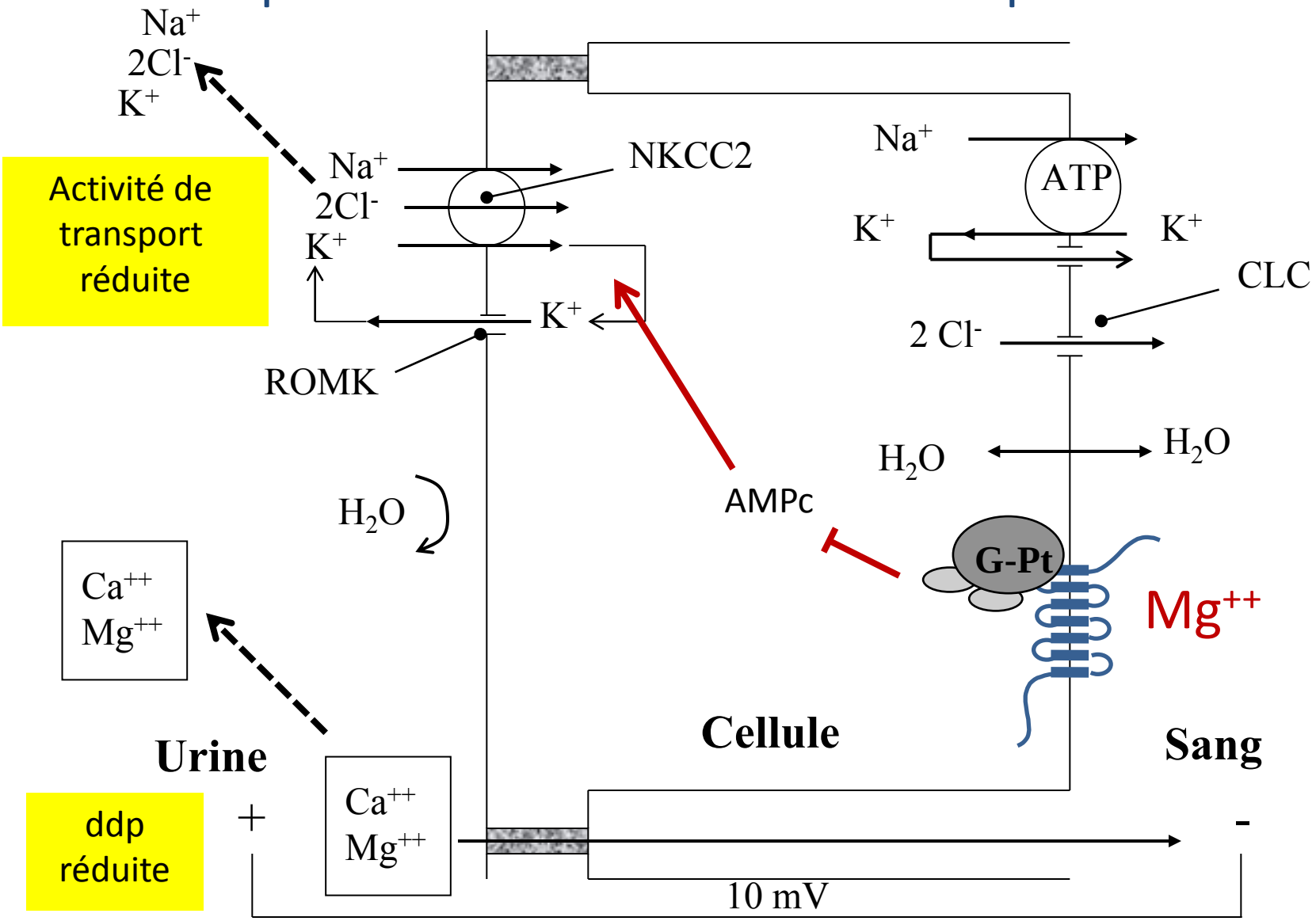
↗ natriurèse

↗ chlorurie

Magnésurie inchangée

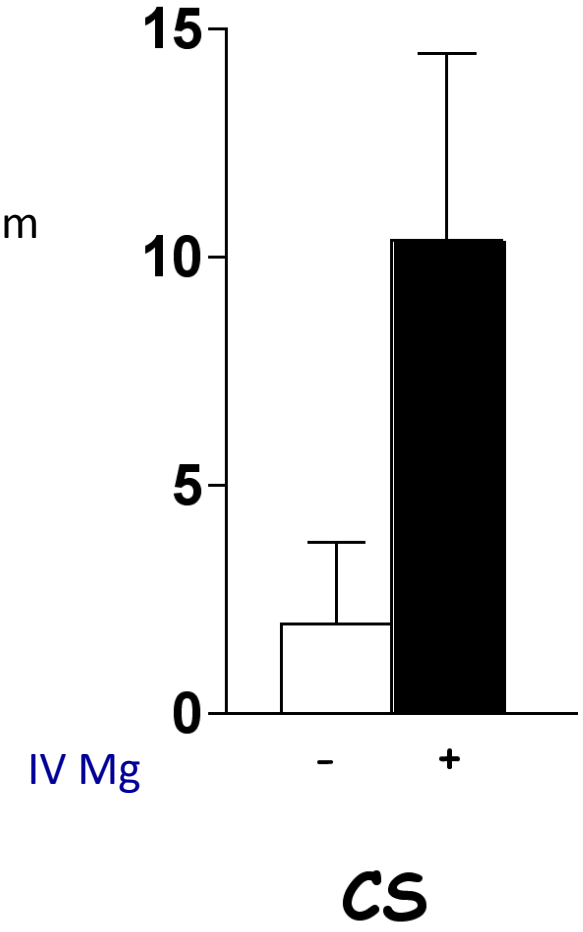
Calciurie inchangée

Effet de l'apport de Mg
en présence d'une mutation de la paracelline



Effet de l'apport de Mg en présence d'une mutation de la paracelline

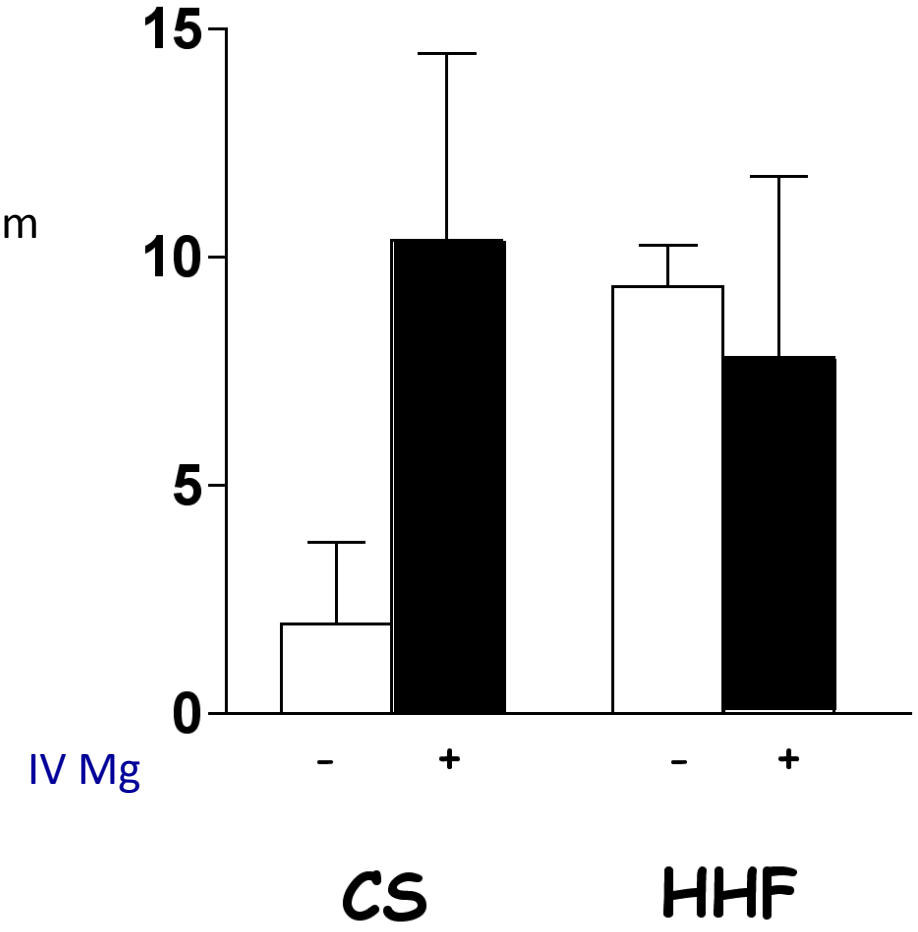
Excrétion fractionnelle
du calcium
rapportée à celle du sodium



Blanchard, KI, 2001

Effet de l'apport de Mg en présence d'une mutation de la paracelline

Excrétion fractionnelle du calcium rapportée à celle du sodium



Blanchard, KI, 2001

Effet du $MgCl_2$ en présence d'une mutation de la paracelline

Sujet normal

↗ natriurèse

↗ calciurie

↗ Fe_{Ca}/Fe_{Na}

Patient atteint d'HHF

Natriurèse élevée et inchangée

Calciurie élevée et inchangée

Fe_{Ca}/Fe_{Na} inchangée

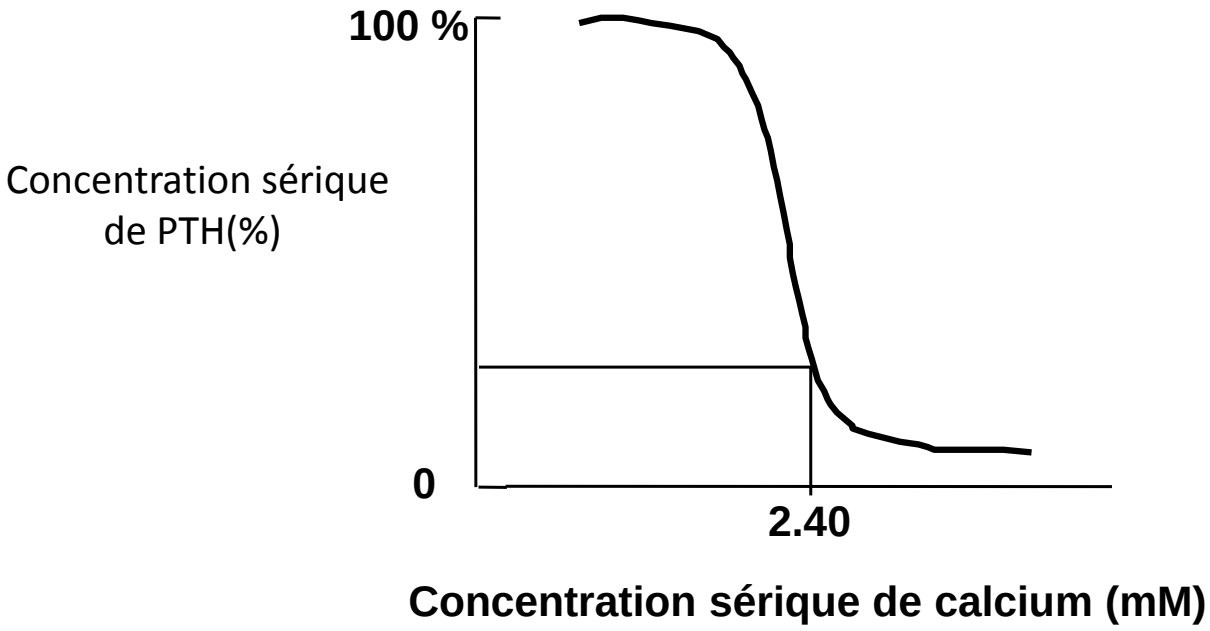
Plan de la suite du cours

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

Rôle du cotransporteur NaPi

Exemples de recherche avec des biomarqueurs

La PTH est sécrétée en fonction de la calcémie



Démarche analytique

Existerait-il un récepteur sensible au Ca sur les glandes parathyroïdes ?

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

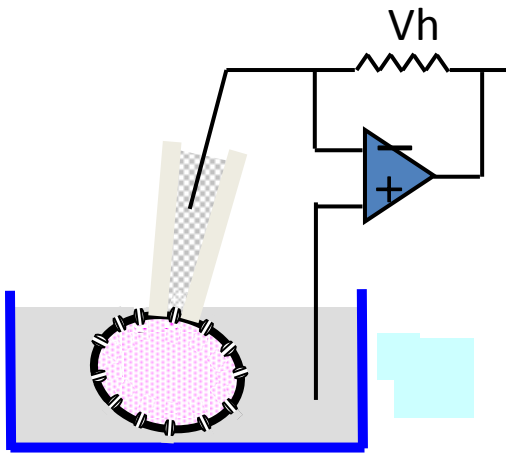
Clonage : transfection de bactéries par les vecteurs, sélection des clones transfectés, amplification des clones

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

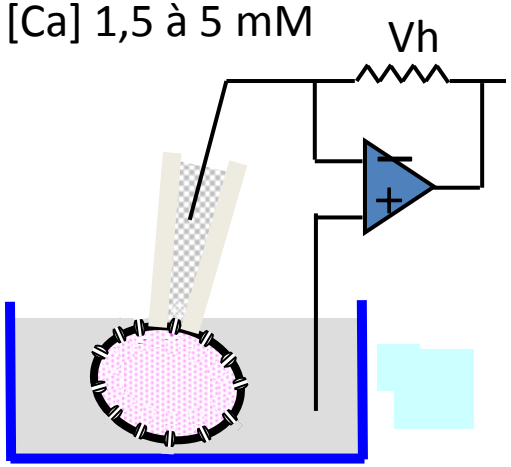
Etude fonctionnelle (ici, patch-clamp)

Application : récepteur sensible au calcium

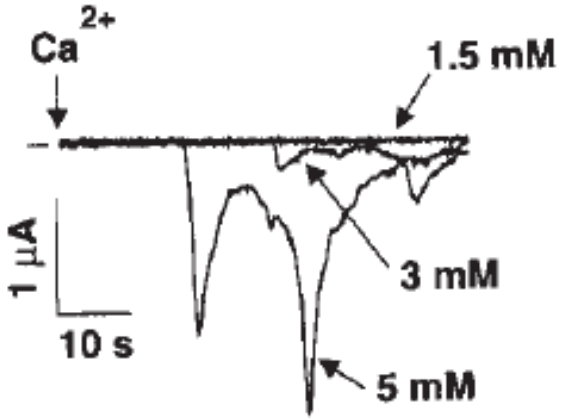
Préparation de parathyroïde bovine: Récepteur sensible au calcium et au Mg

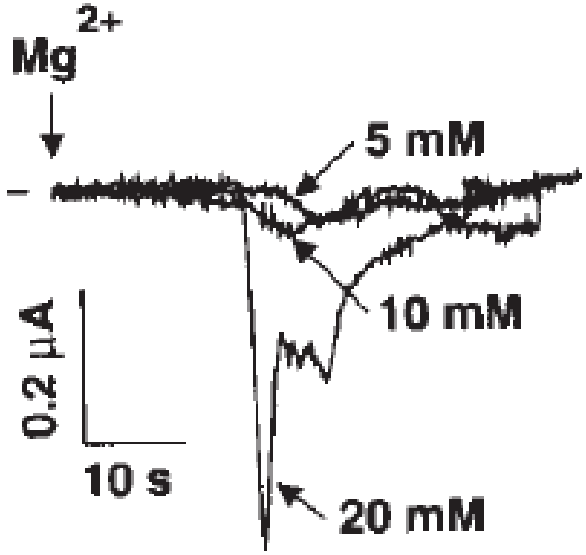


[Ca] 1,5 à 5 mM



[Mg] 5 à 20 mM





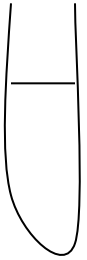
Brown, Nature, 1993

Criblage de banque de cDNA de parathyroïde bovine

Brown, Nature, 1993

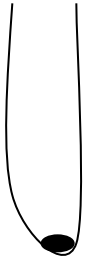


Dissection broyage



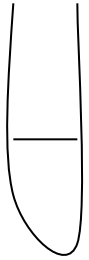
Homogénat

Extraction au chloroforme



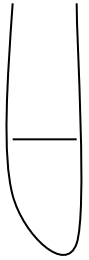
mRNA

Reverse transcription



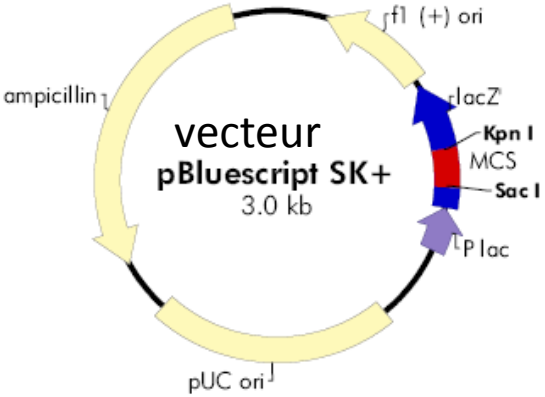
cDNA

Enzyme de restriction

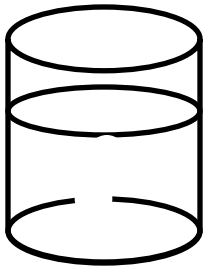


Fragments de cDNA

DNA ligase

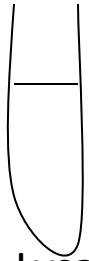


Transformation de bactéries
Sélection des clones
Amplification par repiquage



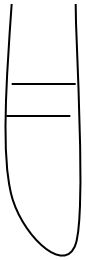
Clones bactériens

Lyse alcaline



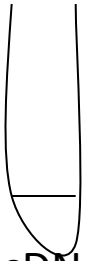
Lysat bactérien

Extraction au CsCl



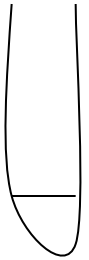
plasmides

Enzyme de restriction



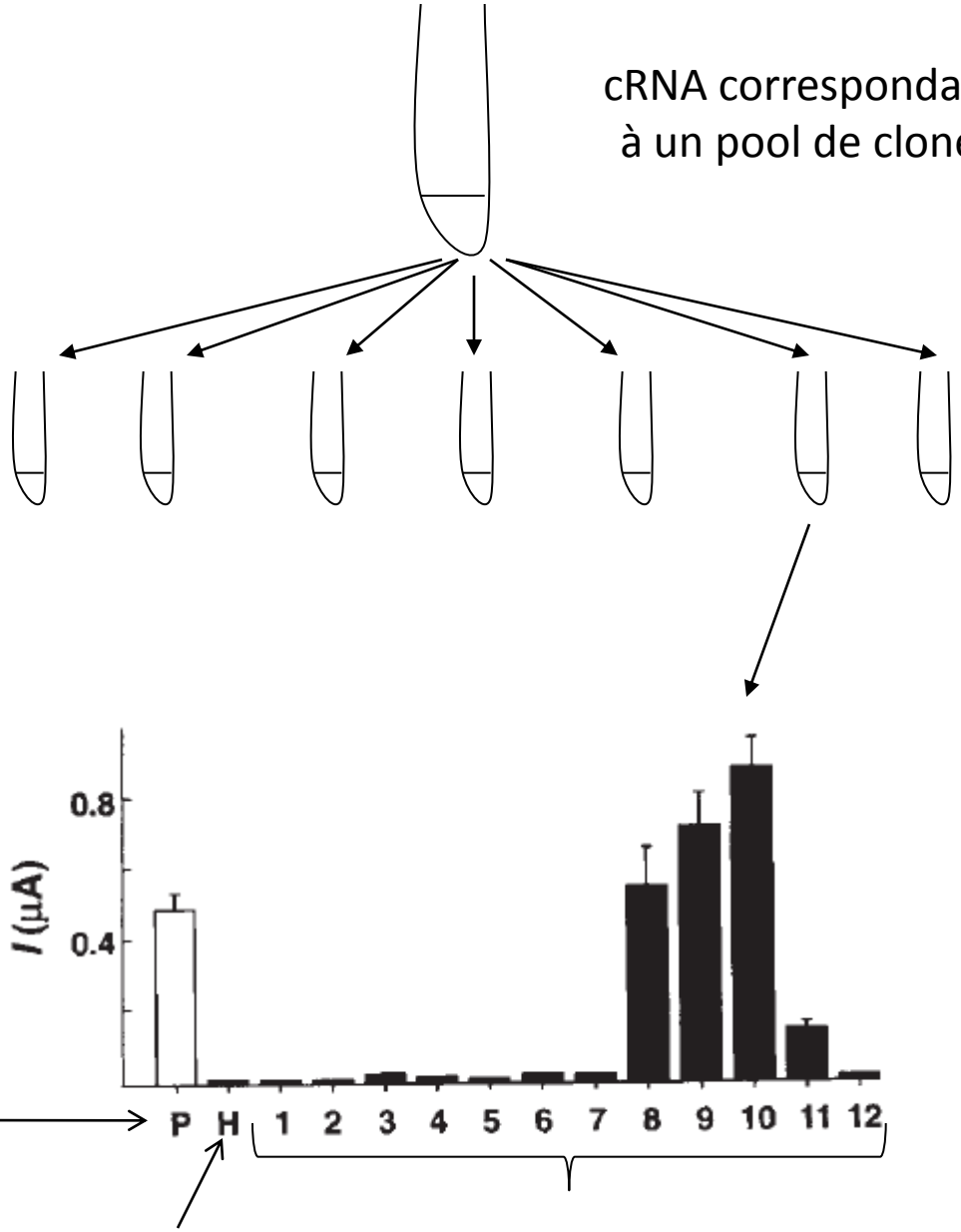
cDNA de rein

transcription



cRNA

cRNA correspondant
à un pool de clones



Courant
de réponse
au Gd3+

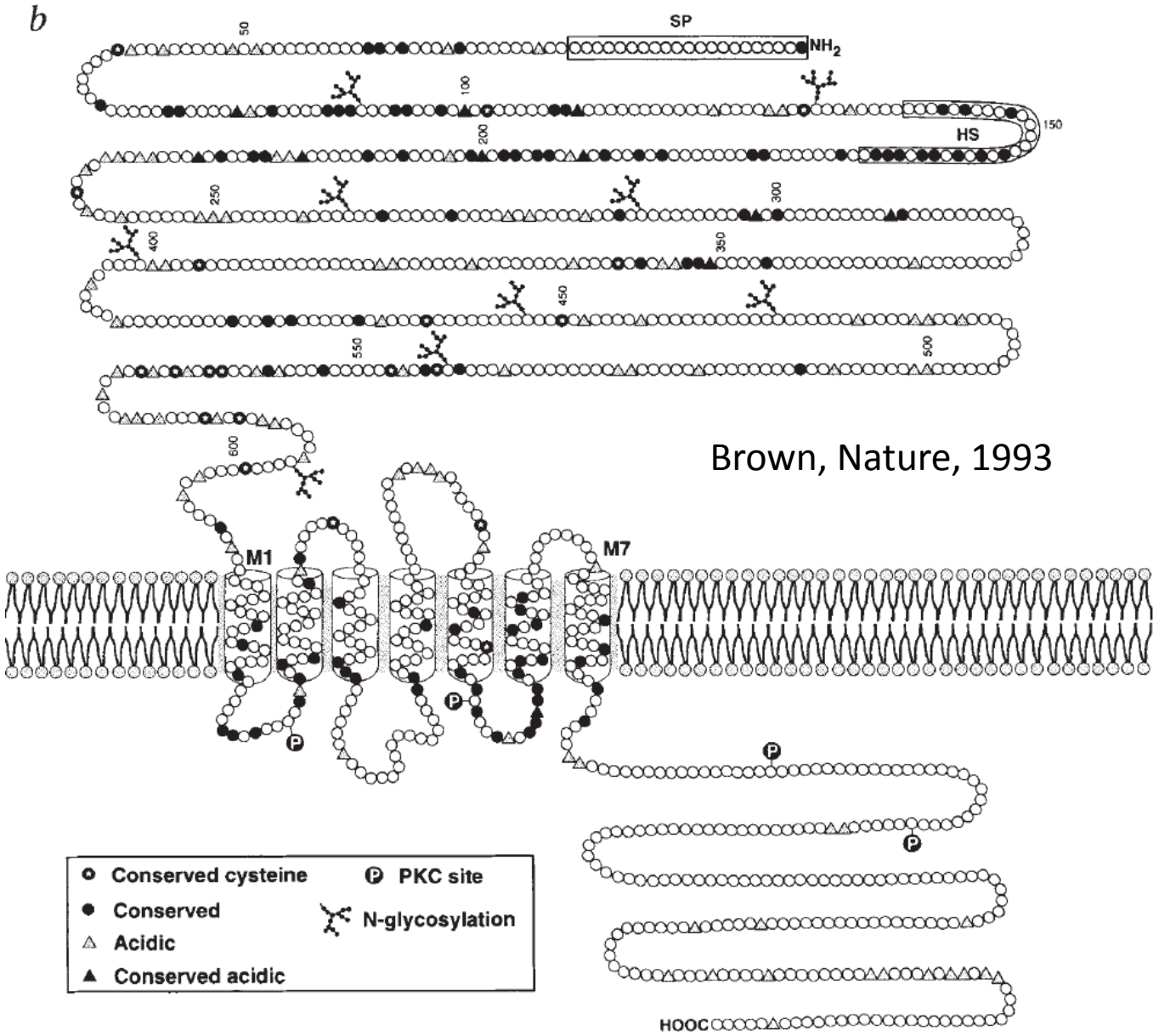
Pool d'ARNm
de parathyroïde

H2O

Clones 1 à 12

Brown, Nature, 1993

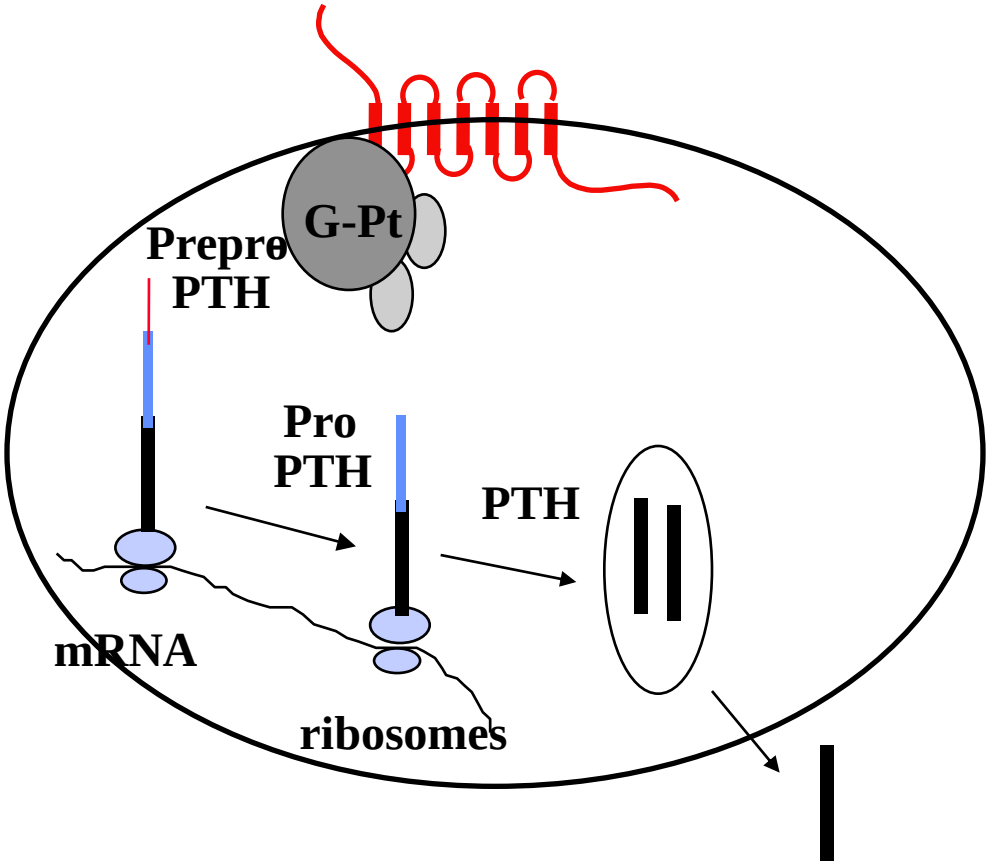
Récepteur sensible aux cations divalents



Brown, Nature, 1993

Récepteur sensible aux cations divalents

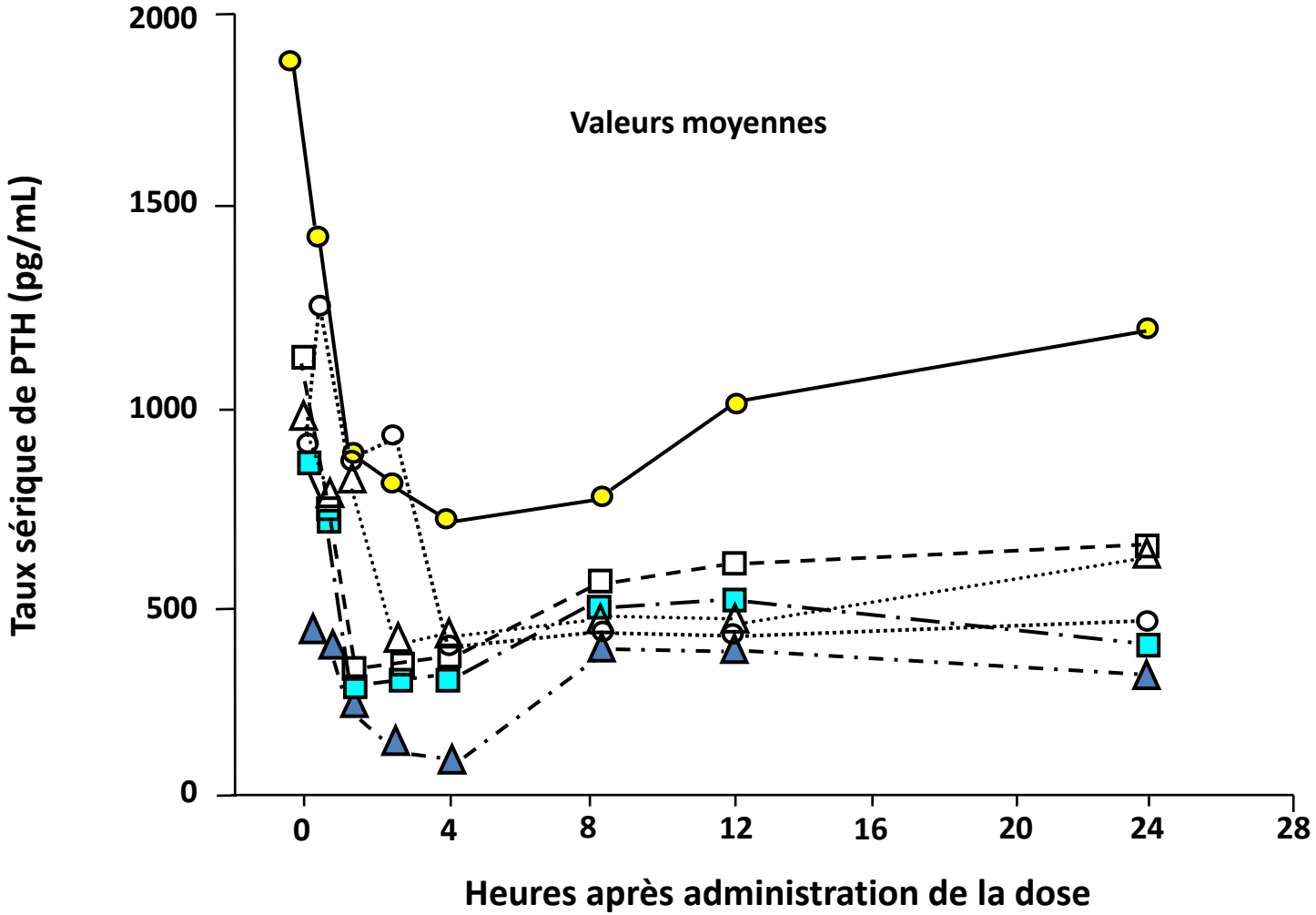
Cellule parathyroïdienne



Développement d’un médicament

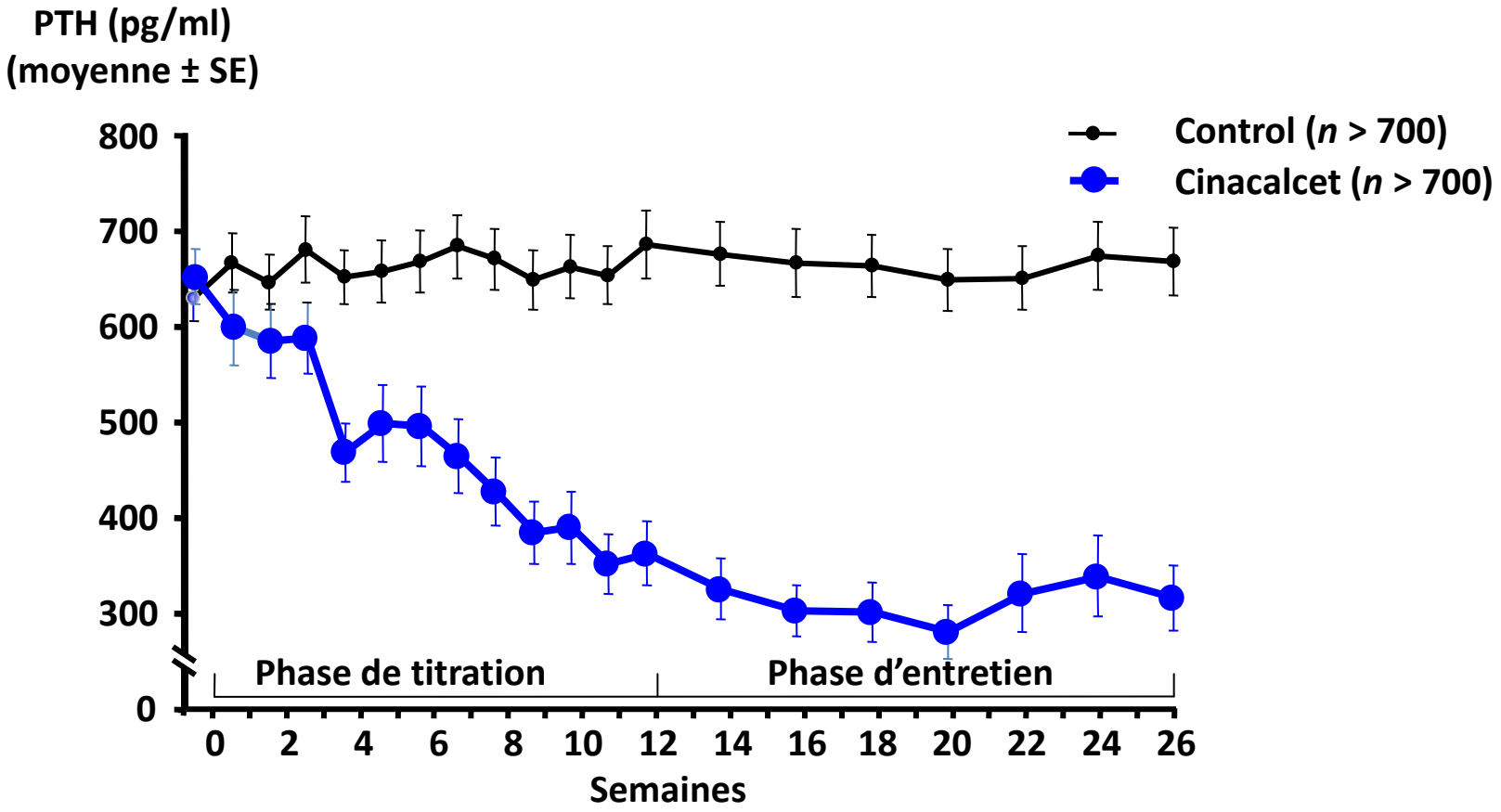
Le cinacalcet est un antgoniste du récepteur sensible au calcium

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



Goodman WG et al. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:1017–24

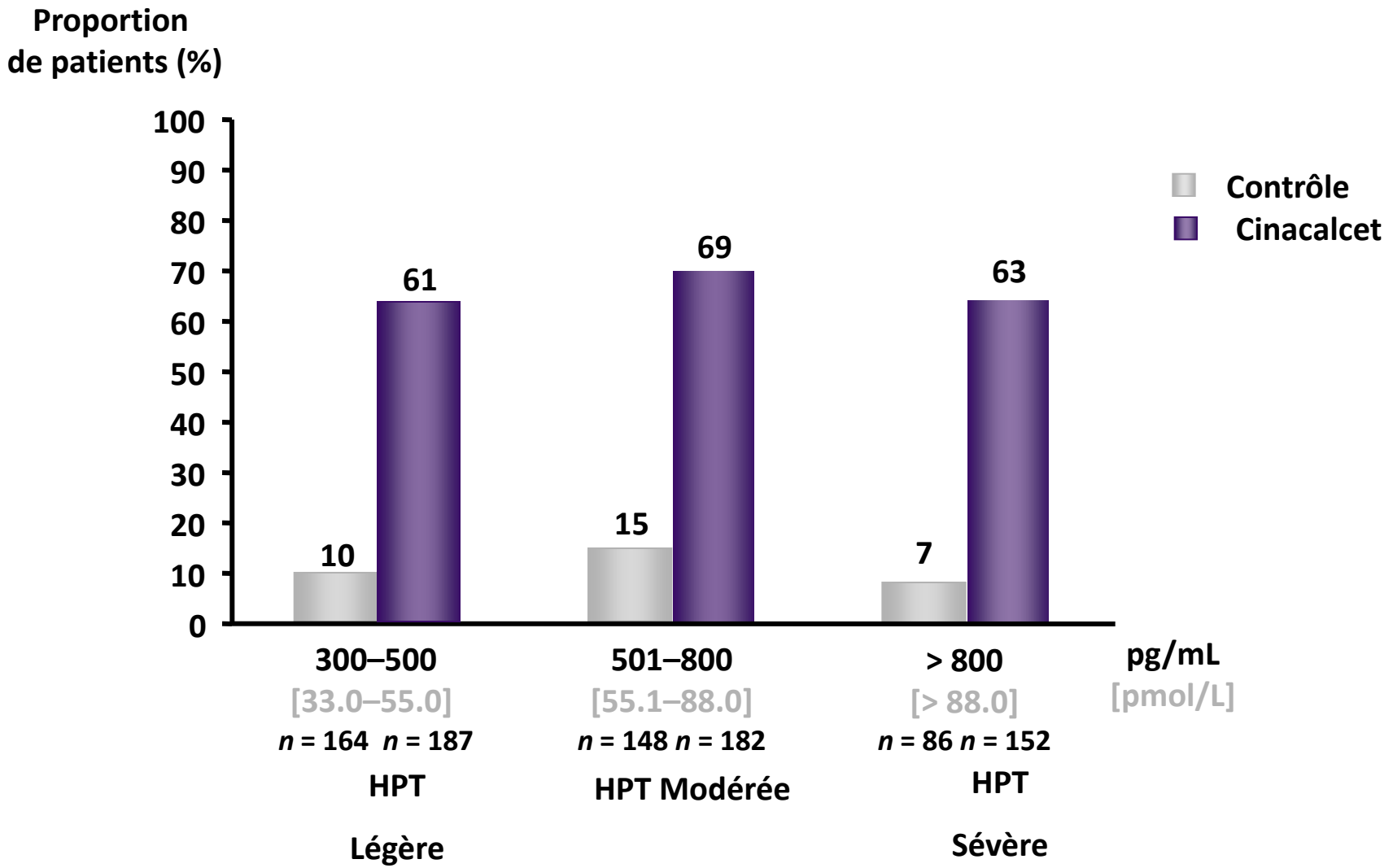
Effet du cinacalcet sur la PTH



de Francisco ALM *et al. J Am Soc Nephrol* 2003;14:461A(SA-PO742)

Block GA, et al. Cinacalcet for secondary hyperparathyroidism in patients receiving hemodialysis. *N Engl J Med* 2004;350:1516-25

Proportion de patients atteignant une réduction ≥ 30% de PTH



Quarles LD *et al. J Am Soc Nephrol* 2003;14:463A(SA-PO751)

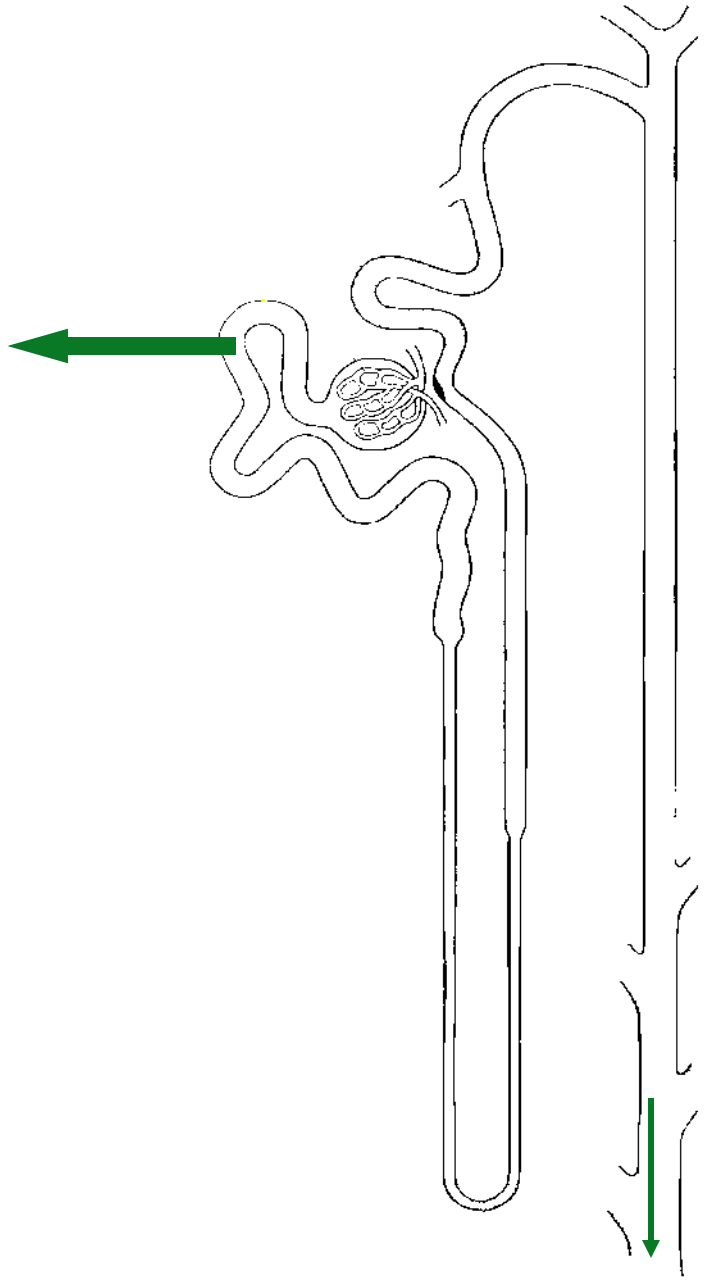
de Francisco ALM *et al. J Am Soc Nephrol* 2003;14:461A(SA-PO742)

Block GA, et al. Cinacalcet for secondary hyperparathyroidism in patients receiving hemodialysis. *N Engl J Med* 2004;350:1516-25

Les Phosphates

Réabsorption proximale

80%
Phosphate filtré



20%
Phosphate filtré

Comment la phosphaturie est-elle modulée ?

Cotransporteur Na-Pi

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

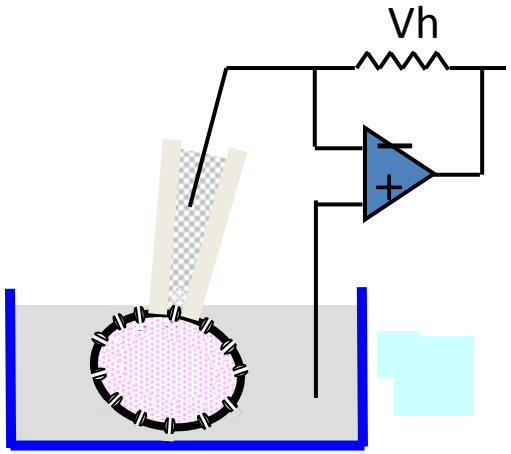
Clonage : transfection de bactéries par les vecteurs, sélection des clones transfectés, amplification des clones

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

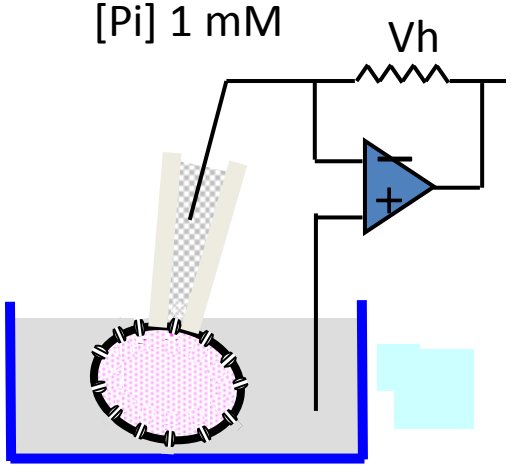
Etude fonctionnelle (ici, patch-clamp)

Application : transporteur NaPi de type 2

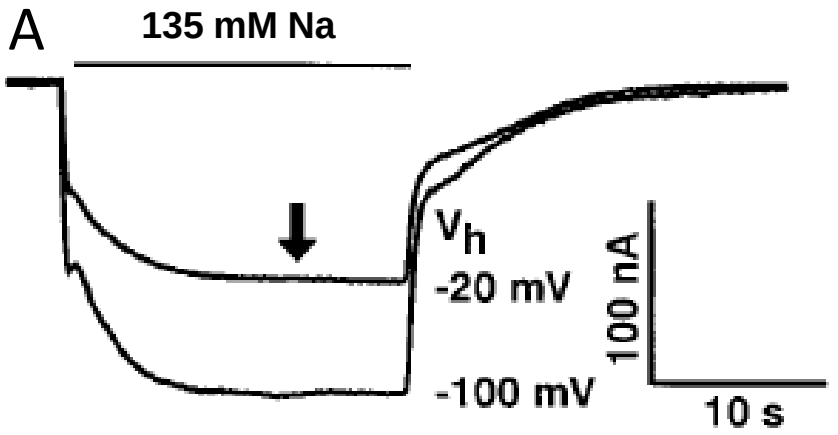
Préparation de vésicules de bordure en brosse : cotransport sodium-phosphate

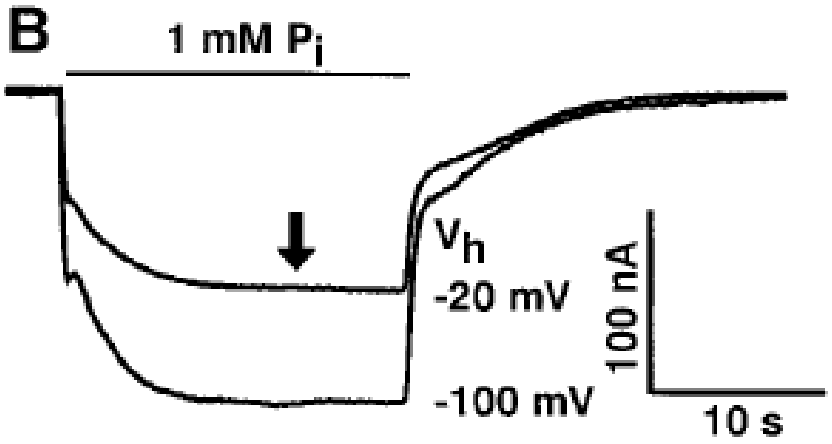


[Pi] 1 mM



[Na] 135 mM

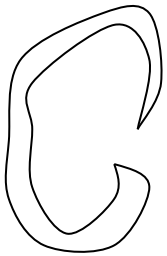




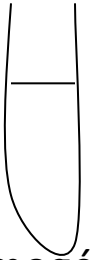
D'après Murer, Physiol rev 2000

Criblage de banque de cDNA de cortex de rein de lapin

Werner, PNAS 1991

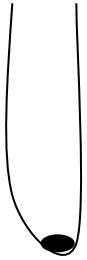


Dissection broyage



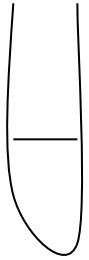
Homogénat de cortex

Extraction au chloroforme



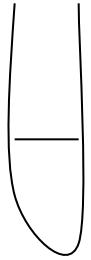
mRNA

Reverse transcription



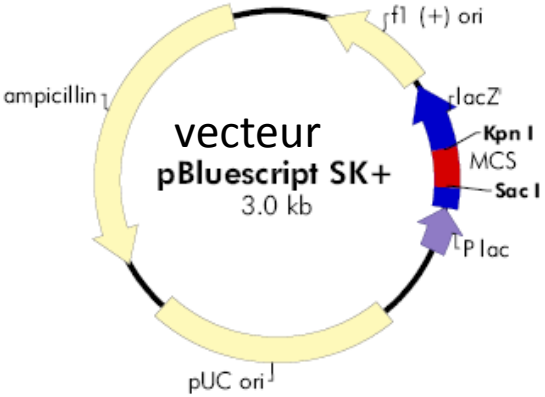
cDNA

Enzyme de restriction

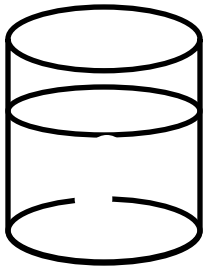


Fragments de cDNA

DNA ligase

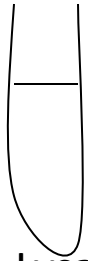


Transformation de bactéries
Sélection des clones
Amplification par repiquage



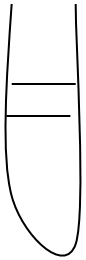
Clones bactériens

Lyse alcaline



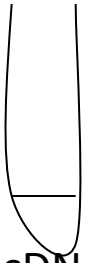
Lysat bactérien

Extraction au CsCl



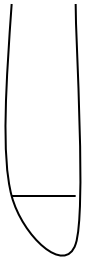
plasmides

Enzyme de restriction

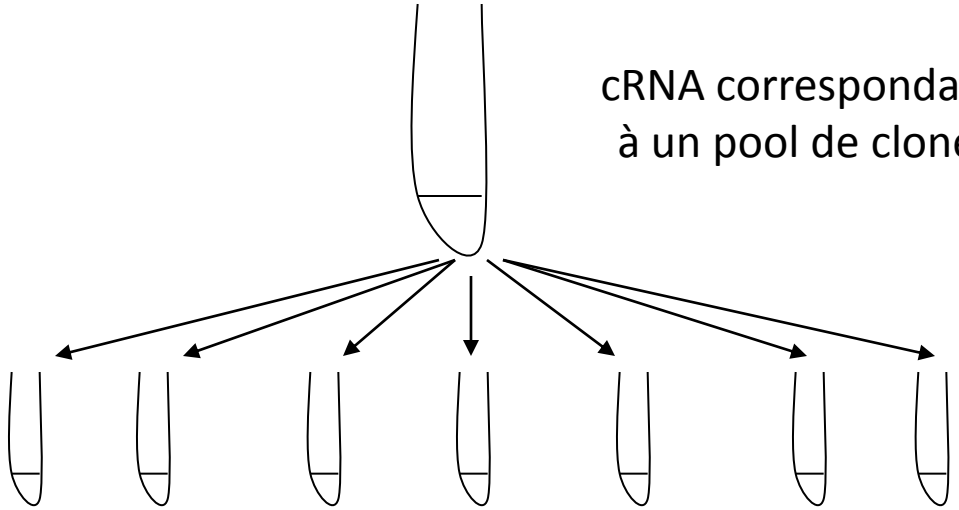


cDNA de rein

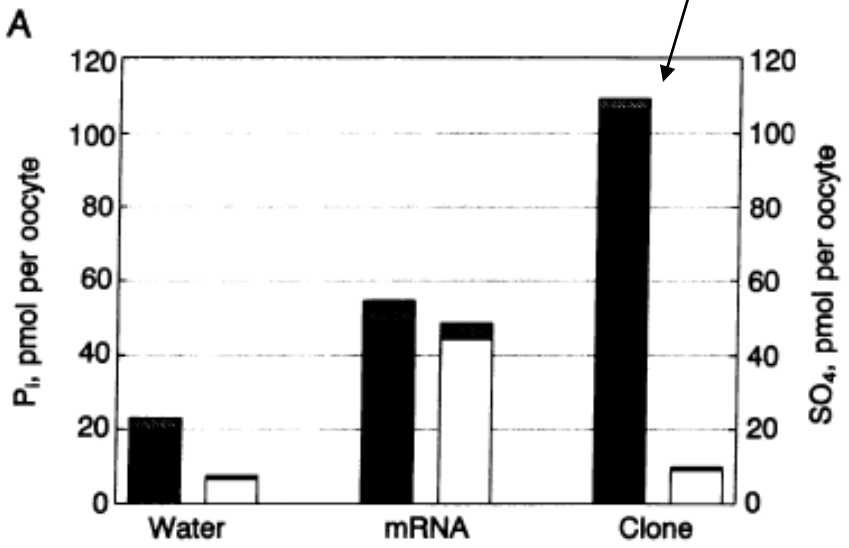
transcription



cRNA



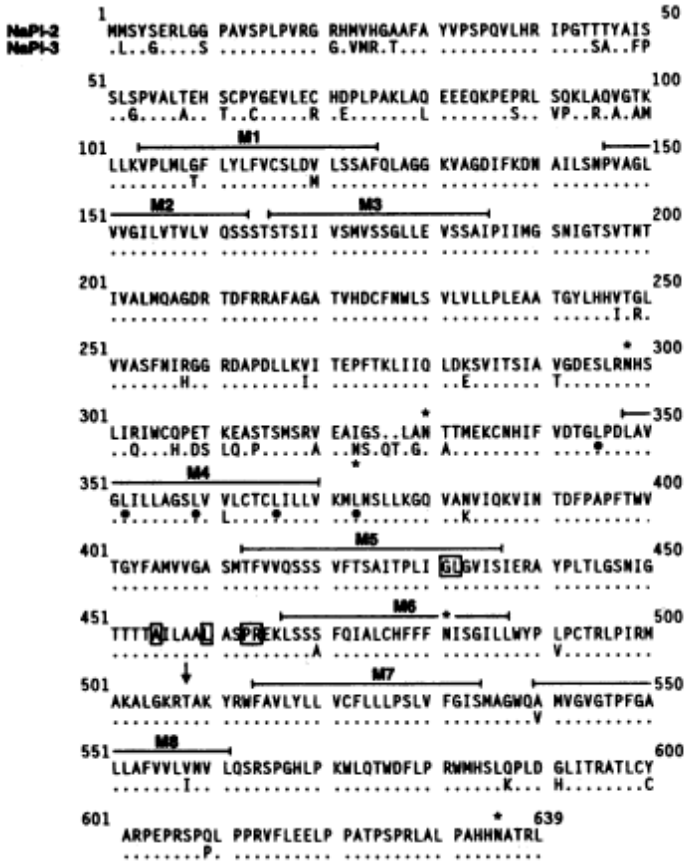
cRNA correspondant
à un pool de clones



Transport de Pi

Transport de SO_4

Werner, PNAS 1991

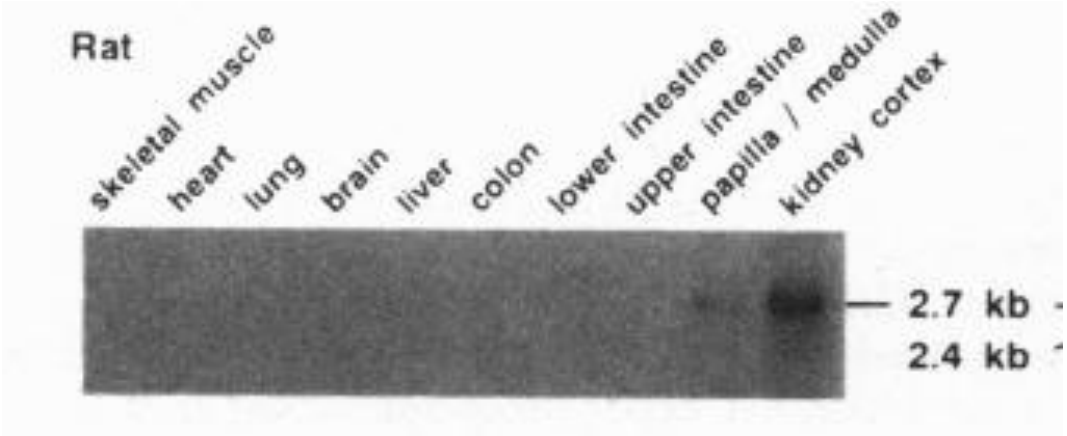


Séquençage du cDNA
du clone sélectionnné

Plusieurs séquences
correspondant à des gènes

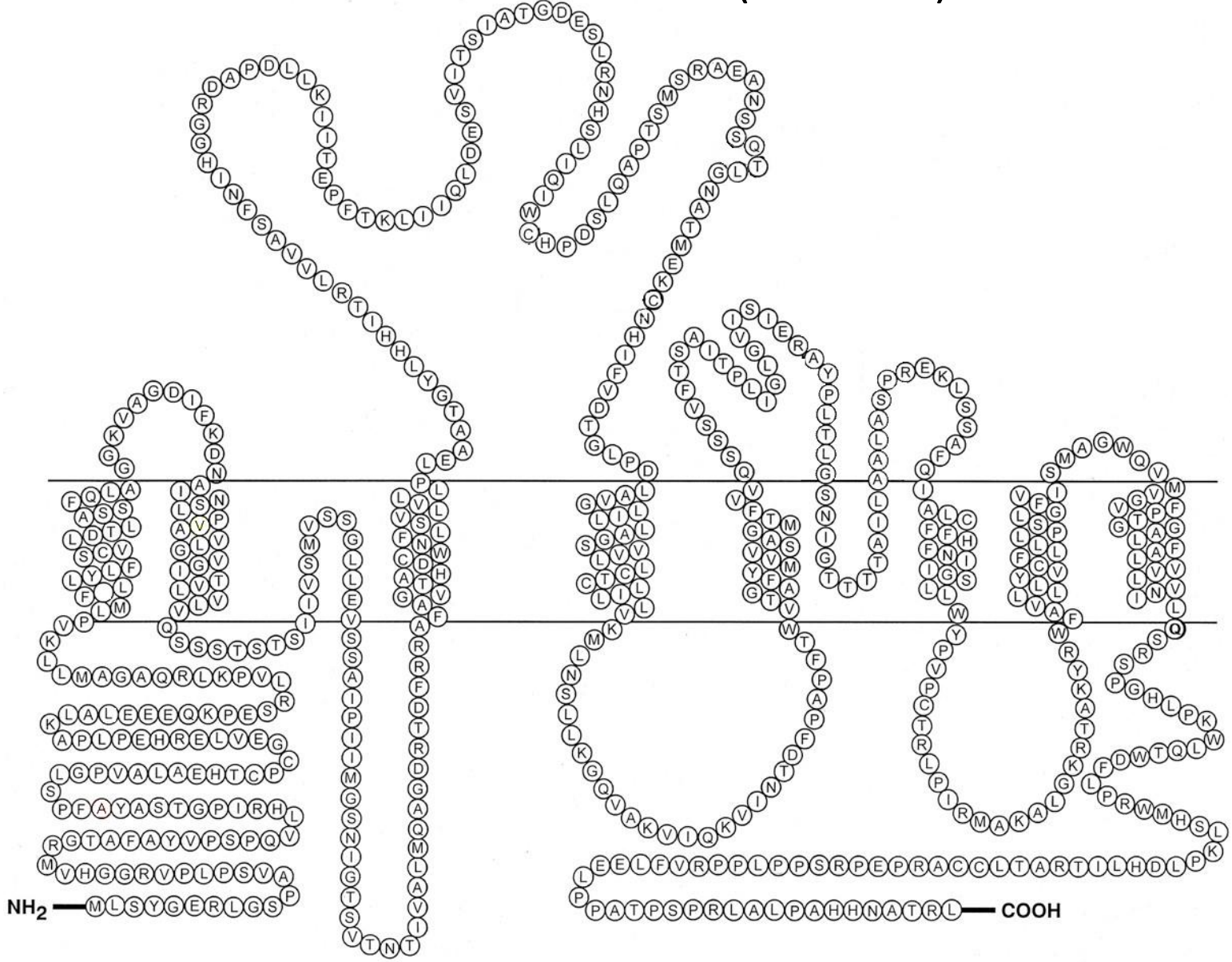
Synthèse de sondes spécifiques

Northern-blot pour NaPi-2



Magagnin, PNAS 1993

STRUCTURE DU NPT2a ou NaPi-2 (HUMAIN)

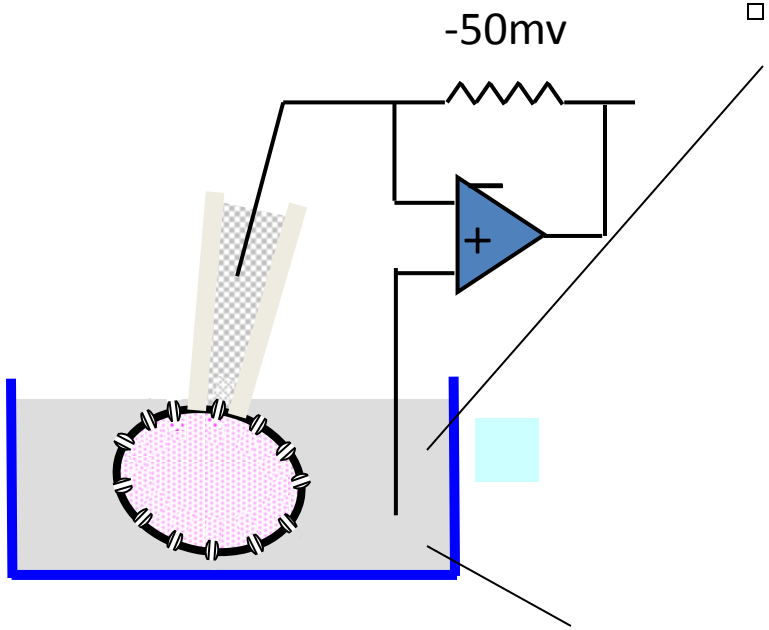


640 a.a.

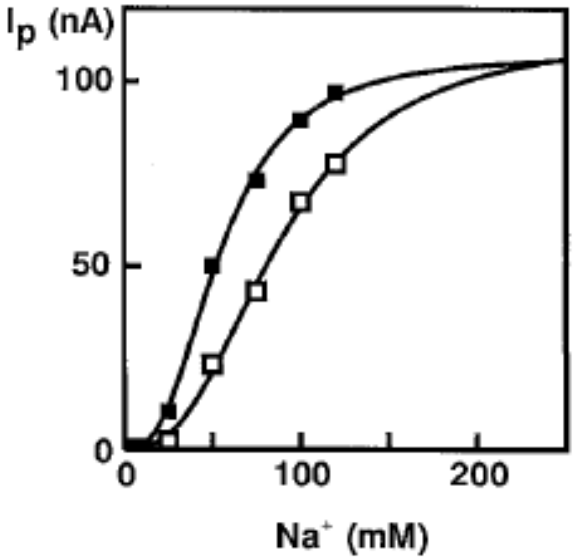
8 domaines transmembranaires

Localisation: pôle apical du tube proximal exclusivement

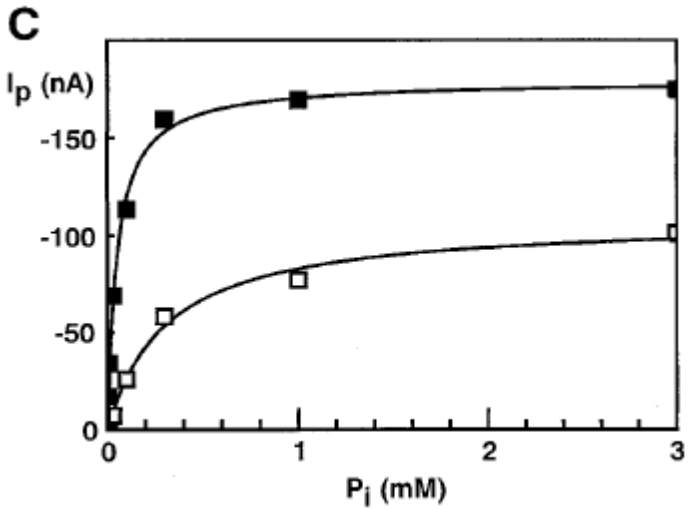
Expression hétérologue de NaPi-2 dans l'œuf de xénope



- ■ [Pi] 1 mM
- □ [Pi] 0,1 mM



- ■ [Na] 96 mM
- □ [Na] 50 mM



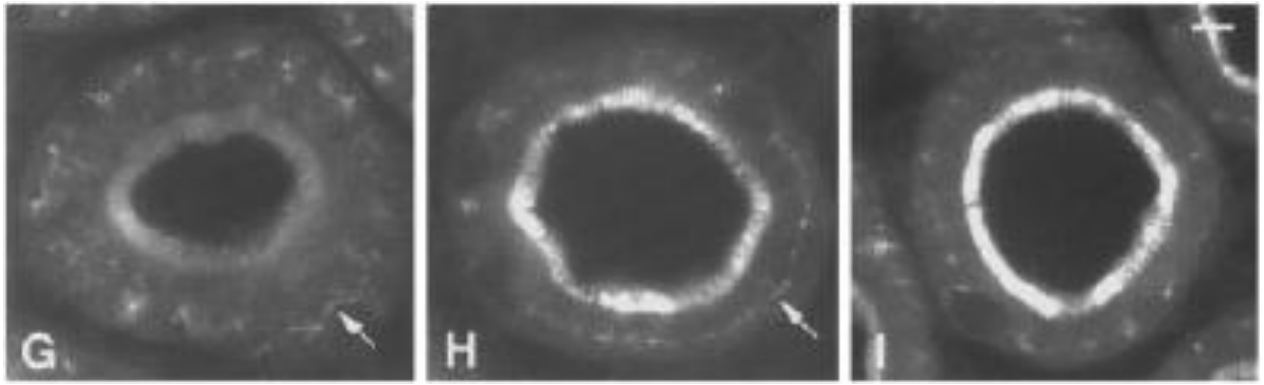
Murer, Physiol rev 2000

Apports alimentaires en Pi et expression de NaPi-2

8 jours
Supplémentation
en Pi

carence en Pi
2 heures

carence en Pi
4 heures



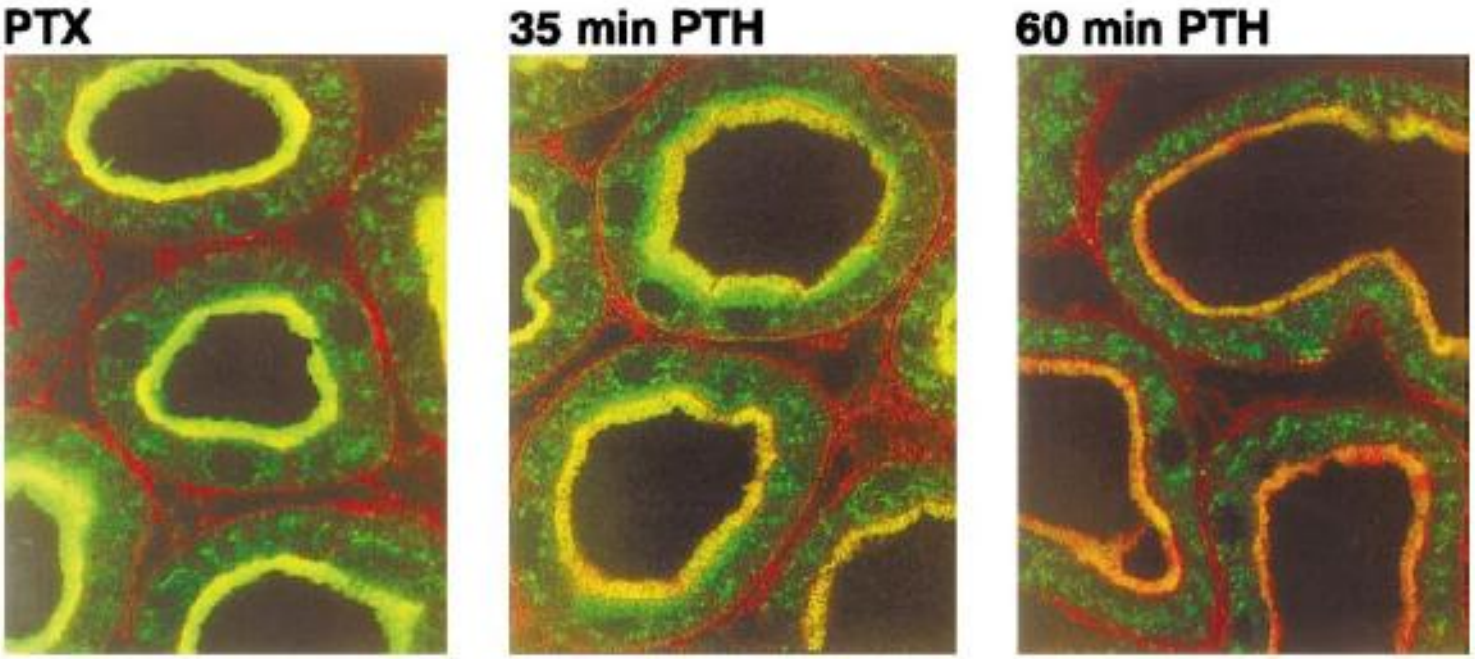
carence en Pi
4 heures

carence en Pi
2 heures

8 jours
Carence en Pi

Ritthaler, Kidney Int, 1999

Effet de la PTH sur l'expression membranaire de NaPi-2



100%

NaPi-2

0%

Kempson, AJP Renal 1995

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)

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

Variation du contenu intestinal en Pi ?

Variation du stock cellulaire en Pi ? → Variation des phosphatonines

Variation de la phosphatémie ?

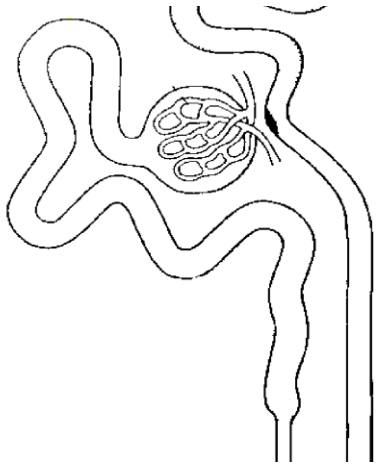
Interactions des phosphatonines entre elles ?

- FGF-23
- sFRP4
- MEPE
- FGF-7

↗ phosphatémie → ↗ PTH

↘ Réabsorption proximale
↗ Excrétion urinaire

Variation de la réabsorption proximale



Berndt, Annu Rev Physiol 2007

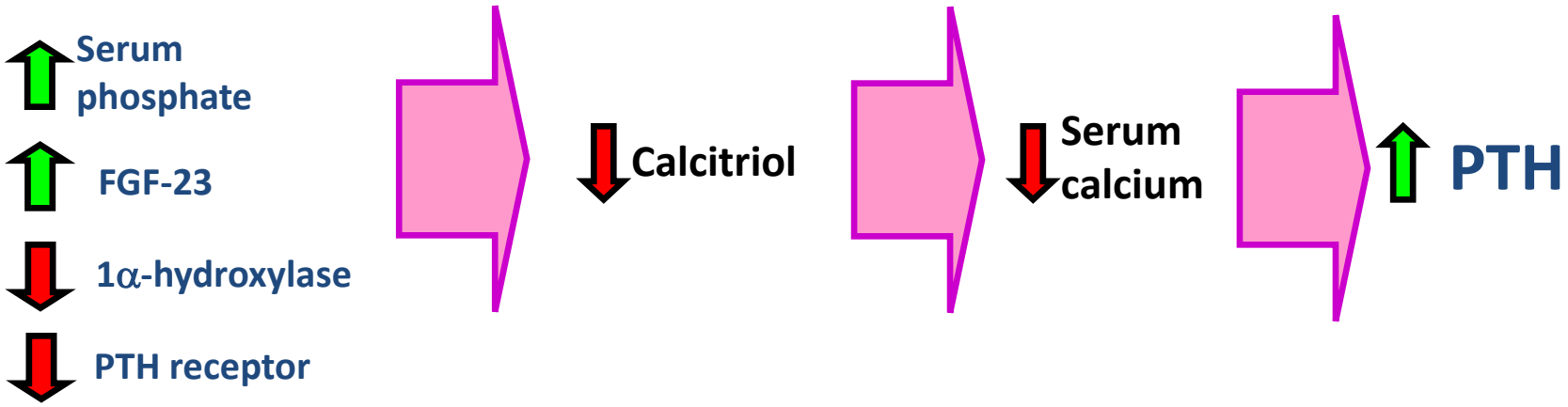
Phosphates, FGF-23

Vieillissement vasculaire

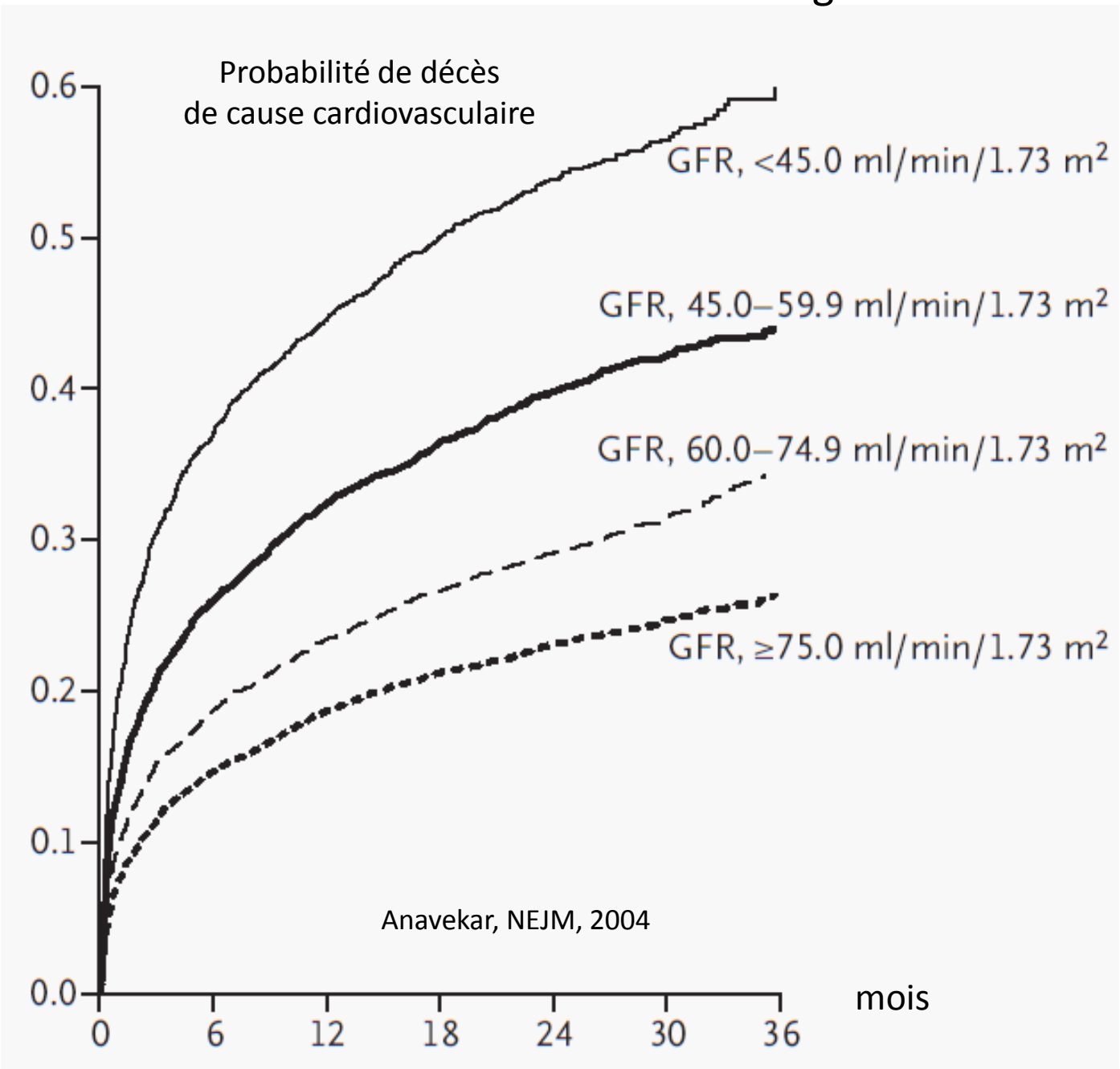
Maladie rénale chronique

Exemple de recherche avec des biomarqueurs

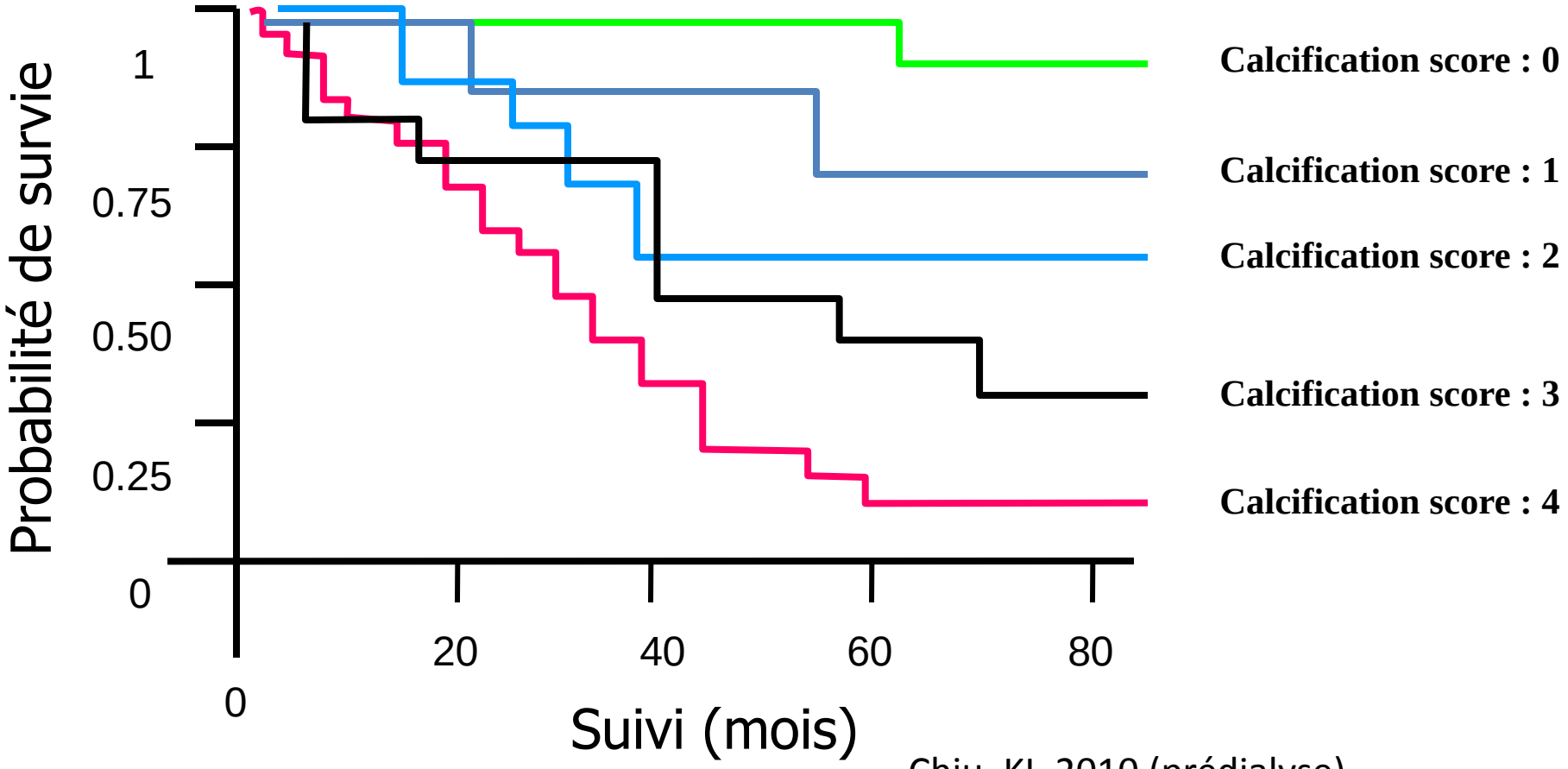
Pathophysiologie de l'hyperparathyroidie secondaire à la MRC



Mortalité cardiovasculaire selon le débit de filtration glomérulaire



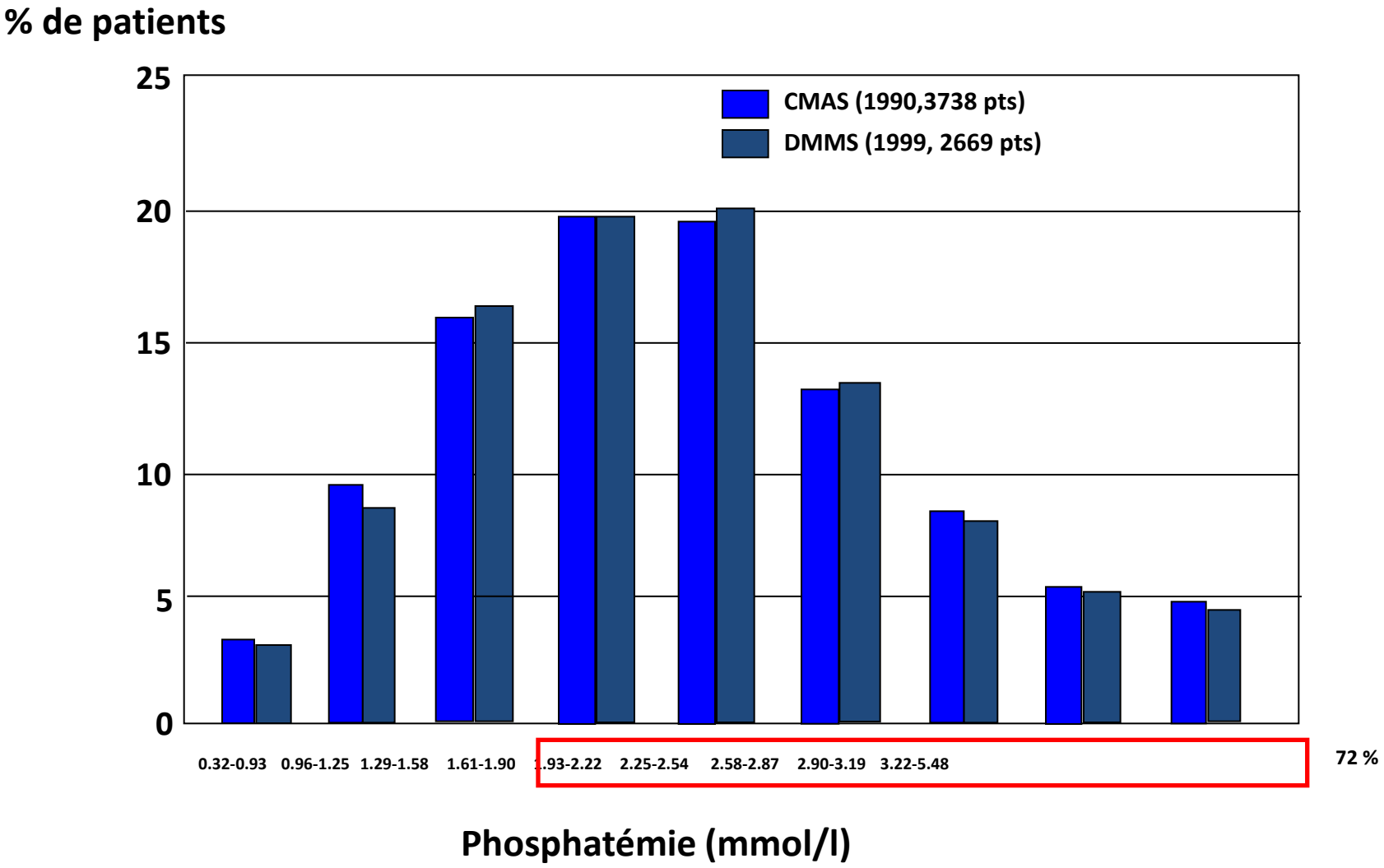
Probabilité de survie en fonction du score de calcification



Chiu, KI, 2010 (prédialyse)

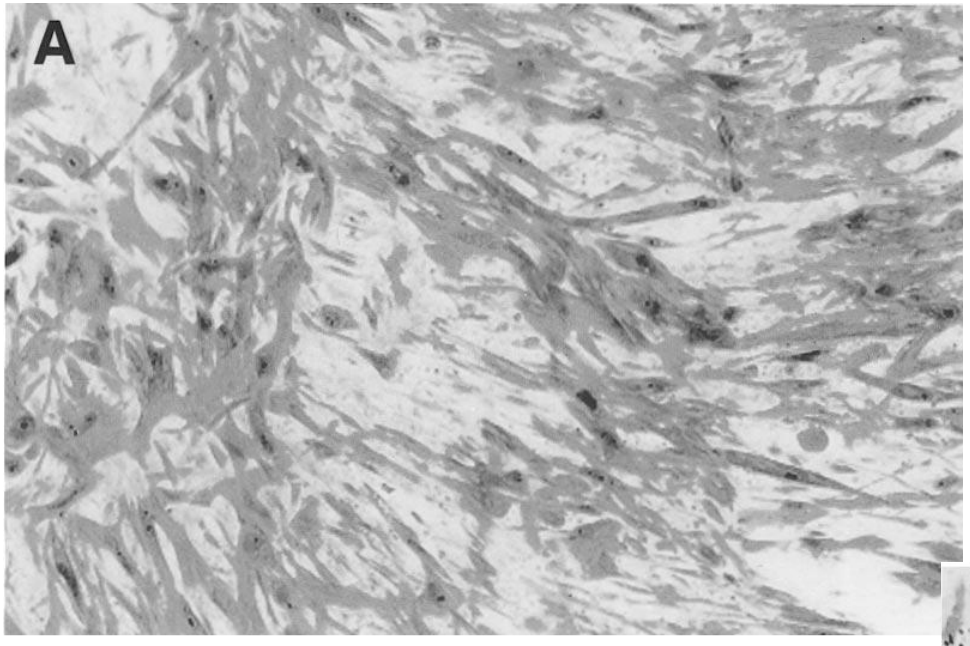
Un biomarqueur : la phosphatémie

Phosphatémie de patients dialysés



CMAS : Case Mix Adequacy Study. DMMS : Dialysis Morbidity Mortality Study

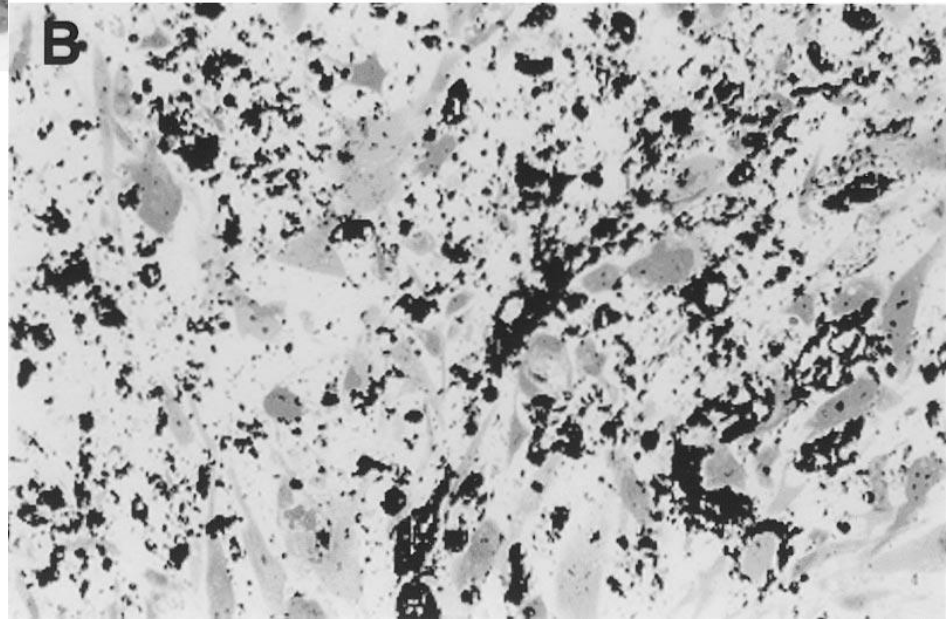
Les phosphates induisent une calcification in vitro



Coloration de Von Kossa à J10
Culture de cellules
musculaires lisses vasculaires
humaines

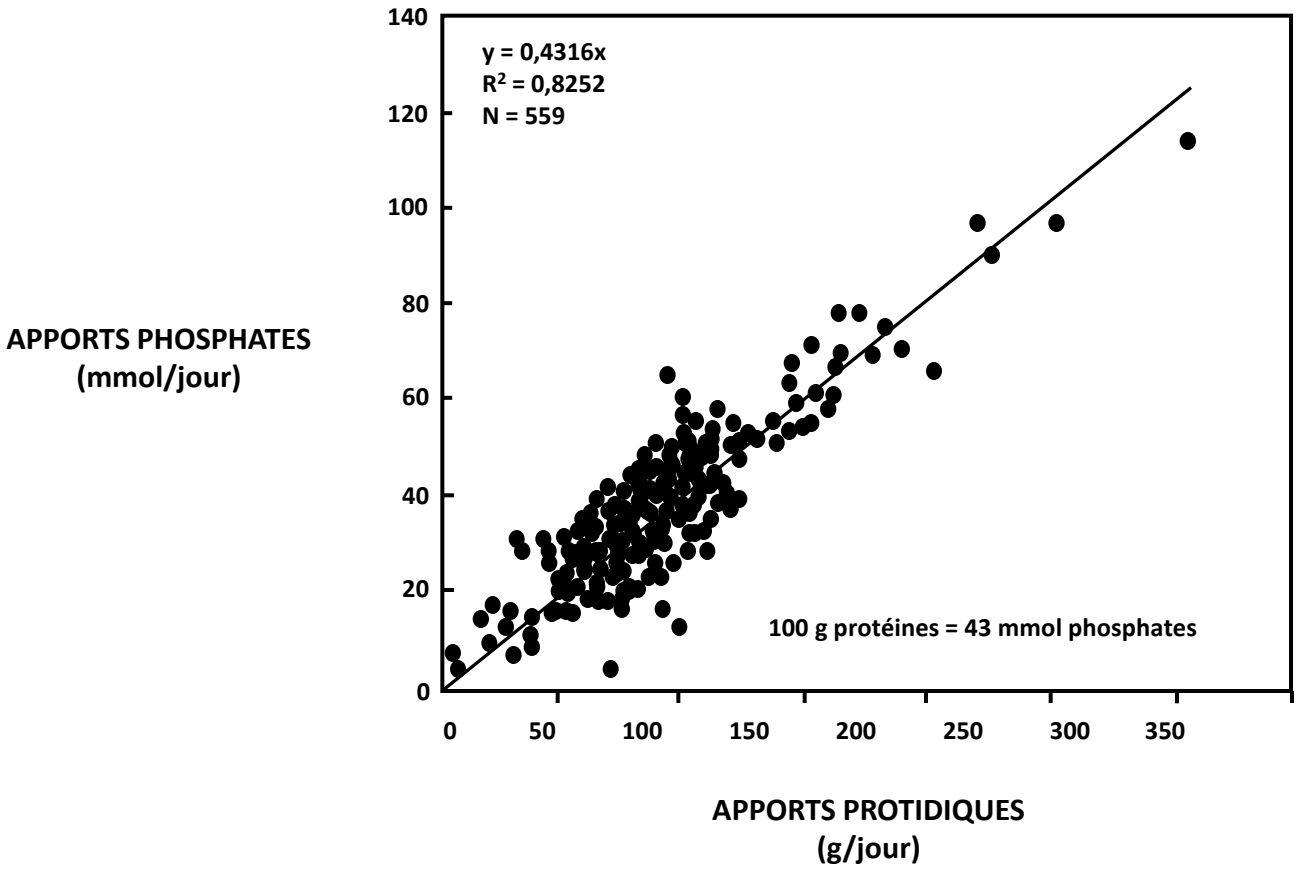
Pi = 1.4 mmol/l

Pi = 2.0 mmol/l



Jono, Circ Res, 2000

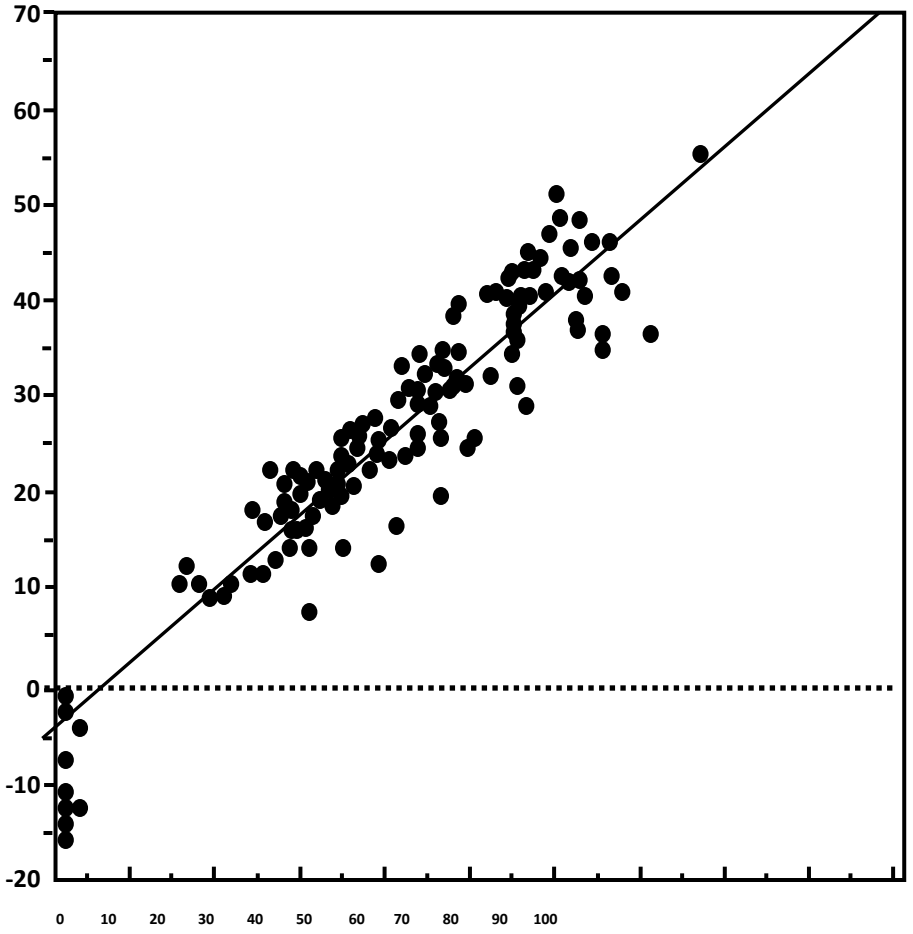
Apports Alimentaires et Phosphate



Rufino M., et al., Nephrol Dial Transplant 61:94, 1998

Absorption intestinale de phosphate

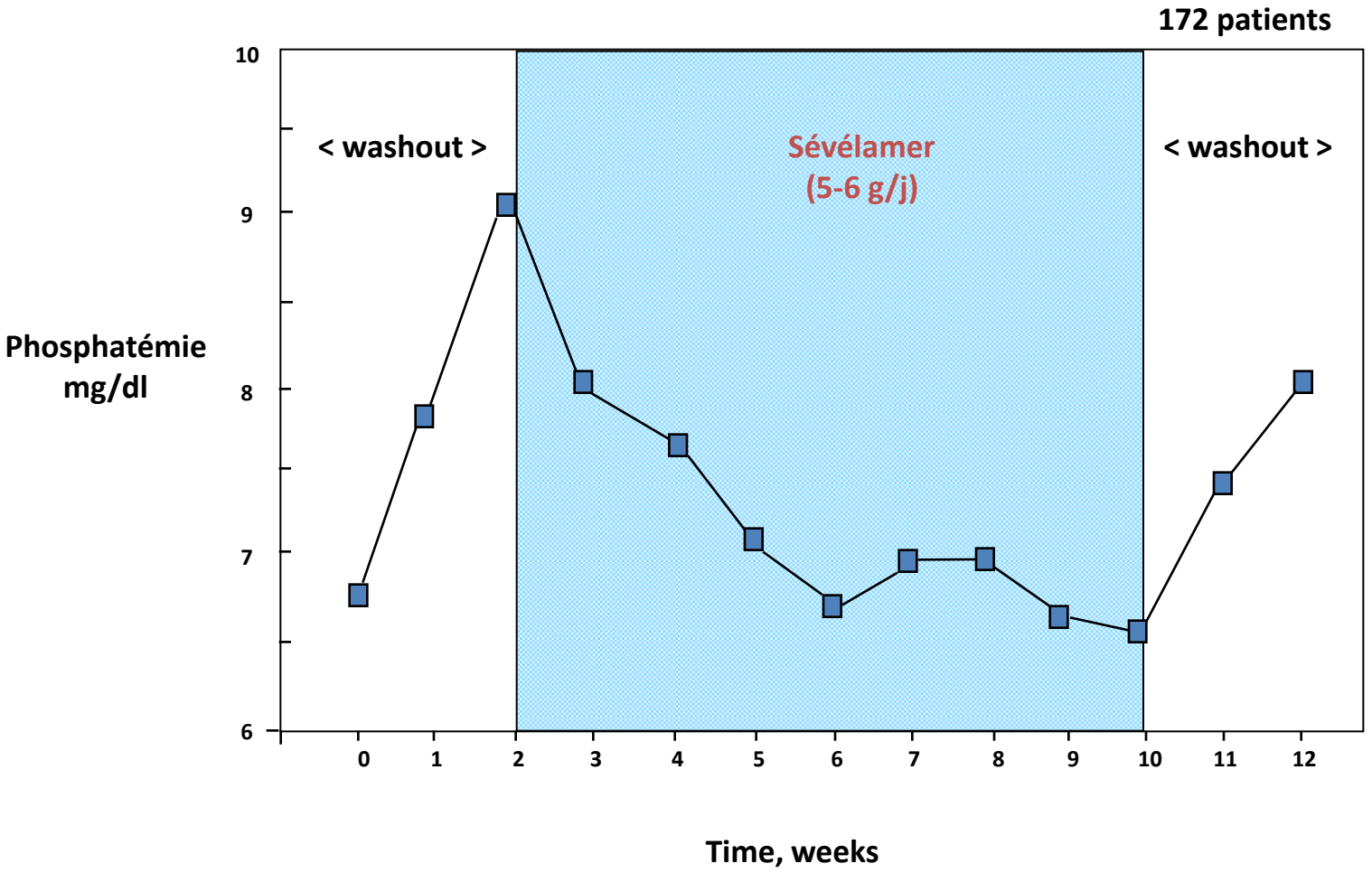
Absorption intestinale nette mmol/j



Apports alimentaires, mmol/j

Lemann J and Favus M, Primer JBMR 1999

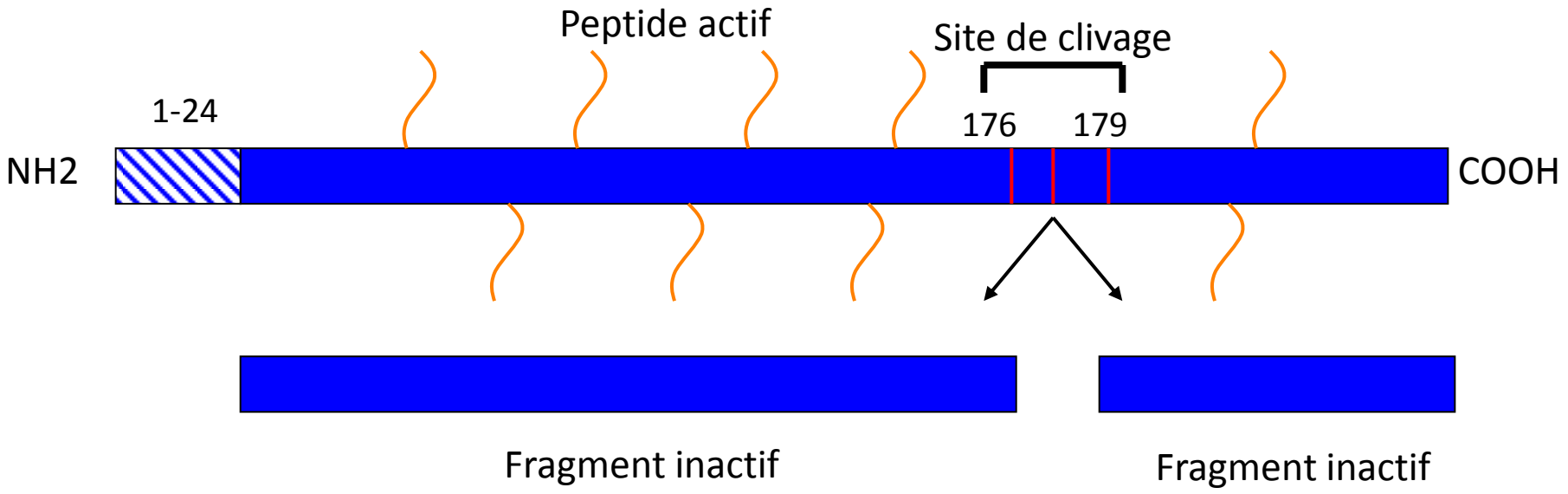
Chélateur intestinal du Phosphate



Slatopolsky E. et al. Kidney Int 55:299-307, 1999

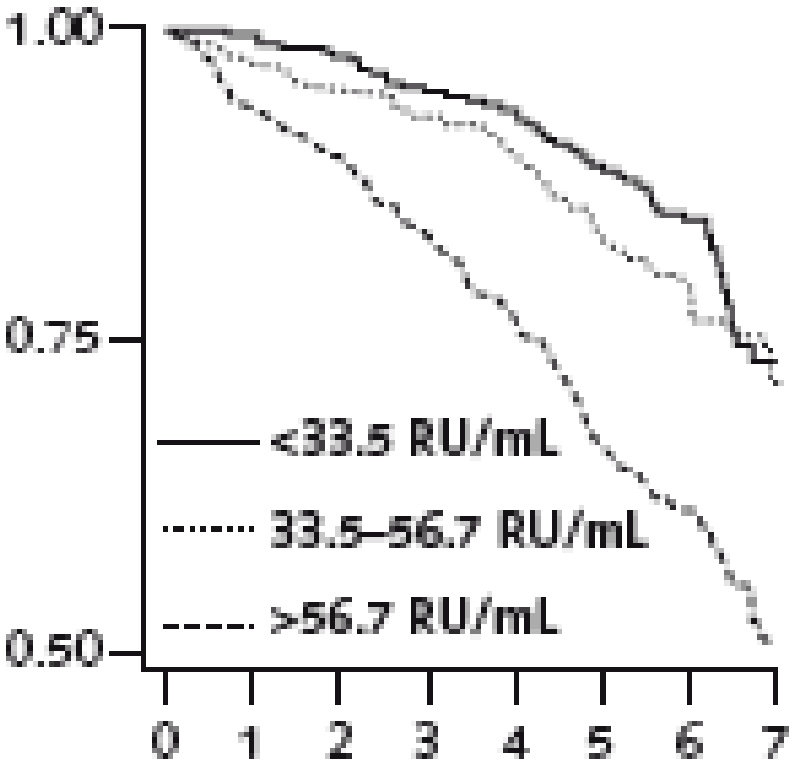
Un biomarqueur : Fibroblast Growth Factor 23

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

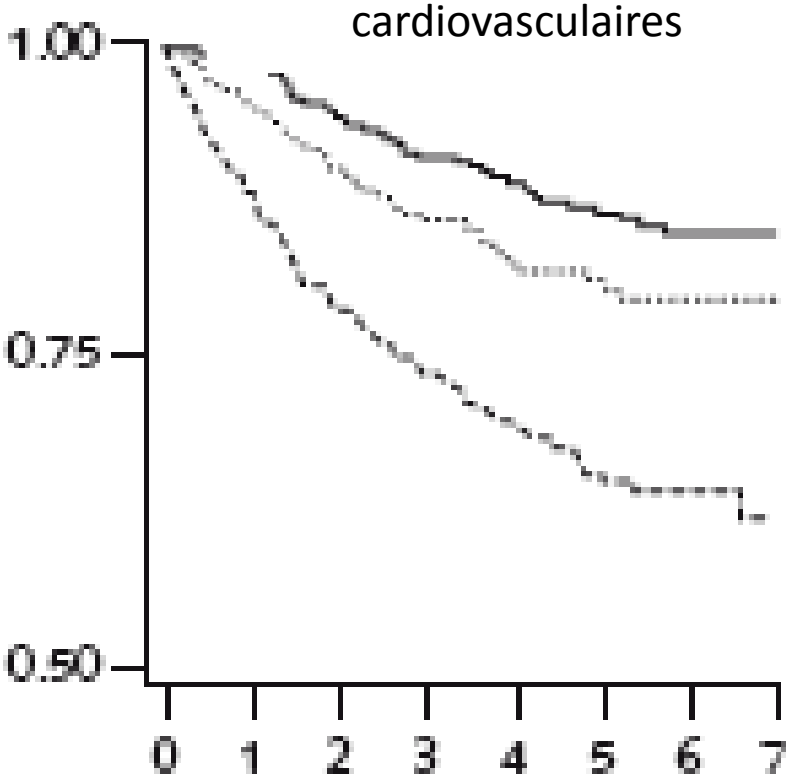


FGF23 mortalité et événements cardiovasculaires

Survie

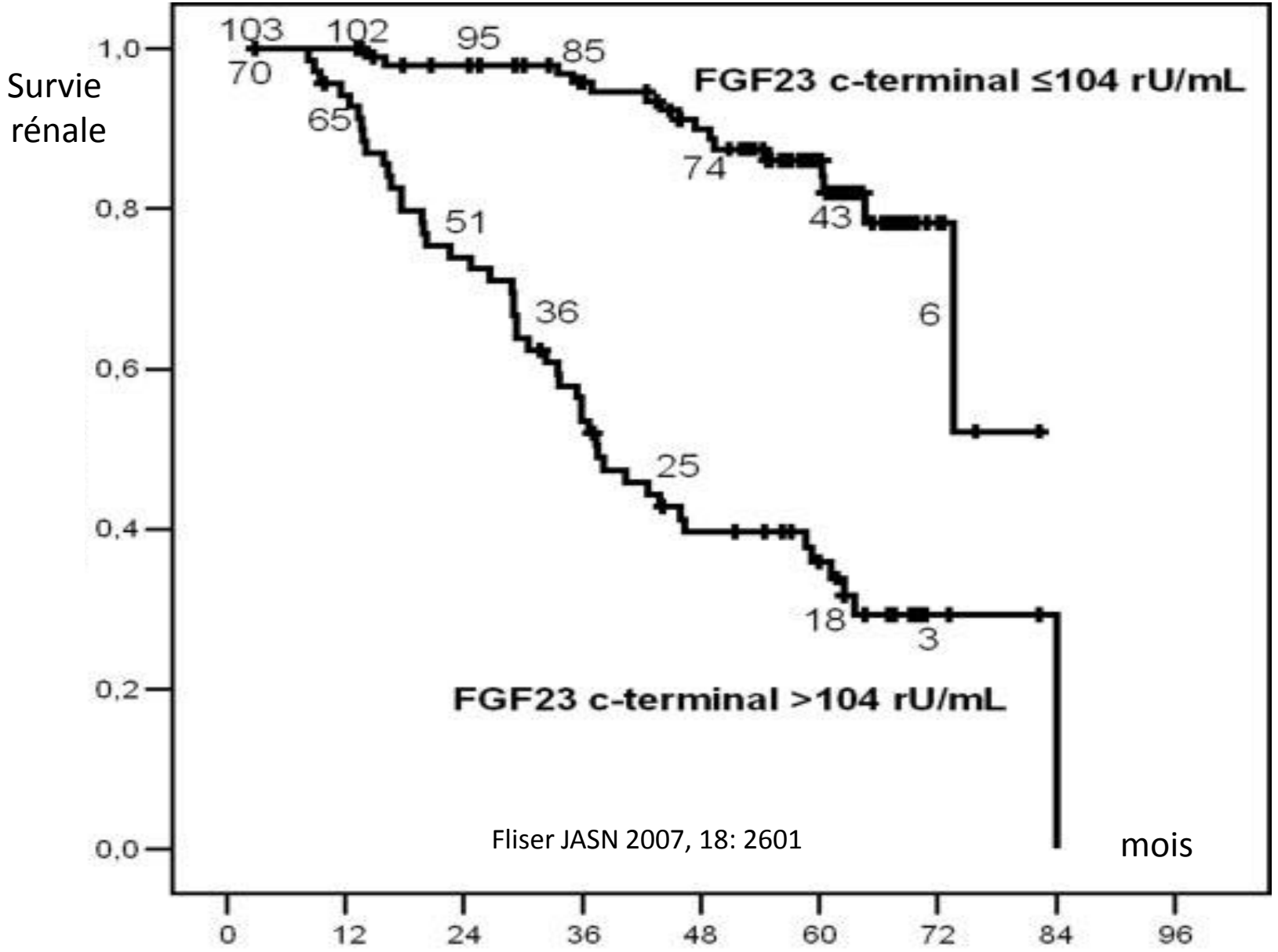


Absence d'événements cardiovasculaires



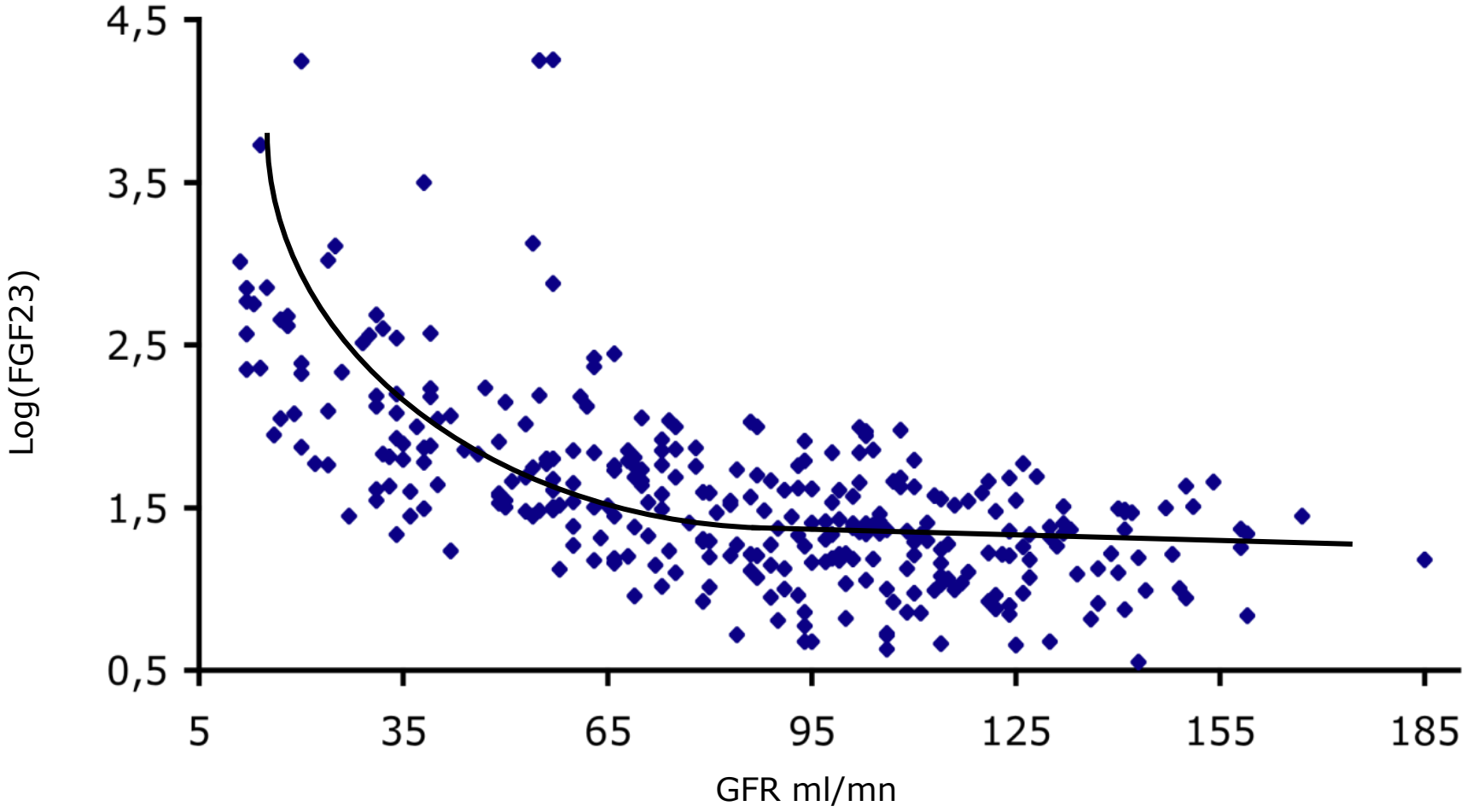
833 patients DFG normal ou peu altéré
Parker *Ann Intern Med. 2010;152:640*

FGF23 et survie rénale en cas de maladie rénale chronique



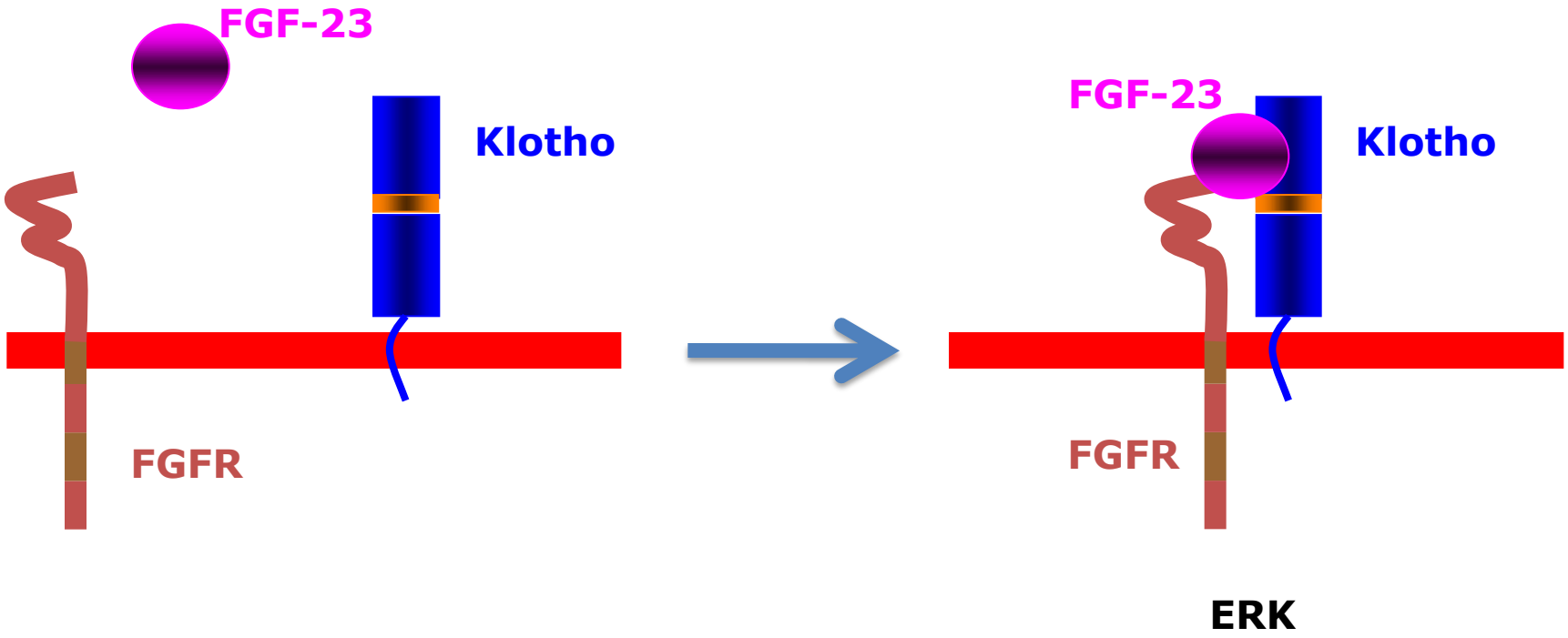
Fliser JASN 2007, 18: 2601

Concentration de FGF23
selon le degré de maladie rénale chronique



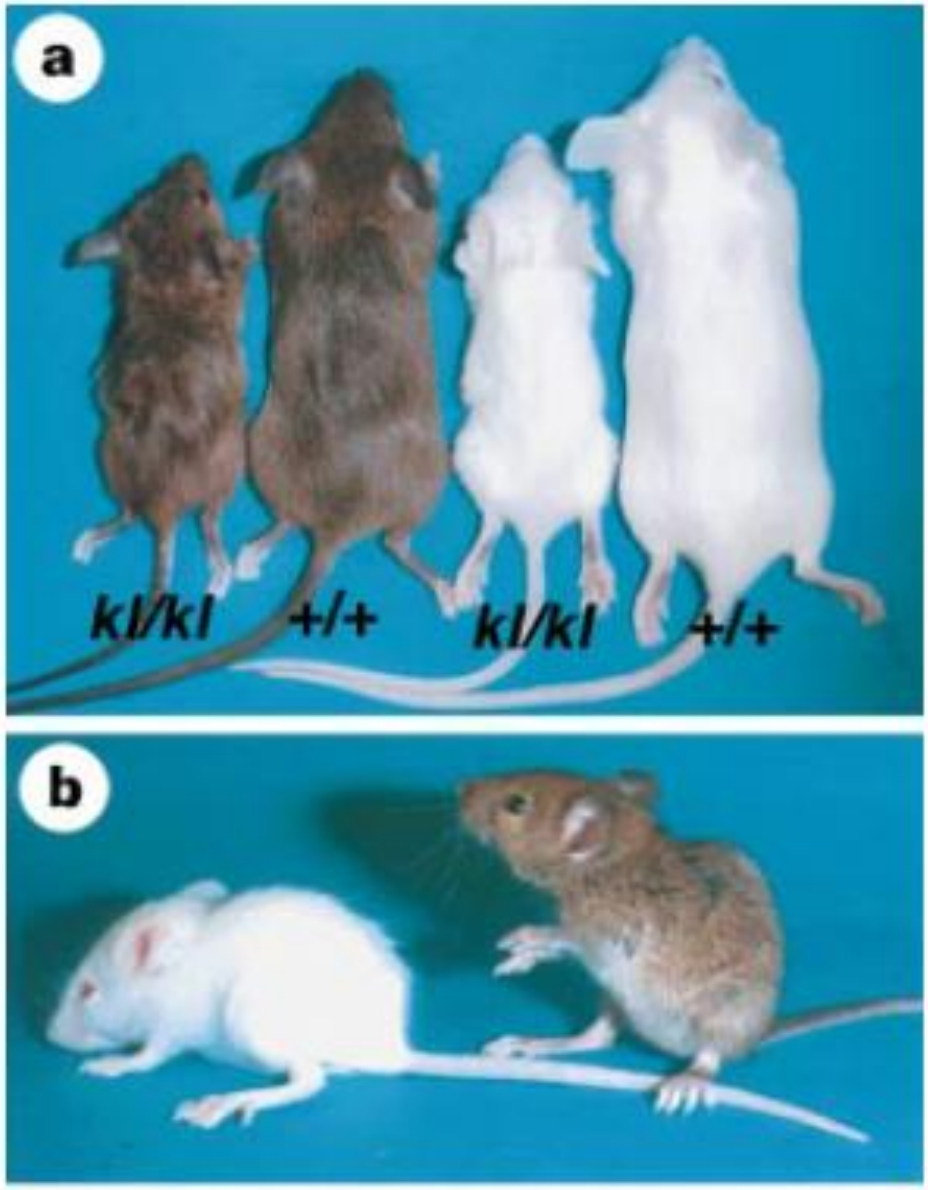
Prié Clin J Am Soc Nephrol 5: 2010; 1717

KLOTHO: CO-RECEPTEUR DU FGF23

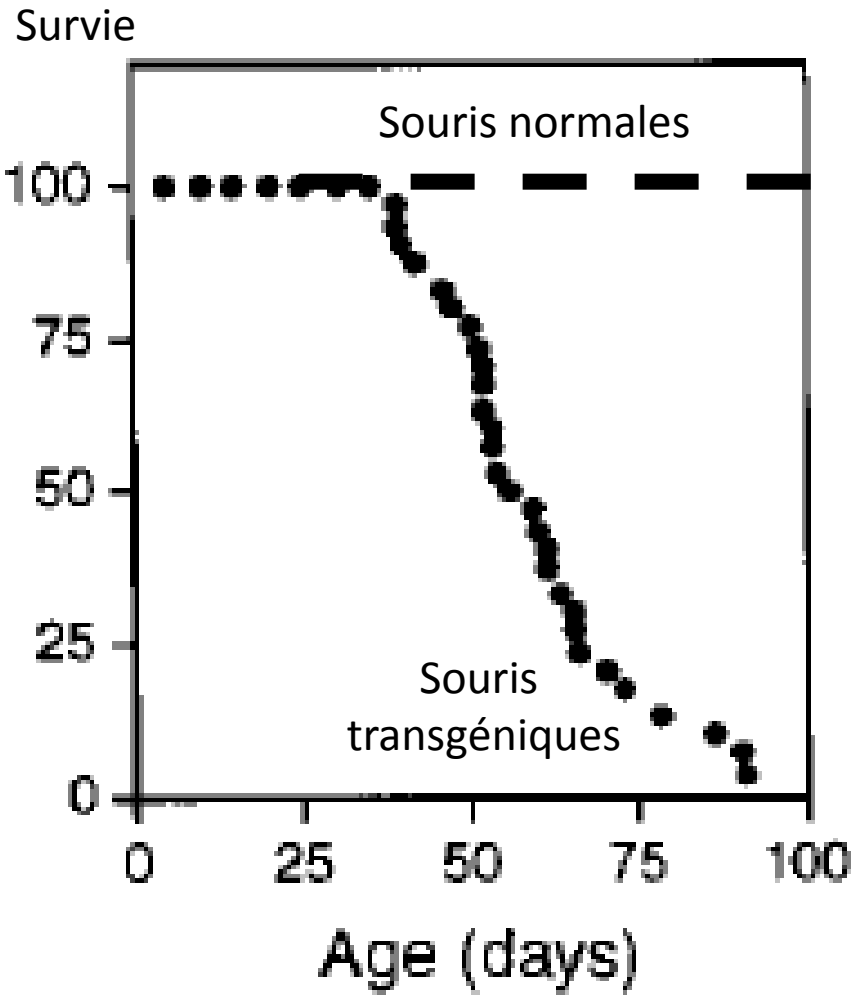


Présent dans:
tube distal, parathyroide, muscle,
pancreas, cerveau, hypophyse, gonades, duodenum

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



Makoto Kuro-o, Nature, 1997



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

↗ FGF23

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

↘ 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