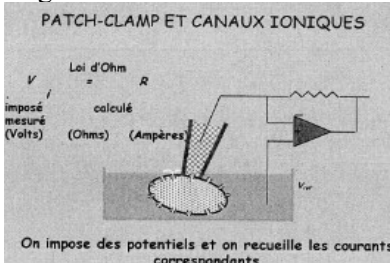


UE 10 : Métabolisme phosphocalcique (FAVRE G.)

I. LES APPROCHES METHODOLOGIQUES EN RECHERCHE

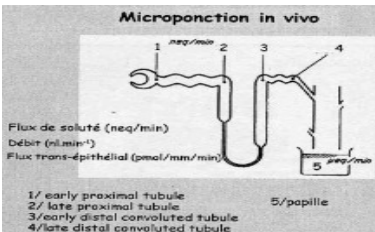
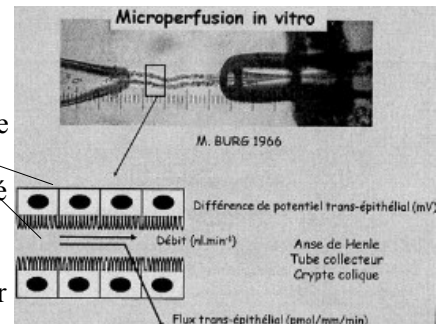
On va rappeler les différentes approches utilisées en physiologie et en recherche, et sur cette base, on fera une démarche pas à pas, afin de voir quelles expériences on peut mettre en œuvre, pour aboutir à une compréhension moléculaire d'une fuite rénale de Mg. Il existe plusieurs techniques permettant de faire un diagnostic moléculaire :



Ici est représentée le patch-clamp, il s'agit d'une technique permettant de caractériser la spécificité de canaux ioniques, et le fonctionnement de ces canaux, en terme de probabilité d'ouverture et d'expression membranaire. On clampe avec une pipette de verre une cellule, sur laquelle on suppose que les canaux sont exprimés, et on crée une ddp entre la pipette de verre (et donc la membrane plasmique) et l'extérieur, et on enregistre un courant à travers la cellule, et ce courant mesuré est le reflet du type de canal situé sous la pipette.

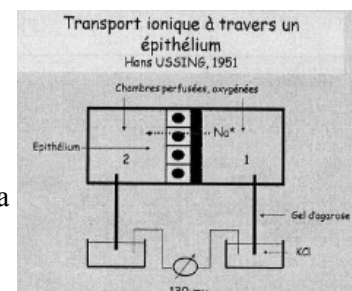
La micro-perfusion in vitro correspond à un montage équivalent, mais l'on étudie, non pas une cellule, mais un segment de tubule rénal ou d'épithélium colique situé entre 2 pipettes de verre que l'on voit sur le schéma. On peut enregistrer une ddp trans-épithéliale grâce à une mesure des potentiels électriques à ces deux points.

On peut imposer un potentiel et enregistrer un courant à potentiel clampé (exactement comme pour le patch-clamp) De plus à l'aide de pompes μmétriques, on peut perfuser le tubule avec un fluide à composition connue et à débit connu. Connaissant le fluide à l'entrée, on peut mesurer le transfert de fluides de l'intérieur vers l'extérieur du tubule.



Certains animaux, comme les rats WISTAR, ont la propriété de présenter à la surface du cortex rénal, l'ensemble des points (1/2/3/4) représentés sur ce schéma, qui sont des zones dans lesquelles on arrive à introduire des pipettes de verre. Ces dernières permettent de ponctionner ou d'injecter un fluide de composition connue. Par exemple, on peut injecter en 2 un fluide et le prélever au point 3, ce qui permet d'en déduire l'activité de transport entre 2 et 3. Ce montage correspond à la micro-ponction *in vivo*.

Enfin, il y a la chambre d'Ussing, grâce à laquelle on a la possibilité de connaître les propriétés de transports d'épithéliums qui ne sont pas en forme de cylindre (micro-perfusion impossible). L'immunohistochimie repose sur l'utilisation d'Ac spécifiques de protéines, exprimés ici sur les épithéliums, on marque l'Ac dirigé contre la protéine d'intérêt avec un fluorophore, on marque un autre Ac dirigé contre une autre protéine présente dans le même segment. La superposition des 2 images donne une couleur complémentaire. Voilà les techniques utilisées en recherche chez l'animal, chez l'Homme on ne peut les utiliser, et parfois chez l'animal, on doit recourir à des méthodes indirectes, ou épreuves fonctionnelles.



Le terme d'excrétion fractionnelle renvoie au % d'excrétion urinaire d'un soluté et donc d'un rapport des clairances. Pour rappel :

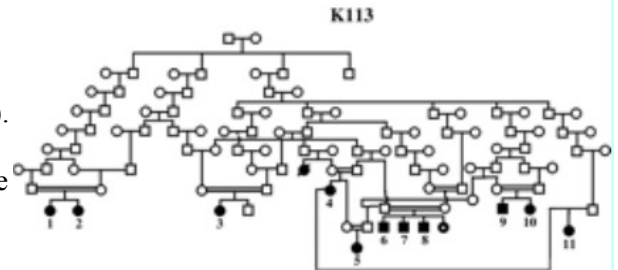
- la concentration plasmatique d'un soluté dépend de sa filtration glomérulaire mais aussi de sa réabsorption/sécrétion tubulaire
- la clairance glomérulaire correspond au débit de filtration des solutés au travers du glomérule
- les excrétions fractionnelles sont des rapports de clairance dans lesquels le débit n'intervient plus
- la fraction de réabsorption correspond à 1- Clairance

II. DEMARCHE ANALYTIQUE DEVANT UNE FUITE URINAIRE DE Mg

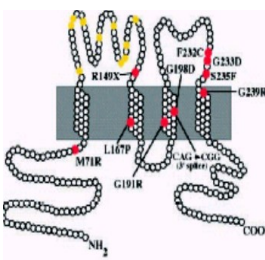
L'objectif de cette partie de cours est de déterminer comment connaître le fonctionnement d'une molécule par le comportement rénal pharmacologiquement modifié chez l'Homme.

Le Mg est une substance indispensable utilisée comme co-acteur, notamment des pompes, comme la Na/K-ATPase, de plus, il s'agit d'un cation intracellulaire, comme le K⁺ qui a un rôle dans la stabilité des potentiels de membrane.

Voici un arbre généalogique sur plusieurs générations, avec des mariages entre cousins, (l'union consanguine étant représentée par un double trait horizontal, les individus en noirs étant ceux qui sont porteurs la maladie). On peut voir que la maladie a une répartition plutôt horizontale, ce qui souligne son caractère récessif, appelée « l'hypomagnésémie et hypercalciurie avec néphrocalcinose précoce ».



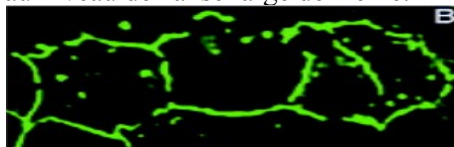
Cette pathologie est rare, mais elle permet de remonter jusqu'à la molécule impliquée (puisque cette maladie est monogénique) et en étudiant cette molécule, on va pouvoir prouver que la dysfonction de cette molécule va être responsable du phénotype pathologique.



La paracelline est une molécule constituée de 4 segments transmembranaires, 2 boucles extra-cellulaires, et 2 boucles N- et C-terminales intracellulaires. Les points rouges et jaunes représentent les mutations retrouvées dans les différentes familles, on voit que ces mutations sont très distribuées, il n'existe pas de « hot spot » permettant de corréliser la fonction à la mutation.

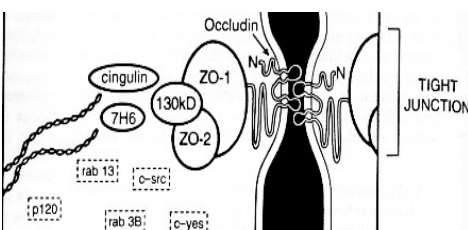
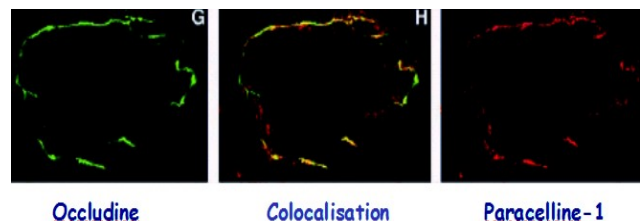
Lors de ces mutations, il existe une fuite urinaire de Mg, afin de mettre en évidence la localisation et le mécanisme d'action de la paracelline, il faut d'abord déterminer au niveau de quel(s) segment(s) est réabsorbé le Mg.

Ce schéma a été permis par les techniques de micro-ponction, les deux points sont les deux points entre lesquels la différence de concentration urinaire en Mg est la plus forte, le Mg étant réabsorbé essentiellement au niveau de l'anse large de Henlé.

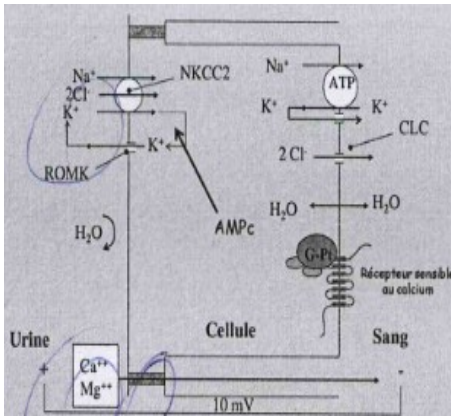


L'utilisation de technique d'immunohistochimie sur la paracelline donne ce genre d'image, permettant d'en déduire leur localisation membranaire.

Ici, on colocalise la paracelline (en rouge) avec l'occludine (protéine des *zonula occludens* en vert), les parties en orange sont celles où les deux protéines sont présentes. La paracelline est une molécule qui « colle avec » l'occludine, mais on ne sait pas si la fonction de la paracelline est liée aux *zonula occludens*.



Ce schéma montre la complexité moléculaire des jonctions serrées qui sont situées à la partie apicale de l'épithélium, permettant l'étanchéité entre les deux pôles. Dans le néphron, tous les segments ne sont pas étanches, le TCP est très peu étanche et laisse passer les différentes substances à travers et entre les cellules. Ici, on retrouve le cytosquelette, l'occludine, les protéines de la *zonula occludens* de type 1, la paracelline est située dans ce complexe moléculaire.



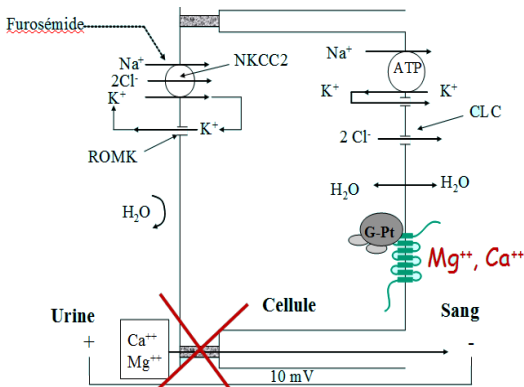
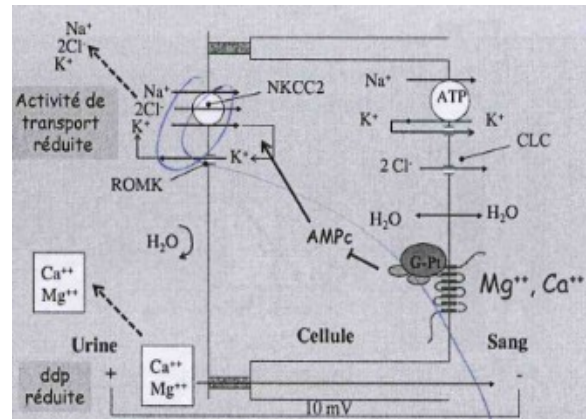
La cellule de la anse large de Henlé se présente ainsi, et on sait comment le Mg est réabsorbé. De plus, on sait qu'elle est capable de transporter de l'urine vers le sang, du Na et du Cl, via le co-transporteur Na, 2Cl, K (NKCC2) qui va être mis en action par la Na/K-ATPase au pôle sanguin, ce qui va créer un gradient chimique favorable à l'entrée de Na de l'urine vers la cellule.

Cette entrée étant asservie à l'entrée de K et de Cl, le K sera recyclé, ce qui fait qu'on a un transport net de Na et Cl avec la présence d'un canal chlore au pôle basal (CLC).

Le calcium passe par voie paracellulaire, donc au niveau des jonctions serrées le passage des solutés est régulé. La paracelline est un élément permettant la régulation du passage paracellulaire de Ca et Mg.

Le transport par NKCC2 est électrogénique car il y a transport net d'une charge + pour 2 charges -, la balance électrique sera « électroposivée » au niveau du pôle urinaire, la charge + va repousser les cations (Ca, Mg) qui vont passer au travers des jonctions serrées dans le sens du gradient électrique.

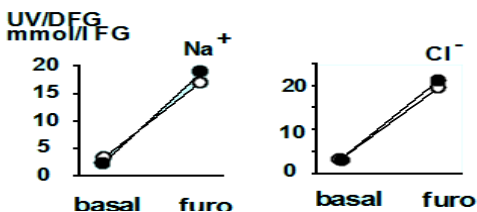
On sait que l'un des éléments activant NKCC2 est l'AMPc, on connaît un système qui est un récepteur sensible au Ca/Mg qui va diminuer la concentration en AMPc et donc la capacité de transport de NKCC2, il va dépolariser l'épithélium et favoriser la fuite urinaire de Ca et Mg.



On sait que les diurétiques de l'anse (furosémide et bumétanide) sont capables d'inhiber pharmacologiquement NKCC2 et de dépolariser la membrane avec fuite urinaire de Mg et Ca. Ainsi, on dispose de tous éléments pour mettre en évidence le rôle de la mutation de la paracelline dans la fuite urinaire de Mg. Comment explorer cette fuite urinaire de Mg ? On peut donner du furosémide ou du chlorure de Mg ou du chlorure de calcium pour agir sur le récepteur baso-latéral.

En administrant du furosémide à des sujets sains, on observe une augmentation de la magnésurie et de la calciurie, alors que l'on n'observe pas de modification de la magnésurie et de la calciurie lorsque que l'on en donne aux sujets malades.

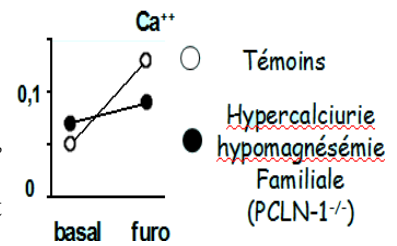
En effet, le furosémide ne modifie pas la fuite urinaire de Mg/Ca, mais la dépolarisation de la cellule induite par le furosémide va quand même entrainer une réponse natriurétique. La natriurèse pourra être évaluée par l'excrétion fractionnelle de Na, idem pour la chluriurie.



Tout cela est représenté sur le schéma ci-contre, qui met également en évidence le fait que dans la branche large de la anse de Henlé, le transport de Na fonctionne et la polarisation cellulaire existe, puisque le furosémide entraine une dépolarisation de la cellule avec fuite urinaire de NaCl de manière comparable chez les sujets sains ou malades.

Ce graphique souligne donc l'existence d'un gradient électrique entre l'urine et le sang chez les patients.

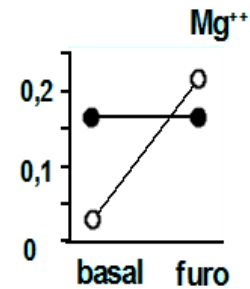
On va mesurer le Ca et le Mg urinaire, on obtient le même type de graphique avec le rapport C° Urinaire/ C° Plasmatique du Ca et du Mg sur le rapport C° Urinaire/ C° Plasmatique de la créatinine. Avant l'injection de furosémide, on ne voit pas de grande différence de calciurie entre les patients, après injection de furosémide, on voit que chez les sujets malades, la calciurie n'est pas modifiée, alors qu'elle est augmentée chez les sujets sains.



Chez les sujets malades, la magnésiumurie est plus élevée et n'est pas modifiée par le furosémide, alors qu'elle est multipliée par 4 chez les sujets sains.

Ainsi, par une exploration fonctionnelle, on a pu mettre en évidence qu'une mutation de la paracelline explique le phénotype observé chez les malades.

Prouver le caractère pathogène d'une mutation est difficile, il existe de nombreux modèles d'animaux chez lesquels on fait un K.O. D'un transporteur muté pour étudier l'effet de cette mutation chez cet animal, le plus souvent une souris, et qui se comporte de manière très différente d'un Homme, il est ainsi difficile d'avoir la certitude du caractère pathogène d'une mutation.



Le récepteur sensible au Mg est situé sur la face basolatérale de la cellule rénale et on peut le stimuler par perfusion de Mg/Ca, ce qui va entraîner une inhibition de l'action de l'AMPc, qui favorise le transport via NKCC2, et va dépolariser la cellule. En perfusant du Mg, on va mesurer l'excrétion de Na, Mg et Ca, il est important de mesurer l'excrétion fractionnelle de ces différents ions pour ne pas avoir à mesurer le débit urinaire (et donc le recueil des urines sur 24h) mais aussi car toute fonction tubulaire dépend de la filtration du soluté dont on veut connaître le type de transport (si l'on est face à quelqu'un qui filtre plus ou moins, il est important de le savoir) donc est intégré dans l'excrétion fractionnelle le terme « rapport urinaire/plasmatique de créatinine » et donc de filtration glomérulaire.

En perfusant du Mg, on va réduire l'activité de transport, et on va dépolariser la cellule, on va faire fuir chez le sujet sain beaucoup plus de Mg/Ca/NaCl. Chez le sujet témoin, comme le Ca et le Na urinaires sont modifiés, on a calculé le rapport excrétion fractionnelle du Ca et du Na, en blanc on a les sujets non-perfusés, en noir, les sujets perfusés, on voit une augmentation de la fuite urinaire de Ca/Na. Chez les sujets malades, on observe l'absence d'effet. La stimulation du récepteur sensible au Mg chez le sujet malade aboutit bien à une dépolarisation de la cellule, mais qui n'a pas d'effet sur la magnésiumurie/calciurie.

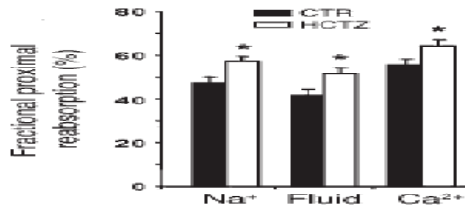
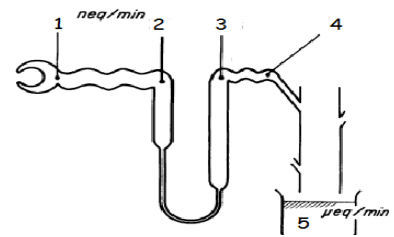
Le syndrome de Gitelman consiste en une mutation inactivatrice de NCC et dans laquelle on retrouve une hypocalciurie, pour l'étudier on va étudier une zone qui transporte peu en quantité mais qui va être intéressante dans le maintien d'un équilibre (TCD) ou une zone qui transporte beaucoup (TCP)

De plus, dans ce syndrome on note également une baisse du volume extra-cellulaire, ce qui entraîne une activation du SRAA, avec rétention hydrosodée, or le segment le plus efficace pour retenir du sel et de l'eau est le TCP.

	Activité rénine (ng/l)	Aldostérone plasmatique (pg/ml)	Hématocrite(%)	Natriurèse (mmol/J)	$(Ca)_u/[creat]_u$ (mmol/mmol)
Patients (n=8)	76 ± 19	188 ± 59	43.1 ± 1.3	208 ± 15	0.15 ± 0.03
Controls (n=13)	6 ± 1	57 ± 6	37.0 ± 0.4	126 ± 17	0.33 ± 0.04

Chez ces patients, on note une augmentation de l'hématocrite, de la concentration plasmatique de rénine et d'aldostérone, ils sont donc en permanence en contraction volémique (Ht élevé) avec une activation permanente du SRAA avec une augmentation de la réabsorption proximale, de plus la calciurie (exprimée en rapport Ca/créatinine) est moitié moindre que chez les témoins.

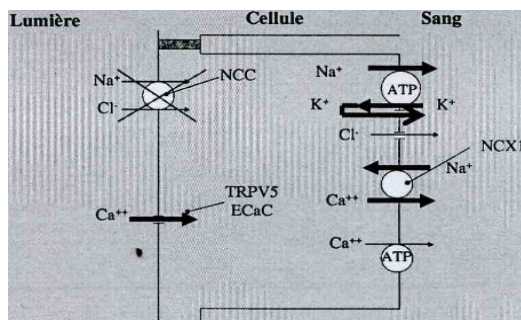
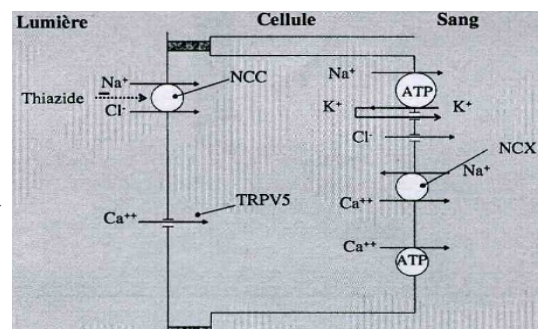
Il se trouve que l'hydrochlorothiazide, inhibiteur pharmacologique de NCC (muté dans le syndrome de Gitelman) mime un syndrome de Gitelman. La manière de mettre en évidence l'augmentation de réabsorption proximale, a été d'utiliser la micro-ponction in vivo entre 1 et 2, on a prélevé le fluide en 1 et en 2, et on a mesuré la concentration de Na, de Ca et le volume de fluide.



Après administration d'HCTZ on mesure une pompe plus de Na/Ca et d'eau en 1 qu'en 2. Sur ce graphique, est représenté le % de réabsorption proximale du Na, du Ca, et de fluide. On observe que la réabsorption proximale est augmentée sous HCTZ.

On va se pencher sur le TCD, où est exprimé le canal NCC, qui est muté dans le syndrome de Gitelman.

On s'est intéressé à ce segment car dans celui-ci, lorsque l'on empêche le Na de rentrer au niveau apical (par blocage de NCC) la pompe Na/K-ATPase va continuer de travailler mais sans avoir la possibilité de transporter du Na, à la place, elle va drainer du Ca, car il existe un échangeur Na/Ca (NCX) qui va en faire rentrer dans la cellule le sodium relargué dans le milieu interstitiel par la Na/K-ATPase.

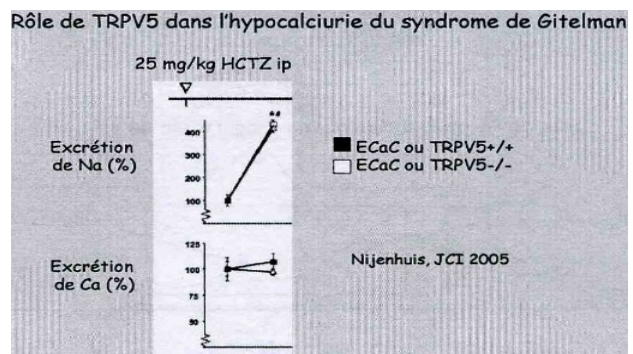


Le schéma ne va pas être celui de la réabsorption transépithéliale de Na, mais celui de la circulation sanguine-cellulaire de Na, car le blocage au niveau de NCC va entraine un flux de calcium via le canal ECaC.

Jusqu'en 2005 il était admis que l'hypocalciurie se basait sur ce modèle. Comme a-t-on pu invalider cette hypothèse ?

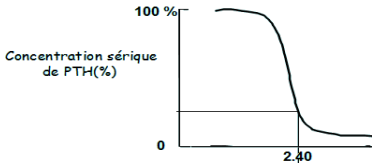
On peut bloquer TRPV5 pharmacologiquement, mais une telle molécule n'existe pas, donc on utilise une souris TRPV5 KO. À cette souris TRPV5KO on donne de l'HCTZ pour mimer un syndrome de Gitelman, on mesure l'excrétion fractionnelle de Na et de Ca.

On remarque que la réponse natriurétique à l'HCTZ est parfaite, mais la réponse est nulle pour la calciurie, ce qui infirme le modèle présenté précédemment



II. RÔLE DU RECEPTEUR SENSIBLE AU Ca ET AU Mg DANS LES EPITHELIUMS RENAUX ET COLIQUES

La calcémie est maintenue constante grâce à l'interaction de différents organes : l'absorption intestinale de Ca, l'excrétion ou la rétention par le rein, le stockage ou le relargage osseux sous la dépendance de la PTH. La PTH a trois effets majeurs : elle stimule le relargage osseux et la rétention rénale de Ca et régule la synthèse de calcitriol.



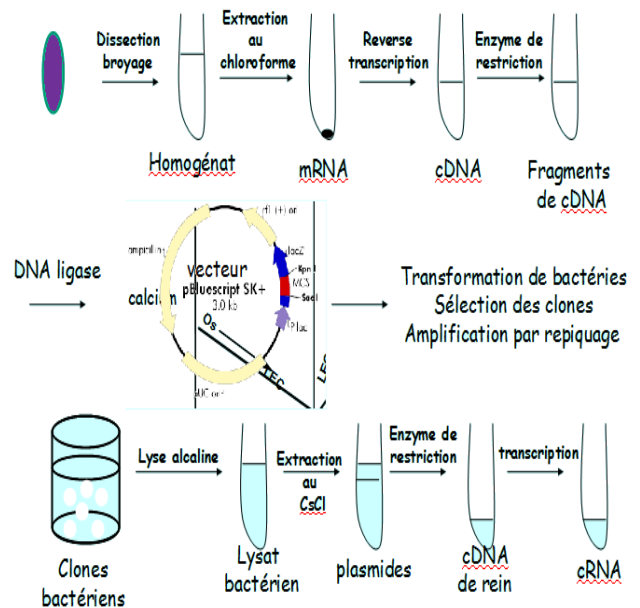
Elle est sécrétée en fonction de la calcémie, l'allure de la courbe représentant la [PTH] sérique en % en fonction de la [Ca] est sigmoïde, on voit que la valeur de calcémie normale (2,4) est située sur la partie la plus abrupte de la courbe, montrant que de très faibles variations de la calcémie vont avoir des effets importants sur la sécrétion de PTH.

A. Démarche analytique : Criblage de banque d'ADN

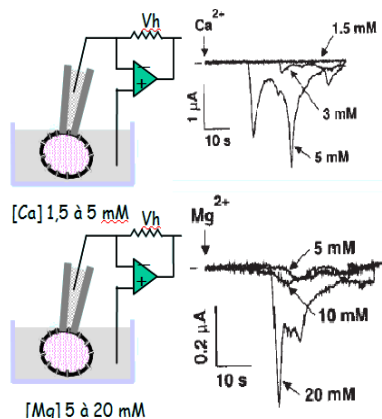
Une banque d'ADN correspond à l'ensemble des ADNc, (c'est à dire des ARNm transformés en ADN, et donc des gènes exprimés dans une cellule), qui sont clonés dans des vecteurs (plasmides, levures, bactéries) permettant de rendre accessible des fragments de génome d'un tissu pour des analyses fonctionnelles.

Ici on veut identifier une molécule dont on suppose la présence dans un tissu (en l'occurrence des parathyroïdes sur l'argument que la PTH est sécrétée par les parathyroïdes).

Ainsi, l'idée est de prélever des parathyroïdes, de les broyer, d'en extraire l'ARN (en récupérant le surnageant après ajout de chloroforme), et de le rétro-transcrire en ADNc, de le sectionner par des enzymes de restriction et de les insérer chez des vecteurs, on utilise des techniques de clonage (qui repose sur la transfection de bactéries par des vecteurs et qui vont contenir les différentes séquences d'ADN) chaque clone ayant une séquence d'ADNc, enfin, on sélectionne.



Une fois les clones obtenus, on a la possibilité d'amplifier l'ADNc, qu'on pourra extraire et séquencer, qu'on pourra transférer à des vecteurs pour mesurer l'effet de la protéine codée par ce segment d'ADN. On va effectuer de l'expression hétérologue, pour mesurer en patch-clamp, ce que fait le récepteur sensible au Ca. On utilise des parathyroïdes de bœuf, celles-ci étant plus volumineuses, et on organise une banque d'ADN de bœuf. On peut ainsi se demander comment la PTH est sécrétée en fonction de la calcémie, et si il existe un récepteur sensible au Ca situé sur les parathyroïdes.



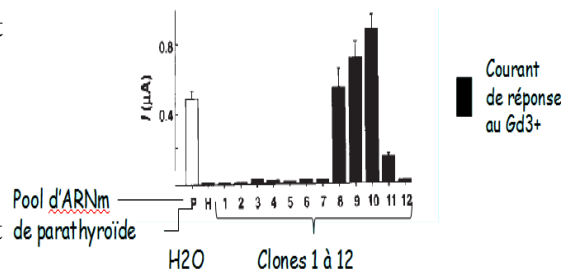
On voit ici un enregistrement électrique en patch-clamp sur une cellule transfectée par un clone, et on teste l'effet d'une [C] variable de Ca (1,5 à 5 mM) et de Mg (5 à 20 mM) sur un courant qui dépend de la [C] en Ca dans le bain.

On suppose qu'à la surface de l'œuf, il existe des transporteurs, et que le récepteur sensible au Ca va modifier leur activité, on remarque que lorsque l'on modifie la concentration locale en Ca ou en Mg, on fait varier l'intensité du courant.

Mais il n'y a pas de transport de Ca ou de Mg, les solutés dans la pipette ne contiennent pas de Ca, Mg, donc il y a un transport d'autres substances. On mesure un courant qui dépend de l'action du Ca et du Mg dans le bain. De plus, on peut affirmer que le récepteur sensible au Ca est également sensible au Mg, donc le récepteur cloné est un récepteur aux cations divalents

Une fois le clonage obtenu, on sélectionne un pool de clones, ici numérotés de 1 à 12, et on veut savoir, si il y a un courant de réponse de la cellule pour un clone particulier. On va mesurer l'intensité du courant, en fonction du clone, dans des conditions expérimentales définies précédemment ([C] variables en Ca/Mg).

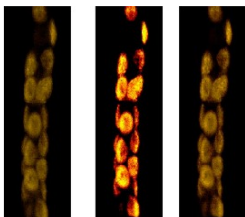
Ici, on a utilisé du Gd, car on savait à l'avance que cela fonctionnerait, on peut donc identifier 3 clones qui répondent de manière intéressante, c'est donc dans ces clones que se trouve l'ADNc qui nous intéresse.



Par recoupement, on arrive à savoir quelle est la séquence d'ADN qui code pour un récepteur, et on peut séquencer ce récepteur, puis l'exprimer sous forme protéique. Ce gène code pour une protéine à 7 segments transmembranaires, et une longue boucle extra-cellulaire et une courte boucle intracellulaire. Sur la parathyroïde, l'hypocalcémie active le récepteur, qui est couplé à une protéine G, ce qui va déclencher l'induction de la transcription du gène codant pour la PTH.

B. Le récepteur sensible au Ca:

Une fois que l'on a cloné et séquencé ce récepteur, on peut aller le chercher dans d'autres tissus, on extrait différents tissus chez un animal, et par hybridation de séquence d'ARN, on va chercher quels tissus contiennent la séquence d'ARN et donc la protéine. On a constaté que l'on retrouvait ce récepteur dans les épithéliums, on s'est demandé à quoi pouvait servir ce récepteur au Ca/Mg dans les épithéliums.



Ce RCPG présent dans les cellules épithéliales rénal et digestif, et a comme 2nd messenger probable le Ca.

Pour prouver, que ce RCPG était fonctionnel, on a utilisé une sonde permettant d'enregistrer des modifications fugaces du Ca intracellulaire. On a une image de l'épithélium intestinal non stimulé, puis on stimule le récepteur à l'aide de Ca, ce qui va entraîner une stimulation du RCPG qui va activer la PLC et libérer les pools de Ca dans le RE, qu'on pourra voir grâce à la sonde, puis il y a retour à un état basal.

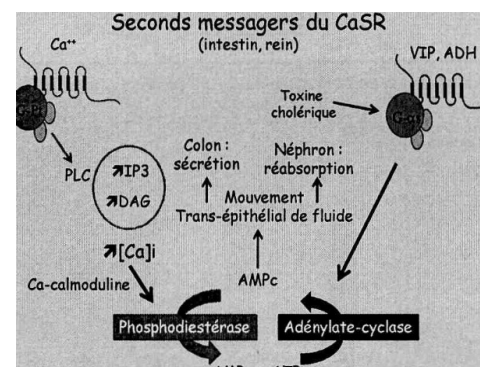
Dans la branche large de Henlé, ce récepteur est présent et est stimuable, on mesure la réponse en micro-perfusion, en utilisant des [Ca] croissantes, et on voit que la production d'IP3 et la concentration intracellulaire de Ca augmentent avec la concentration en calcium du bain.

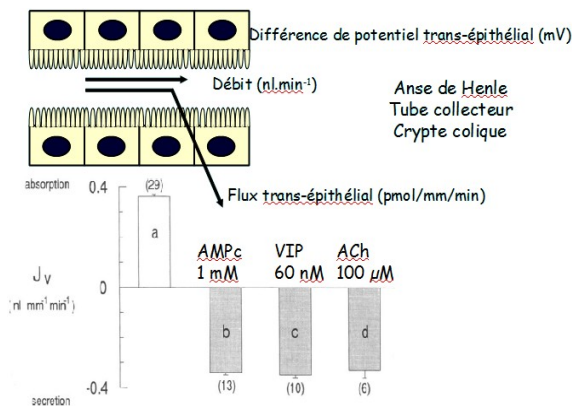
→ Dans les cellules intestinales et rénales, le récepteur est présent et fonctionnel

Les 2nds messagers retrouvés dans l'intestin et dans le rein ne sont pas les mêmes.

Ici, on a représenté ce qu'il se passe dans l'épithélium rénal, en présence de Ca, il y a une augmentation d'IP3 et de DAG, entraînant la libération du Ca stocké dans le RE, ce qui inactive l'AMPc (par activation d'une PDE), avec un effet inhibiteur sur les transports effectué par la cellule.

L'AMPc peut être formé de manière accélérée par l'adénylate cyclase, qui peut elle-même être stimulée par des hormones. De plus, la toxine cholérique va modifier la protéine G_α entraînant son activation permanente, on peut donc artificiellement augmenter la synthèse d'AMPc par la toxine cholérique. Or, la toxine cholérique peut également augmenter les sécrétions au niveau intestinal, entraînant une diarrhée.





On a l'impression que l'effet est inhibiteur dans le rein et sécréteur dans l'intestin, et tout cela lié à l'AMPc.

Dans une crypte colique sous microperfusion, on mesure le flux de liquide en nL/min/mm d'épithélium, la protéine G_α est généralement couplé au récepteur au VIP et à l'acétylcholine.

Ainsi, lorsque l'on met du VIP ou de l'ACh sur l'épithélium, on fait sécréter la crypte colique, ce qu'on peut voir sur le graphique.

Lorsque l'on ajoute de l'AMPc, on obtient le même effet. Et lorsque l'on n'ajoute rien, le colon a tendance à réabsorber.

Lorsque l'on stimule le récepteur sensible au Ca dans l'épithélium colique, on va modifier l'équilibre entre sécrétion et réabsorption, le CaSR va induire la dégradation de l'AMPc en AMP inactif par la PDE.

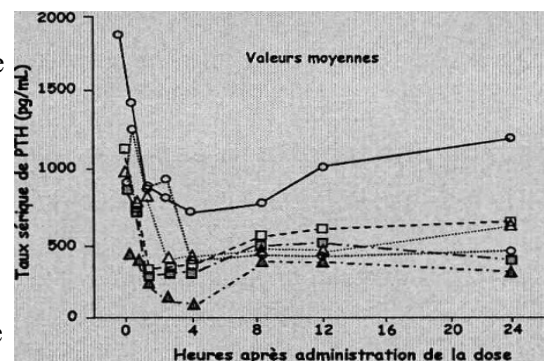
On va donc pouvoir modifier complètement le système cellulaire : d'une part, la toxine cholérique qui stimule la formation d'AMPc (\rightarrow sécrétion), et qui entraîne une diarrhée, d'autre part, le système du CaSR qui bloque le système précédent et qui active la PDE, ce qui dégrade l'AMPc (\rightarrow arrêt de la sécrétion).

Ainsi, donner du Ca à un patient atteint par le choléra, arrête la diarrhée.

C. Le développement d'un médicament:

Le développement d'un médicament à partir de cette base peut être intéressant pour certaines pathologies (pas le choléra, ça ne rapporte pas) comme l'hyperparathyroïdie secondaire à la maladie rénale chronique, qui est associée à une sécrétion énorme de PTH, qui doit être diminuée afin de préserver le statut vasculaire et osseux du patient, on a développer un antagoniste du CaSR.

On a ici des sujets, dont la [PTH]plasmaticque est augmentée (500-2000 pg/mL au lieu de 50-60 pg/mL), à qui l'on donne un antagoniste du CaSR, le cinacalcet, ce qui freine la sécrétion de PTH, ce qu'on peut voir sur ce graphique.



Sur une période prolongée, on prend une cohorte de patients, un groupe étant traité, l'autre, ayant du placebo, et on mesure chaque semaine pendant 30 semaines la [PTH]plasmaticque. On constate que le cinacalcet a un effet efficace et durable sur l'hyperparathyroïdie.

On peut se demander également, si le traitement est efficace quelque soit le niveau de la maladie, ici on a des malades présentant un niveau léger, modéré, ou sévère de la maladie, on cherche à savoir la proportion de patients chez qui on obtient une baisse supérieure à 30% de la [PTH]plasmaticque. On note une proportion comparable de patients, environ 2/3. On a donc un médicament qui marche rapidement, longtemps, et à tous les stades de la maladie.

Ceci entre dans le cadre des essais thérapeutiques, au début sous le contrôle de CPP avec beaucoup de précautions (les effets secondaires étant inconnus) puis lorsque l'on utilise le médicament à plus large échelle, on observe des effets secondaires que l'on peut mettre en évidence sur un grand groupe de population.

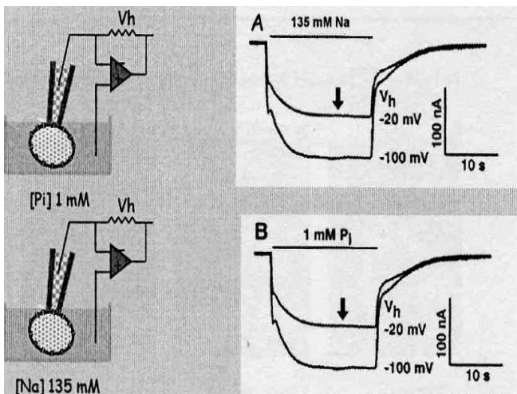
III. REGULATION DE LA PHOSPHATURIE ET Na-Pi

Les phosphates (Pi) sont des composés organiques plus ou moins chargés négativement ($\text{HPO}_4^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$) et ils sont filtrés dans le glomérule et réabsorbés par le tubule (80% des phosphates sont réabsorbés dans le TCP).

Ainsi, on va se demander comment la phosphaturie va être régulée, on en arrive à discuter de l'intérêt du co-transporteur Na-Pi. Pour étudier la régulation de la phosphaturie, on utilise le criblage de banque d'ADN à l'aide de cortex rénal (80% du cortex rénal est constitué de cellules du TCP).

De plus, le transporteur Na-Pi est seulement présent là où s'effectue la réabsorption de Pi, donc si l'on contamine modérément la préparation avec du TCD, ou du glomérule, cela n'aura que peu d'impact.

On procède de la même façon, (voir avant) en recherchant par patch-clamp un transport de Pi dépendant du Na dans les clones présents dans la banque d'ADN.



Dans la première expérience, on va mettre du Pi dans le bain, et dans la seconde du Na dans le bain. On va mesurer un courant, avec une $[\text{Na}]$ constante (2ème expérience), et avec une $[\text{Pi}]$ constante (1ère expérience).

On va mesurer une intensité de courant pour une ddp clampée.

1ère expérience : Quand il n'y a pas de Na dans le bain, le courant est nul, et lorsque l'on met du Na dans le bain, le courant apparaît, il y a donc un transporteur de Pi qui a besoin de Na. Et inversement, on a un transporteur de Na qui a besoin de Pi pour créer un courant. Cette expérience montre que l'on a un co-transporteur qui est asservi au Na et au Pi

On a pris du cortex de rein, et on a effectué un criblage de banque d'ADN, on est allé chercher le clone répondant aux conditions de transports déterminées au préalable.

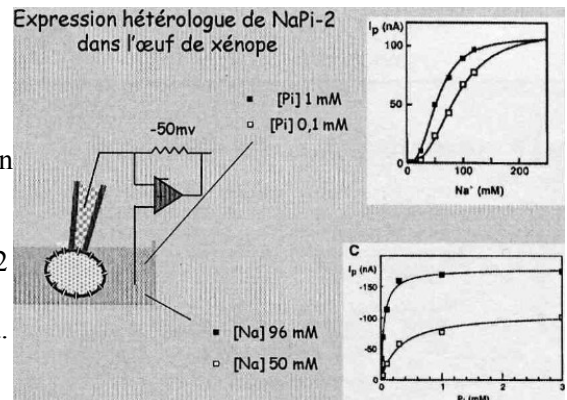
On a effectué un Western Blot, c'est à dire une hybridation d'ARN sur l'ensemble des tissus de l'organisme, et on voit très bien que le NaPi n'est présent que dans le cortex rénal, ce qui donne une idée sur la cartographie de l'expression du Na-Pi.



Il s'agit d'une protéine complexe de 640 AA avec 8 segments transmembranaires et présente sur le pôle apical du TCP. Ici, on a la confirmation que ce que l'on a identifié fonctionnellement en patch-clamp sur des clones bactériens, et ce que l'on a ensuite séquencé, correspondent bien à la même molécule. Après avoir séquencé on a produit cette séquence à nouveau et on l'a introduite dans un œuf de xénope, pour mesure en patch-clamp les courants de Na et de Pi.

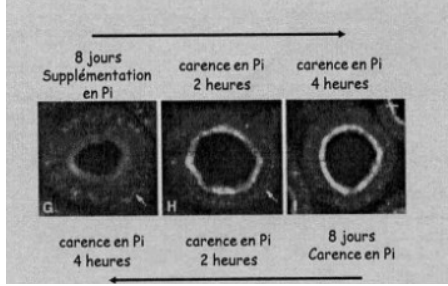
Ici, on a deux courbes en noir ($[\text{Pi}]$ constante normale) et en blanc ($[\text{Pi}]$ constante très basse), et en abscisse une $[\text{Na}]$ variable. On clamp le potentiel électrique, on fait varier la concentration basale en Pi (faible ou normale) et la concentration en Na. Lorsque l'on réalise l'expérience avec un milieu pauvre en Pi (courbe blanche) on obtient un courant plus faible qu'à $[\text{Pi}]$ physiologique.

De même, on réalise la même expérience avec un bain avec 2 concentrations de Na, l'une étant deux fois moins élevée que l'autre, on va faire varier la $[\text{Pi}]$, on mesure le courant obtenu. Ainsi, le courant sera forcé selon la $[\text{Na}]$ basale dans le bain. Le fonctionnement de Na-Pi dépend de la concentration des solutés à son contact.



Comment s'effectue la régulation de Na-Pi ?

Apports alimentaires en Pi et expression de NaPi-2



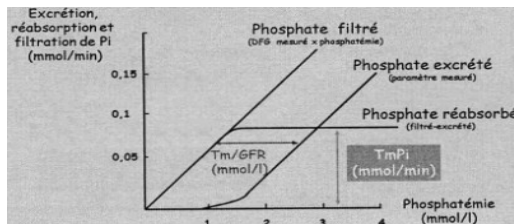
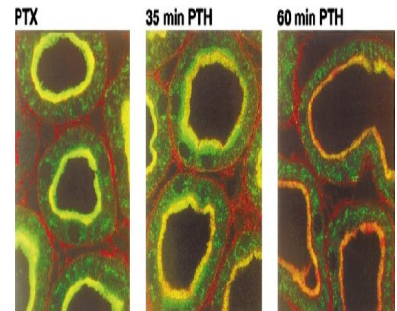
On a mis en évidence grâce à de l'immunochimie on a un TCP avec au centre la lumière et la bordure en brosse. La coloration blanche qui apparaît au centre correspond aux Ac qui fixent son Ag, ici Na-Pi. De gauche à droite, on passe d'une alimentation riche en Pi (peu de transporteurs car on ingère et on élimine beaucoup de Pi) à une carence en Pi, ce qui entraîne une augmentation du marquage, et donc de la quantité de Na-Pi.

A l'inverse, si l'on passe d'un état carenciel à une supplémentation en Pi, on observe une diminution du marquage. L'expression membranaire de Na-Pi dépend des apports alimentaires et digestifs en Pi.

Ce qui pose la question de l'existence d'une communication hormonal, soit par une hormone sécrétée dans l'intestin directement active sur le rein, soit par une hormone en réponse à une stimulation opérée par l'intestin.

On sait qu'il ne s'agit pas de la PTH mais la PTH régule l'expression membranaire de Na-Pi. On voit qu'après parathyroïdectomie, et donc en absence de PTH, un marquage intense jaune de la bordure en brosse, avec 100% de Na-Pi exprimés sur la membrane. Après perfusion de PTH, on observe une disparition de Na-Pi de la bordure en brosse, et donc que l'élimination urinaire de Pi est augmentée, la PTH est une hormone phosphaturiante. Donc au cours d'une hyperparathyroïdie, on observe une hypophosphatémie d'origine rénale.

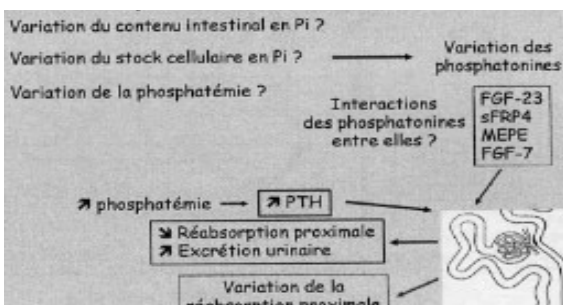
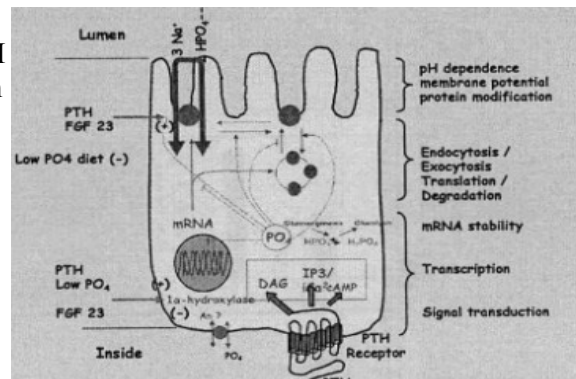
Mais, ce n'est pas la PTH qui régule l'élimination des Pi, selon les apports digestifs, puisque la PTH est régulée par le Ca, pas par les Pi.



On a un co-transporteur qui dépend des concentrations en Na et en Pi pour fonctionner et qui présente un mécanisme saturable, c'est à dire qu'à partir d'une concentration pour laquelle le transport est maximal, les capacités de transport seront dépassées (→ présence d'un seuil de réabsorption). Cette analyse se fait in vivo avec perfusion de Pi, et en mesurant la phosphaturie et le DFG en même temps.

Dans l'épithélium du TCP, on a au pôle apical, le Na-Pi qui va permettre un transport transcellulaire, on voit que la PTH agit sur son récepteur, et va inhiber l'expression de Na-Pi en passant par différents 2nd messagers (AMPC, Ca_{intracellulaire}), mais le FGF 23 intervient également sur Na-Pi.

On ne sait pas quel est l'hormone qui transmet le signal d'apport digestif sur le rein. Le FGF23 est synthétisé dans l'os donc ce n'est pas l'hormone recherché (sauf si le l'intestin communique avec l'os mais cela pose la question de l'existence d'une deuxième hormone, ce qui complique encore plus la compréhension du système).



Lorsque l'on inactive NPT2A (gène codant pour Na-Pi) chez la souris on observe une hypophosphatémie, et on observe une série de pathologies. Aujourd'hui, on regroupe sous le terme de phosphatonines les hormones dont la [C]plasmatique va varier en fonction du contenu intestinal en Pi, du stock intracellulaire en Pi, de la phosphatémie et qui vont moduler l'expression de Na-Pi sur le TCP. Dans ce système, on connaît seulement l'effecteur Na-Pi, et peu de choses sur les intermédiaires.

IV. PHOSPHATES, VIEILLISSEMENT VASCULAIRE, ET MALADIE RENALE CHRONIQUE

Sur cette base physiologique, on va poursuivre en illustrant à l'aide d'un exemple de recherche sur les bio-marqueurs. Les bio-marqueurs sont des substances associées à un phénomène pathologique, mais dont on ne connaît pas nécessairement le lien physiopathologique avec la maladie.

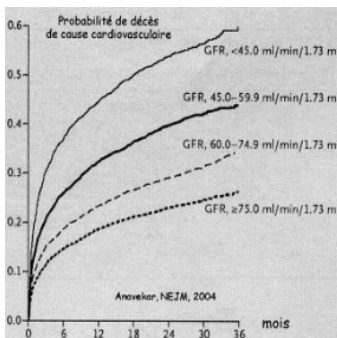
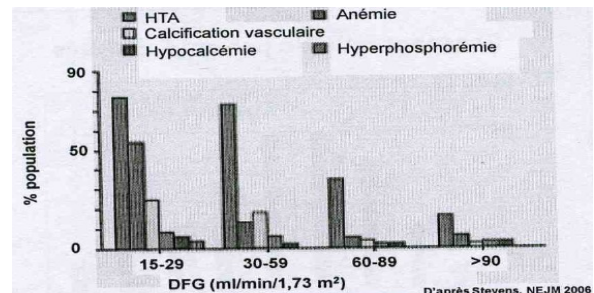
De manière intéressante, le vieillissement vasculaire observé au cours de la maladie rénale chronique est extrêmement lié à l'incapacité rénale à éliminer les Pi. Au cours de la MRC, on note des dysfonctionnement hormonaux, le rein sécrète le calcitriol et en absence de calcitriol, on observe une hypocalcémie et une hyperparathyroïdie secondaire. Le rein ne filtrant plus suffisamment de plasma, il perd sa capacité d'élimination des Pi, ce qui entraîne une hyperphosphatémie.

L'hypocalcémie et l'hyperphosphatémie sont associées à des calcifications vasculaires, et à une mortalité cardiovasculaire élevée.

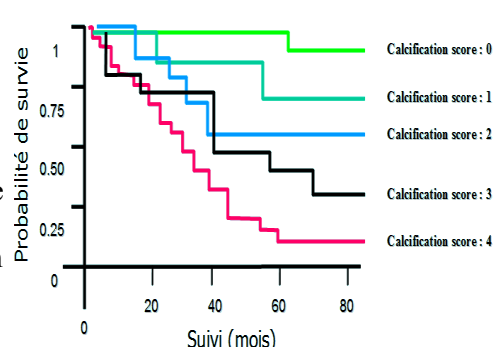
Il existe différents stades de la maladie rénale, où l'on retrouve des stades modérés à sévères (de droite à gauche), et est représenté sur le graphique la fréquence des complications de la MRC.

En s'intéressant plus particulièrement à l'hypocalcémie et l'hyperphosphorémie, on observe une augmentation de la fréquence de ces 2 complications progressivement avec la sévérité de la MRC.

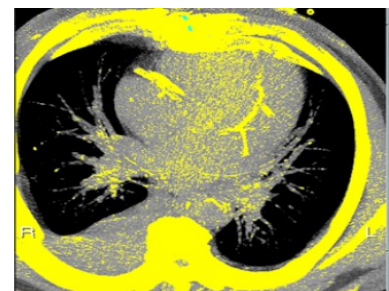
Et de manière concomitante à cette hyperparathyroïdie secondaire, il y a une augmentation de la mortalité cardiovasculaire.



On représente ici la probabilité de décès de cause cardiovasculaire en fonction du temps et de la gravité de la maladie, elle est faible pour les stades modérés de la maladie, et augmente avec la sévérité de l'atteinte rénale. On peut également faire un graphique avec la courbe de survie en fonction du score de calcification (de 0 à 4) → la mortalité augmente avec la calcification artérielle.



Au cours de l'hypocalcémie/hyperphosphatémie et le décès, on observe des calcifications vasculaires (visible sur ASP) avec au premier plan, le moulage des parois des artères iliaques et de l'aorte. On observe également une calcification des artères coronaires, visibles sur TDM avec fenêtre osseuse.



1. Physiopathologie de l'hyperparathyroïdie dans la MRC ?

On sait que l'incapacité du rein à éliminer les Pi produit une hyperphosphatémie, la concentration en FGF23, qui est une phosphatonine, va augmenter en réponse à une diminution du DFG ou à l'hyperphosphatémie. On note également une baisse de l'hydroxylation de la vitamine D en position 1 α , et donc une diminution de la synthèse de calcitriol entraînant une hypocalcémie qui aboutit avec l'hyperphosphatémie à une hyperparathyroïdie.

On s'est demandé si les Pi ont la capacité directe d'augmenter la calcification des parois vasculaires, on ne le sait pas de manière directe chez l'Homme, mais on peut expérimenter in vitro en utilisant des cultures de cellules musculaires lisses humaines.

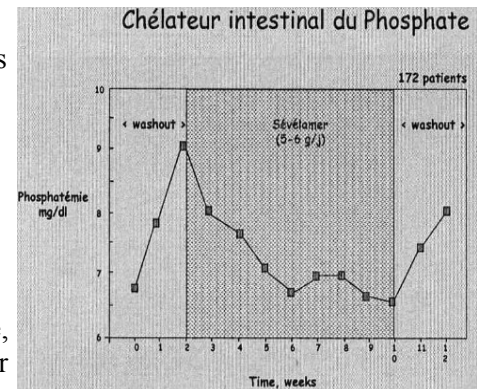
On va mettre ces cellules dans un bain pauvre ou riche en Pi, et on va révéler la présence de calcifications par l'utilisation la coloration de Von Kosa. Ainsi, on observe une augmentation de la calcification in vitro, liée simplement à la présence de Pi.

Cela ne nous en apprend pas plus sur le mécanisme d'action des Pi, mais confirme l'implication directe des Pi dans le lien entre hyperphosphatémie et mortalité CV.

De plus, dans 2 études avec des cohortes 4000 et 3000 patients, on observe que 72% des patients en insuffisance rénale terminale présente une hyperphosphatémie, la baisse de la phosphatémie devient donc un enjeu majeur dans la prise en charge de ces patients.

Pour cela, on va diminuer l'absorption intestinale de Pi en le chélatant au niveau intestinal. Les Pi sont présentes dans les aliments contenant des protéines (protéines phosphorylées), une alimentation normale en protéines est associée à une alimentation normale en Pi, et si l'on veut diminuer les apports en Pi, il faudra carencer les patients en protéines. De plus, l'absorption intestinale de Pi est très rapide et sensible, on a une relation linéaire nette entre absorption intestinale et apports alimentaires (de 70%).

L'approche pour empêcher l'absorption des Pi est utilisée en clinique, on mesure la phosphatémie préalable à l'administration de Sévélamer (Chélateur de phosphate) qui est élevée, et on observe après administration de Sévélamer une diminution de la phosphatémie.

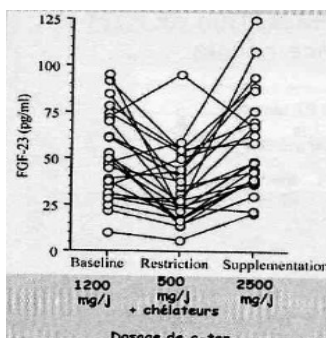


2. Le FGF : bio-marqueur de la MRC

Le FGF23 est également un bio-marqueur, car sa [C] plasmatique est corrélée à la fois à la survie et à la survenue d'évènements CV. On voit, ici, la survie des patients en fonction du temps et de la [FGF23], une faible [FGF23] est associée à une meilleure survie qu'une forte [FGF23] (chez des patients non-insuffisants rénaux), de même l'absence d'évènements cardiovasculaires est plus rare chez des patients avec une forte [FGF23] (→ plus d'évènements CV) et inversement pour les patients avec une faible [FGF23].

Le FGF23 est donc un bio-marqueur des complications CV au cours de la MRC, mais également un marqueur pronostic de la survie rénale, qui correspond au temps que va passer un patient avec une maladie rénale entre le diagnostic et la dialyse, et si l'on dose à T0 la [FGF23], on arrive à savoir si ce patient va progresser rapidement ou non vers la dialyse.

Le FGF23 est une protéine synthétisée par les cellules osseuses présente sous forme circulante active et clivée en 2 fragments inactifs. Il s'agit d'une hormone, dont l'inactivation du gène chez l'animal entraîne ce que l'on observe au cours de la MRC chez l'Homme : hyperphosphatémie, calcifications vasculaires, mortalité élevée.



Afin de vérifier le fait que la phosphatémie conditionne ce phénotype on donne des chélateurs de Pi, on normalise la phosphatémie, on améliore la durée de vie, et on fait disparaître les calcifications vasculaires. Le Pi semble donc être un élément directement calcifiant et responsable de la mortalité. Le FGF23 conditionne la phosphatémie, il bloque Na-Pi, il s'agit donc d'une hormone phosphaturiante, dans la MRC le TCP n'est plus fonctionnel, donc le Pi s'accumule malgré de fortes [FGF23], mais physiologiquement, les apports en Pi, vont modifier la sécrétion de FGF23.

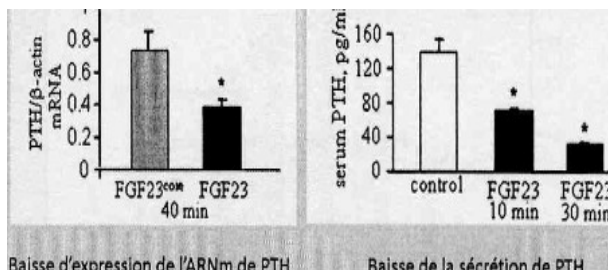
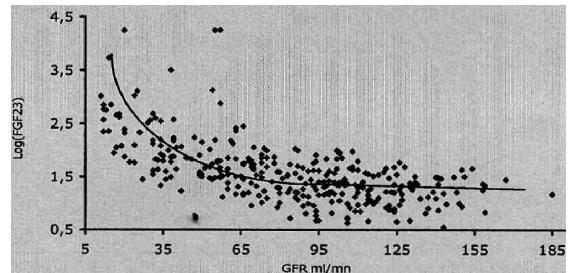
Ici, en ordonnée on a la [FGF23] circulante, en situation d'apports normaux en Pi, on a une certaine [FGF23] qui a tendance à diminuer en situation de déplétion+chélateur (effet maximal), et qui augmente en cas de supplémentation.

De plus, on remarque qu'au cours d'une alimentation riche en Pi, la [FGF23] va augmenter et persister à un niveau élevé, une alimentation pauvre en Pi, la [FGF23] est durablement basse. On a donc une relation de la [FGF23] avec la [Pi] et le temps qui semble en faveur du rôle régulateur des Pi sur le FGF23.

Le calcitriol est également un déterminant de la [FGF23], il est synthétisé par le rein, par hydroxylation de la 25-VitD. On voit sur ce graphique que lorsque l'on injecte du calcitriol et que l'on mesure la [FGF23], on observe une augmentation de la [FGF23].

On a utilisé des chondrocytes, qui synthétisent le FGF23, pour savoir si la synthèse d'ARNm, codant pour le FGF23, était modifiée par le calcitriol. Les chondrocytes possèdent un récepteur au calcitriol (VDR) et on a la possibilité d'inactiver ce récepteur par l'action d'un système Cre-lox, qui correspond à une inactivation conditionnelle, en mettant ce produit dans un milieu de culture, on va bloquer le récepteur à la Vit. D. Lorsque l'on module l'activité du récepteur, on module la production d'ARNm de FGF23 et donc de FGF23.

Les Pi et le calcitriol modulent donc la sécrétion de FGF23. Cette diapositive montre la relation entre la [FGF23] et le DFG, la MRC correspond à la diminution du DFG. On voit que plus le DFG est faible, plus la [FGF23] est élevée et inversement. On ne sait pas très bien par quels mécanismes, mais la MR est associée à une élévation de la [FGF23] (par diminution de l'élimination rénale du FGF23 ou par augmentation de la phosphatémie ?).



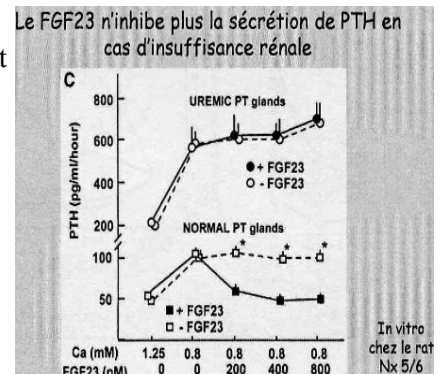
Il s'agit donc d'un bio-marqueur conditionnant la mortalité CV, la survie rénale, et impliqué dans la pathologie des parathyroïdes. Ici, on a mesuré l'effet du FGF23 sur la synthèse (exprimée par la quantité d'ARNm) et la sécrétion de PTH (exprimée par [PTH] plasmatique). Quand on expose des cultures cellulaires de parathyroïdes à des [FGF23] élevées, on a une baisse de la synthèse et de la sécrétion de PTH.

Le FGF23 inhibe la sécrétion de PTH, en remettant cette donnée dans le contexte de l'hyperparathyroïdie secondaire dans la MRC, on voit que cet effet est bénéfique, mais au cours de l'insuffisance rénale, cela ne fonctionne plus ainsi.

On peut mettre cela en évidence sur des parathyroïdes de rats urémiques et sains. On expose ces tissus à des [FGF23] croissantes après avoir vérifié qu'ils répondaient bien au Ca, on voit que chez les 2 populations de rats, l'hypocalcémie va stimuler la sécrétion de PTH (les tissus sont sains).

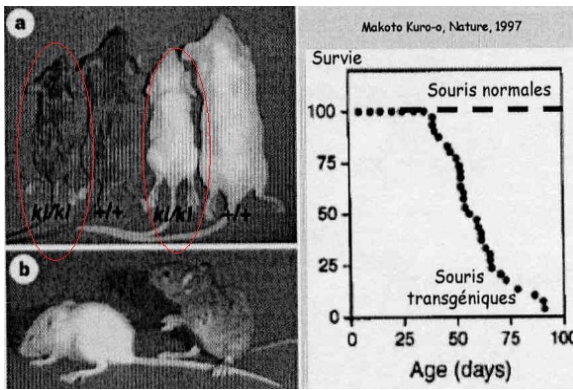
Ensuite, à [Ca] constante, on fait varier [FGF23], on observe une baisse de la sécrétion de PTH chez les rats sains, mais pas chez les rats urémiques. La MRC bloque l'effet du FGF23 sur les parathyroïdes

Afin de comprendre le mécanisme à l'origine de cette résistance de la parathyroïde, on mesure la quantité d'ARN dans le FGFR1 (récepteur de type 1 au FGF23) dans la glande parathyroïde chez des rats sains et urémiques, et on observe chez les rats urémiques une diminution de son expression.



3. Implication de la molécule Klotho dans la MRC

La molécule Klotho est un co-récepteur du FGF23, et lorsque l'on inactive le gène codant pour Klotho on obtient un phénotype de vieillissement vasculaire et de mortalité accéléré. Le FGF23 et son récepteur ont besoin de Klotho pour être biologiquement actifs et stimuler la voie des MAP-Kinases. Klotho est présente sous forme circulante et membranaire, elle est soit adressée à la membrane avec des protéines d'ancrage, soit il y aura un épissage alternatif qui va aboutir à la fabrication de la protéine sans la partie d'ancrage membranaire.



Une équipe japonaise a observé qu'en inactivant le gène de la protéine Klotho, on observait un phénotype de Progeria. Dans deux souches différentes (noires/blanches) on a observé à âge égal la différence de taille entre les animaux. On distingue un aspect anormalement vieux de la souris (elle est bossue, plus petite, avec moins de poils).

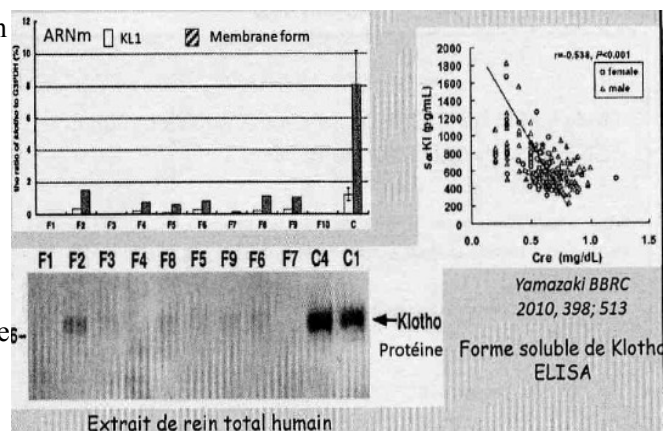
La longévité d'une souris est d'environ 2 ans, or au bout de 100 jours environ, la totalité des souris KlothoKO sont mortes, et on observe le même phénotype que pour les souris FGF23 (hyperphosphatémie, calcifications vasculaires, mortalité élevée).

Klotho semble donc très impliquée dans la problématique des bio-marqueurs, avec un phénotype semblable à celui de la MRC. On dispose de beaucoup moins d'éléments permettant d'illustrer le rôle de bio-marqueur de Klotho, on a plus l'impression qu'elle agit seulement comme co-facteur de FGF23.

Cependant si l'on s'intéresse uniquement à Klotho, on remarque qu'entre des sujets sains et insuffisants rénaux, il y a une modification de l'expression de Klotho qui se traduit par une diminution de la synthèse d'ARNm et de la protéine.

Si l'on mesure la quantité de la protéine Klotho en fonction de la créatininémie, on remarque que plus l'insuffisance rénale est avancée, moins Klotho est exprimée.

Donc l'expression de Klotho est diminuée au cours de la MRC, et l'absence de cette protéine entraîne un vieillissement accéléré.

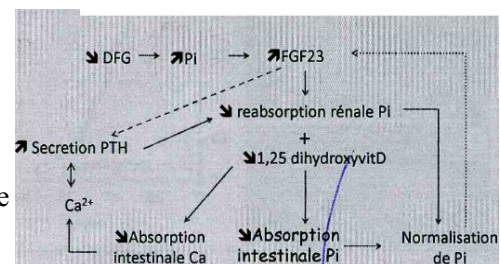


A l'heure actuelle, on se pose encore beaucoup de questions sur le rôle de ces bio-marqueurs : on ne sait pas pourquoi FGF23 est augmentée, ni pourquoi Klotho est diminuée.

L'accumulation de FGF23 est-elle responsable de la diminution du co-facteur de son récepteur ? Ou la MRC est-elle directement impliquée dans sa diminution ?

On aboutit sur un schéma complexe de la physiopathologie de l'hyperparathyroïdie au cours de la MRC.

On a une maladie rénale caractérisée par une baisse chronique du DFG responsable d'une hyperphosphatémie, ce qui va probablement augmenter l'expression de FGF23 afin de limiter la réabsorption rénale de Pi, ce qui va également diminuer la synthèse de calcitriol, et donc l'absorption de Ca. Le FGF23 et d'autres phosphatonines vont donc intervenir dans la MRC.



A partir de ces connaissances, on sait que diminuer la phosphatémie améliorerait la survie des patients insuffisants rénaux, mais l'intérêt de la diminution de la sécrétion de FGF23 n'a pas été encore démontré dans la survie. Le lien entre Pi et FGF23 étant direct, les laboratoires ont envie de commercialiser leurs chélateurs de Pi sur les arguments de diminution de la phosphatémie et du FGF23, ces arguments sont en cours d'étude.

L'étude PREFECT consiste à évaluer la possibilité de réduire précocement la phosphatémie dans la MRC, afin d'évaluer son impact sur le FGF23 : en donnant du carbonate de lanthane (chélateur du Pi) on mesure à différents moments la [FGF23] chez des sujets traités et des sujets placebo.