## **UNIVERSITE DE NANTES**

## FACULTE DE MEDECINE

Année 2005-2006

N° 121

## THESE

# Pour le DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

Qualification en Anatomie et Cytologie Pathologiques

Par Louise Galmiche-Rolland Née le 27 mai 1976 à Rouen

Présentée et soutenue publiquement le 22 septembre 2005

## MUTATIONS DU TRANSPORTEUR RENAL SODIUM/PHOSPHATE NPT2a ASSOCIEES A DES LITHIASES RENALES CHEZ L'HOMME

Président : Monsieur le Professeur Christian Laboisse

Directeur de thèse : Madame le Docteur Gabrielle Planelles

Membres du jury : Monsieur le Professeur Denis Escande

Monsieur le Professeur Vincent Esnault

## **TABLE DES MATIERES**

#### Abréviations

#### Introduction

## Etat de la question et justification de l'étude expérimentale

1-Rappels sur la pathologie lithiasique

1.1-Aspects biochimiques et mécanismes de la lithogénèse

1.2-Classification étiologique des lithiases rénales calciques

2-Métabolisme du phosphate inorganique

3-Rein et phosphate

4-Les systèmes de transporteurs de phosphate de type NPT

5-Le transporteur NPT2a

6-Fuites rénales de phosphate et lithiase urinaire

6.1-Mécanismes de formation des lithiases secondaires à une fuite rénale de phosphate

6.2-Origine des fuites rénales de phosphate

6.3-Implication de NPT2a

7-Justification de l'étude

## Objectif du travail expérimental

## Partie expérimentale

Matériels et méthodes

1-Animal d'expérience

2-Préparation des ovocytes

3-Préparation des ARN

4-Injection des ARN dans les ovocytes

5-Etude électrophysiologique

6-Etude statistique

Résultats

Discussion

## Synthèse et perspectives

Références

Annexe: Histoire clinique des patients étudiés

## ABREVIATIONS

A: Alanine
ADNc: ADN complémentaire
AMPc: Adénosine Monophosphate cyclique
ARNm: ARN messager
ATP: adénosine tri-phosphate
CaCl <sub>2</sub> : Chlorure de calcium
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> : Nitrate de calcium
Cl: chlore
F: Phénylalanine
FGF23: Facteur de croissance fibroblastique 23 (Fibroblast Growth Factor 23)
GTP: guanosine tri-phosphate
KCl: Chlorure de potassium
M: Méthionine
MgSO <sub>4</sub> : Sulfate de magnésium
Na <sup>+</sup> : Sodium
NaCl: Chlorure de sodium
NaHCO <sub>3</sub> : Bicarbonate de sodium
NPT2a: co-transporteur sodium-phosphate 2a
P: Proline
Pi: Phosphate inorganique
PTH: Hormone parathyroidienne
S: Serine
TCP: Tubule Contourné Proximal
TmPi/DFG: Taux de réabsorption rénale du Pi / Débit de Filtration Glomérulaire
TrisHCl: Trizma Hydrochloride
V: Valine
Vc: différence de potentiel imposé (Voltage Clamp)

#### INTRODUCTION

La pathologie lithiasique urinaire est une pathologie fréquente dans les pays industrialisés où sa prévalence est comprise entre 1 et 10 % (1). 70 % des lithiases rénales observées dans les pays développés socio-économiquement sont des lithiases calciques. Dans ces mêmes pays, l'incidence annuelle des hospitalisations pour calcul rénal est de 0.03 à 0.1 % (2). Les lithiases urinaires observées dans ces pays sont essentiellement des lithiases rénales. Les lithiases vésicales sont beaucoup plus fréquemment diagnostiquées dans les pays du Tiers-Monde et leur survenue est favorisée par le développement d'infections urinaires basses.

Globalement, le risque de développer des lithiases rénales chez l'adulte est estimé à 1 à 5 % en Asie, 5 à 9 % en Europe et 12 à 13 % en Amérique du Nord. Divers facteurs de risque sont décrits. La formation de lithiases urinaires est plus fréquente chez les sujets Caucasiens que chez les sujets Noirs, et ce quel que soit le pays : ainsi, le ratio est de 4 pour 1 aux Etats-Unis et au Brésil. Les lithiases urinaires sont également plus fréquentes chez l'homme que chez la femme (3). Concernant l'âge, on note un pic pour les lithiases idiopathiques de l'adulte vers 35 ans, les deux sexes confondus. Cependant, on note un double pic de fréquence chez les femmes, à 30 et 55 ans, probablement du fait de la résorption osseuse se produisant à la ménopause (1). Le principal facteur environnemental pouvant augmenter le risque de lithiase urinaire est un régime alimentaire riche en protéines animales. Ce facteur augmente notamment le risque de développement de lithiases calciques. En revanche, il n'a pas été démontré de rôle des apports alimentaires en calcium ou de la dureté de l'eau.

De multiples études épidémiologiques (4-7) ont par ailleurs montré la présence d'une agrégation familiale chez les patients présentant des lithiases rénales calciques, en particulier récidivantes, ce qui a conduit à poser la question de l'existence de facteurs génétiques prédisposant à cette pathologie, voire l'existence d'une origine génétique directement impliquée. Toutefois, jusqu'à récemment, aucun gène causal n'avait été identifié, soulignant la probable hétérogénéité génétique de la pathologie lithiasique ainsi que l'intervention d'autres facteurs propres à chaque individu.

Une étude réalisée en 2001 (8) a porté sur une cohorte de 207 patients présentant des lithiases calciques d'étiologie indéterminée et un taux sérique de PTH normal (la cohorte initiale comportait 230 patients avec des lithiases calciques et 10 % d'entre eux présentaient un taux sérique de PTH élevé) : environ 20 % d'entre eux présentaient une diminution du taux de

réabsorption rénale du phosphate témoignant d'une fuite rénale de phosphate. Ce travail a ainsi mis en évidence l'importance de cette population au sein du groupe des patients lithiasiques.

La question de l'origine de cette diminution de réabsorption rénale de phosphate s'est posée chez ces patients : les auteurs ont émis l'hypothèse d'une origine génétique, portant sur un gène codant pour une protéine permettant la réabsorption de Pi par le rein. En effet, le phosphate, qui joue un rôle majeur dans l'organisme (en particulier dans le processus de minéralisation osseuse), est maintenu dans l'organisme à des valeurs appropriées en particulier grâce au tubule rénal qui assure la réabsorption de la majorité du phosphate filtré par le glomérule. Cette réabsorption a lieu principalement au niveau du tubule contourné proximal grâce au co-transporteur sodium-phosphate NPT2a. Cette protéine étant d'une importance capitale dans le maintien du stock de phosphate de l'organisme était ainsi un excellent candidat pour la recherche de mutations expliquant le phénotype des patients.

A la suite de cette hypothèse, l'étude publiée en 2002 a montré pour la 1<sup>ère</sup> fois la relation entre des mutations du co-transporteur NPT2a et des fuites rénales de Pi (9). Cette étude portait sur 20 patients présentant une fuite rénale de phosphate associée à des lithiases rénales ou à une déminéralisation osseuse. Le séquençage du gène codant pour NPT2a a porté sur les 13 exons de ce gène et a été réalisé sur ces 20 patients. Deux patients se sont révélés porteurs de mutations de NPT2a à l'état hétérozygote. Cette étude génétique a été doublée d'une étude fonctionnelle qui a montré que, après expression hétérologue, les formes mutées conduisaient à une diminution du transport de phosphate ainsi qu'à un effet dominant négatif sur le transporteur NPT2a sauvage. La conclusion de cette étude est que des lithiases urinaires ainsi que des déminéralisations osseuses peuvent être dues à des mutations hétérozygotes de NPT2a. Récemment, deux nouvelles mutations du co-transporteur NPT2a ont été identifiées chez 2 patients (n'appartenant pas à la cohorte précédente) présentant une fuite rénale de phosphate et des lithiases rénales récidivantes.

Le but de la partie expérimentale de ce travail a été la caractérisation fonctionnelle de ces formes mutées de NPT2a par rapport à la forme sauvage après expression dans un système hétérologue et au moyen d'approches électrophysiologiques.

La première partie de ce travail a pour objectif de rappeler les éléments concernant le métabolisme du phosphate et les aspects physiopathologiques liés aux fuites rénales de phosphate pouvant conduire à la constitution de lithiases urinaires.

# ETAT DE LA QUESTION ET JUSTIFICATION DE L'ETUDE EXPERIMENTALE

## 1-Rappels sur la pathologie lithiasique

#### 1.1-Aspects biochimiques et mécanismes de la lithogénèse

Différents facteurs peuvent intervenir dans la constitution de lithiases urinaires: l'augmentation de la concentration urinaire des substances cristallisables, le pH urinaire, la diminution des inhibiteurs de la cristallisation et des facteurs anatomiques favorisants (uropathies).

La formation des lithiases urinaires se fait en plusieurs étapes (10).

La concentration des urines en sels arrive tout d'abord à un niveau élevé à partir duquel ces sels deviennent insolubles et commencent à former des micro-cristaux. L'étape suivante est la nucléation. Les micro-cristaux formés s'agrègent autour de débris ou de particules présentes dans les urines. Il est rare que la nucléation soit homogène, c'est-à-dire qu'elle se fasse par agrégation de cristaux seuls. Les cristaux formés croissent ensuite progressivement par agrégation de nouveaux cristaux. Cette croissance est plus ou moins rapide selon la saturation des urines. De plus, de petits cristaux peuvent s'agréger entre eux du fait d'interactions électrostatiques.

D'un point de vue chimique, il existe 4 types de lithiases urinaires: les lithiases calciques, les lithiases uriques, les lithiases cystiniques et celles constituées de struvite (ou calculs phosphoammoniacomagnésiens). Nous n'aborderons ici que les lithiases calciques. On distingue les lithiases calciques avec et sans hypercalciurie.

L'hypercalciurie peut se constituer par différents mécanismes. L'hypercalciurie de résorption est due à une augmentation de la résorption osseuse dans le contexte d'une hyperparathyroidie. L'augmentation du taux sérique de PTH stimule la résorption osseuse, ce qui tend à augmenter la calcémie et la calciurie. D'autre part, la PTH stimule la sécrétion de vitamine D<sub>3</sub>, elle-même responsable d'une augmentation de l'absorption digestive de calcium, ce qui accentue l'hypercalcémie. L'hypercalciurie d'absorption est due à une augmentation de l'absorption intestinale de calcium. L'hypercalcémie qui en résulte entraine d'autre part une diminution du taux de PTH, ce qui a pour effet d'augmenter la calciurie afin de corriger la calcémie.

Enfin, l'hypercalciurie rénale est liée à une diminution de la réabsorption tubulaire de calcium. La fuite rénale de calcium entraine une augmentation du taux de PTH et une augmentation secondaire du taux de vitamine  $D_3$  ce qui augmente la réabsorption rénale de calcium et tend à corriger l'hypercalciurie.

Les autres causes d'hypercalciurie sont la fuite rénale de Pi et une augmentation primitive de la synthèse de vitamine  $D_3$ .

De façon physiologique, des inhibiteurs de la formation de lithiases sont présents dans les urines. Dans le cas des lithiases calciques, ces substances sont soit des molécules de bas poids moléculaire soit des macromolécules.

Les inhibiteurs de bas poids moléculaire sont le pyrophosphate, le citrate et le magnésium. Le pyrophosphate retarde la formation de cristaux d'hydroxyapatite et d'oxalate de calcium dans les urines. Il inhibe également la nucléation hétérogène d'oxalate de calcium autour des cristaux d'hydroxyapatite. Le magnésium peut complexer d'importantes quantités d'oxalate et le citrate des ions calcium. Le citrate réduit aussi la croissance, l'agrégation et la nucléation des cristaux d'oxalate de calcium.

L'inhibition de la cristallisation de l'oxalate de calcium est toutefois assurée principalement par des macromolécules. Ces molécules sont fortement chargées négativement du fait de leur composition en acides aminés acides et de modifications post-traductionnelles pourvoyeuses de charges négatives (phosphorylation). Ils agissent en réduisant l'agrégation des cristaux ou en diminuant leur vitesse de croissance. Ces molécules sont principalement représentées par la néphrocalcine, la protéine de Tamm-Horsfall et l'uropontine. La néphrocalcine inhibe les phases de nucléation, d'agrégation et de croissance des cristaux ainsi que l'adhésion de ces cristaux aux cellules épithéliales rénales. La protéine de Tamm-Horsfall est la protéine la plus abondante dans les urines. Elle est synthétisée dans l'anse large de Henle et inhibe fortement l'agrégation des cristaux d'oxalate de calcium. Ses propriétés biochimiques seraient différentes chez les patients présentant des lithiases récidivantes. L'uropontine est produite dans l'anse fine de Henle et dans l'épithélium papillaire et présente les mêmes propriétés que la néphrocalcine. Le mécanisme de formation des lithiases dans le rein commence à être mieux connu. L'une des questions était liée à la large prédominance des lithiases rénales par rapport aux lithiases vésicales. Or, le flux urinaire permanent le long du néphron ne devrait pas favoriser l'apparition de lithiases. Par ailleurs, chez près de 100 % des patients présentant des lithiases calciques, on observe des plaques de Randall (11). Ces plaques correspondent à des dépôts interstitiels de cristaux d'apatite (ou phosphate de calcium) situés à proximité ou au niveau de la papille. En endoscopie, ils apparaissent comme des plaques blanchâtres situées sous l'urothelium de la papille et pouvant l'ulcérer. Ces plaques représentent le site de croissance des futurs calculs rénaux d'oxalate et de phosphate de calcium.

Dans une étude récente, Evan et al (12) ont montré que la lésion primitive se constituait dans la membrane basale de l'anse fine de Henle, dans la médullaire interne (figure 1). Ce segment du néphron est celui où la concentration des urines est la plus importante. Quelle que soit la taille de la lésion, elle est constituée d'apatite. Ces cristaux croissent progressivement dans l'interstitium environnant, autour des vasa recta et de la membrane basale des tubes collecteurs, jusqu'à l'interstitium de la papille.



Figure 1 : Mécanisme de formation des lithiases rénales calciques. La lésion débute sous forme de dépôts de cristaux d'apatite (CaPO<sub>4</sub>) au niveau de l'anse fine de Henle, pour s'étendre jusqu'à la papille où s'ancrent ensuite des cristaux d'oxalate de calcium. (13)

L'anse fine de Henle présente une structure histologique particulière avec une membrane basale épaisse constituée de collagène et riche en mucopolysaccharides. Cette basale est donc fortement chargée négativement, ce qui pourrait être à l'origine d'interactions électrostatiques avec les ions calcium et phosphate.

Les cristaux d'apatite croissent alors par l'afflux de calcium et de phosphate par diffusion, se développant jusqu'à l'urothelium de la papille où ils représentent alors un site d'ancrage pour les cristaux d'oxalate de calcium. Par la suite, les calculs ainsi formés se détachent de la muqueuse papillaire et peuvent alors migrer le long de l'uretère.

## 1.2-Classification étiologique des lithiases rénales calciques

Les lithiases calciques avec hypercalciurie sont rarement familiales (formes autosomiques dominantes). Elles sont le plus souvent acquises et peuvent être dues à une hyperparathyroidie, une acidose tubulaire distale de type I, une sarcoidose, une intoxication à la vitamine D, une maladie de Paget ainsi qu'aux causes de fuite urinaire de Pi.

Les lithiases calciques sans hypercalciurie peuvent être dues à une hyperuricosurie. Elles peuvent aussi être dues à une hyperoxalurie qui peut être héréditaire ou acquise, notamment en cas de stéatorrhée majeure entraînant une réabsorption accrue de l'oxalate au niveau du colon et une hyperoxalurie secondaire (maladie de Crohn, maladie coeliaque, résection iléale, insuffisance pancréatique).

Pour chacun de ces types de lithiases, avec ou sans hypercalciurie, l'étiologie peut aussi rester inconnue (lithiase idiopathique).

## 2-Métabolisme du phosphate (figure 2)

Le phosphate est un des anions les plus abondants de l'organisme et il joue un rôle primordial dans de nombreuses fonctions vitales.

Le phosphate se présente dans l'organisme sous 2 formes : une forme organique (phospholipides, esters de phosphate comme l'ATP et le GTP, acides nucléiques) et une forme inorganique ou Pi. Au pH physiologique, le Pi est présent sous forme de  $HPO_4^{2-}$  et  $H_2PO_4^{-}$ . Les constantes de dissociation pKa pour le Pi sont égales à 6.9 et 12.3 respectivement pour le phosphate di- et monovalent. A pH 7.4, le ratio  $HPO_4^{2-} / H_2PO_4^{-}$  est donc de 4/1. Les apports en Pi sont largement assurés par l'alimentation : l'apport normal chez un adulte est compris entre 800 et 1600 mg/jour (25 à 50 mmol/jour) (14). Environ 65 à 75 % du Pi ingéré

est absorbé par l'intestin au niveau du duodenum, du jejunum et de l'iléon. La quantité de Pi absorbée dans le tube digestif est égale à la quantité de Pi éliminée dans les urines à l'état stationnaire ; de fait, la quantité de Pi excrétée par le rein s'ajuste aux besoins de l'organisme. Le Pi absorbé est donc soit éliminé par le rein (il participe à l'acidité titrable urinaire, essentiellement sous forme de sel di-sodique), soit incorporé sous forme organique dans les cellules, soit incorporé dans le tissu osseux. Cette répartition et ces échanges sont illustrés dans la figure 2.



*Figure 2 : Homéostasie du Pi : répartition et organes impliqués dans la régulation du stock de Pi de l'organisme. ([Pi]p: concentration sérique de Pi).* 

Le Pi joue, en relation étroite avec le calcium, un rôle majeur dans le processus de minéralisation osseuse : environ 85 % du Pi sont situés dans le tissu osseux (15) où il est associé au calcium sous forme de cristaux d'hydroxyapatite.

Environ 15 % sont localisés dans le compartiment cellulaire où cet anion joue un rôle fondamental dans le métabolisme et la signalisation cellulaire.

Le taux de Pi plasmatique représente moins de 1 % du stock de Pi de l'organisme. Seul le phosphate sous forme inorganique (Pi) est dosé en routine, ce qui ne représente que 29 % du phosphate sérique total. Cette fraction correspond aussi au phosphate filtré librement dans le

glomérule. Le taux plasmatique de phosphate suit des variations nyctémérales : il est minimal entre 9h30 et 10h et maximal vers 16h. Par ailleurs, la phosphatémie est également différente en fonction de l'âge. Chez l'enfant, la phosphatémie est égale au double des valeurs trouvées chez l'adulte et ce jusqu'à la fin de la croissance. La réabsorption urinaire du Pi est en effet augmentée, notamment par l'hormone de croissance, du fait des besoins osseux importants durant cette période.

La phosphatémie est constante : le bilan du Pi est normalement équilibré par les apports alimentaires en Pi et son élimination essentiellement urinaire. Ceci s'explique par des échanges permanents entre les différents compartiments où est stocké le Pi et par une régulation fine des échanges de Pi.

Différents facteurs interviennent dans cette régulation. Les apports alimentaires de Pi jouent un rôle important : un régime pauvre en Pi entraîne une augmentation de la réabsorption rénale de Pi, tandis qu'un régime riche en Pi a une conséquence inverse. L'hormone parathyroidienne (PTH) est responsable d'une fuite urinaire de Pi. Enfin, la vitamine  $D_3$ , ou 1,25-dihydroxycholécalciférol, diminue la déperdition urinaire de Pi en augmentant sa réabsorption tubulaire et augmente l'absorption digestive de Pi.

#### **3-Rein et phosphate**

Trois organes (os, rein et intestin) sont impliqués dans l'homéostasie du Pi. Parmi ces organes, le rein est celui qui joue un rôle majeur car il est capable d'adapter de façon considérable ses capacités de réabsorption du Pi en fonction des besoins.

De façon physiologique, environ 80 % du Pi filtré est réabsorbé le long du néphron. Cette réabsorption se produit quasi-exclusivement au niveau du tubule contourné proximal (TCP). Ainsi, 60 à 80 % du Pi filtré est réabsorbé dans le TCP, 15 à 20 % dans le tube droit proximal et moins de 10 % dans le néphron distal (14).

La réabsorption du Pi est évaluée en pratique par la mesure du taux maximal de réabsorption du Pi ou TmPi. En effet, chez l'homme comme chez l'animal, la réabsorption du Pi augmente lorsque la charge en Pi filtré augmente, ce jusqu'à une valeur maximale définie comme étant le TmPi. Ce taux est exprimé après normalisation par rapport au débit de filtration glomérulaire ou DFG et ce ratio est déterminé à l'aide du normogramme de Bijvoet et Walton (16) qui permet de calculer ce rapport à partir de la phosphatémie et de l'excrétion fractionnelle urinaire du Pi. Le DFG est déterminé grâce à la perfusion d'inuline. Le rapport TmPi/DFG est l'indicateur de référence de la capacité de réabsorption rénale de Pi.

A l'échelle cellulaire, le transport transépithélial de Pi est essentiellement unidirectionnel : le Pi est capté au pôle apical de la cellule du TCP, est transporté jusqu'au pôle baso-latéral où il est transféré dans l'interstitium. Le mécanisme membranaire basolatéral à l'origine de l'efflux de Pi de la cellule vers l'interstitium reste débattu, tandis que le mécanisme apical de l'absorption de Pi de la lumière vers la cellule a été caractérisé au plan moléculaire comme fonctionnel. La membrane apicale des cellules du TCP est dotée de transporteurs couplant l'absorption apicale de sodium et de Pi de type NPT.

#### 4-Les systèmes de transporteurs de phosphate de type NPT

Trois systèmes de co-transport NPT ont été identifiés, classés dans la famille des SLC (Solute Carrier series, nomenclature HUGO) (17, 18) : NPT1 correspond au SLC17, NPT2 au SLC34 et NPT3 au SLC20. Chez les mammifères, chacun de ces systèmes est présent dans le rein. Bien que ces 3 transporteurs soient capables de transporter de façon couplée le sodium et le Pi, leur importance quantitative comme leur rôle fonctionnel varient. Ainsi, une évaluation quantitative des ARNm de NPT a été réalisée dans le rein de souris par hybridation *in situ* (19): environ 85 % de ces ARN codent pour des protéines de la famille NPT2, 15 % pour des protéines NPT1 et 0,5 % pour des protéines NPT3.

Le co-transporteur NPT1 est présent en surface du pôle apical des cellules du TCP. Il transporte le Pi ainsi que le chlore et certains acides organiques. Par ailleurs, NPT1 est aussi localisé au pôle apical des cellules du tubule contourné distal du rein et dans les hépatocytes. Il pourrait jouer un rôle dans l'élimination de toxiques en plus de son rôle de transport de Pi (20).

Le système de transport couplé Na-Pi NPT2 comporte 3 isoformes : NPT2a, b et c. Seuls NPT2a et c sont exprimés dans le rein. (NPT2b est essentiellement présent dans l'intestin, où il permet l'absorption digestive du Pi par les entérocytes, et dans le poumon (21)). Dans le rein, NPT2c est peu exprimé chez la souris adulte. La quantité de NPT2c synthétisée décroît avec l'âge de l'animal, contrairement à la quantité de NPT2a, ce transporteur devenant largement prépondérant dans la souris adulte (22). Ceci pose la question – encore à l'étude – du rôle de NPT2c au cours de la croissance. Dans le rein, NPT2a est localisé exclusivement dans le TCP où il est responsable de la quasi-totalité de la réabsorption du Pi. Ses caractéristiques sont détaillées dans le paragraphe suivant. Hormis cette localisation rénale, NPT2a est également retrouvé à la surface des ostéoclastes (23).

Les transporteurs NPT3 sont, eux, exprimés dans de multiples tissus, dont le rein. Ce système de transporteur est constitué des récepteurs viraux Glvr-1 (ou PiT-1) et Ram-1 (ou PiT-2). Dans le rein, NPT3 est localisé au pôle basolatéral des cellules du TCP et permettrait l'apport de Pi dans les cellules du TCP en cas d'apport insuffisant par voie luminale afin de garantir le métabolisme cellulaire (24).

Les principales caractéristiques de ces transporteurs sont résumées dans le tableau I.

	NPT1	NPT2a	NPT2b	NPT2c	NPT3
Chromosome	6	5	4	2	2 (PiT-1)
					8 (PiT-2)
Acides aminés	465	640	690	601	679, 656
Fonctions	Co-transport	Co-transport	Co-transport	Co-transport	Co-transport
	Na-Pi, canal	Na-Pi	Na-Pi	Na-Pi	Na-Pi
	Cl, transport				
	d'anions				
	organiques				
Localisation	Rein,	Rein,	Intestin,	Rein,	Ubiquitaires
	intestin, foie	ostéoclastes	poumon,	ostéoclastes	
			glandes		
			mammaires		

Tableau I: Principales caractéristiques des systèmes de co-transport NPT.

## 5-Caractéristiques de NPT2a

NPT2a a été cloné en 1993 (25) et correspond à une protéine de 80 à 90 kD. Le gène codant pour NPT2a est situé sur le chromosome 5q35 (26). La conformation tridimensionnelle de la protéine illustrée par la figure 3 est basée sur des analyses d'hydropathie et des expériences de mutagénèse dirigée. Selon ce modèle, NPT2a comporte 8 domaines transmembranaires et des extrémités N- et C-terminales intracellulaires. La 1<sup>ère</sup> boucle intra-cellulaire et la 3<sup>ème</sup> boucle extracellulaire semblent plus particulièrement impliquées dans la fonction de transport du Pi (27, 28). D'autre part, l'extrémité C-terminale comporte des motifs permettant à NPT2a d'interagir avec des protéines régulatrices comme NHERF (NHE-Regulatory Factor).



Figure 3 : Structure tridimensionnelle proposée pour la protéine NPT2a. Les 2 extrémités Net C-terminales sont intracellulaires. La protéine comporte 8 domaines transmembranaires. La 2<sup>ème</sup> boucle extracellulaire comporte 2 sites de glycosylation (ICL : boucle intracellulaire ; ECL : boucle extracellulaire).

L'obtention de souris « knock-out » pour NPT2a a confirmé le rôle crucial de ce transporteur, ces souris présentant une déperdition urinaire massive de Pi, non corrigée par l'apport alimentaire de Pi ou la diminution du taux de PTH (29).

Les propriétés fonctionnelles de ce transporteur ont principalement été établies par approche électrophysiologique après son expression fonctionnelle dans l'ovocyte de Xénope (30, 31). En situation de voltage imposé (« voltage-clamp » à 2 microélectrodes), l'addition de Pi dans le milieu extracellulaire induit un courant entrant du fait de l'électrogénicité du transporteur (influx de 3 ions Na<sup>+</sup> pour un ion  $PO_4^{2^-}$ , c'est-à-dire influx net d'une charge positive). Des analyses cinétiques montrent que le Km est de 0.1 mM pour le Pi et de 70 à 100 mM pour le sodium (30, 31). Ces valeurs de Km sont cohérentes avec les concentrations physiologiques de ces 2 ions dans la lumière du TCP. En effet, dans le TCP, la concentration des urines en sodium est beaucoup plus importante que la concentration en Pi. L'affinité de NPT2a pour ses substrats lui évite d'être saturé par l'abondance des ions sodium. Ces paramètres permettent donc un rendement optimal du transporteur et expliquent aussi que la régulation de la réabsorption de Pi par NPT2a se fasse plutôt par la modulation de l'expression membranaire de NPT2a en surface des cellules du TCP. Par ailleurs, les protons étant un substrat compétitif sur le site du Na<sup>+</sup>, le transport est activé par un pH extracellulaire élevé (32).

Le rein est le point de contrôle essentiel de l'homéostasie du Pi. La régulation de la réabsorption rénale de Pi se fait essentiellement par le contrôle de l'expression membranaire

de NPT2a en surface des cellules du TCP (14). Cette expression est essentiellement modulée par l'apport alimentaire de Pi, le taux de PTH (hormone parathyroidienne) et de FGF23 (Fibroblast Growth Factor 23) (33).

Les apports alimentaires en Pi modulent le taux de réabsorption du Pi filtré. Un régime pauvre en Pi, de façon aigue ou chronique, augmente la quantité de NPT2a exprimée à la membrane ainsi que son activité sans modifier le taux d'ARN codant pour NPT2a. Au contraire, en réponse à un régime riche en Pi, NPT2a est internalisé dans le compartiment lysosomial et son activité est diminuée. Cet effet des apports alimentaires en Pi est indépendant de l'hormone parathyroidienne.

Les 2 principaux facteurs circulants hyperphosphaturiques sont la PTH et le FGF23 : ces 2 hormones agissent en diminuant la réabsorption rénale de Pi par une réduction de l'expression de NPT2a dans les cellules du TCP.

Le mécanisme d'action de la PTH est bien documenté. La PTH réduit l'influx couplé de sodium et de Pi en stimulant l'internalisation de NPT2a et sa dégradation dans les lysosomes. Le récepteur à la PTH est localisé sur la membrane apicale et basolatérale des cellules du TCP. Il est couplé à une protéine kinase A et/ou C au niveau de la membrane basolatérale et à une protéine kinase C au niveau de la membrane apicale. Lorsque la PTH se lie à son récepteur, les kinases stimulent l'internalisation de NPT2a, probablement *via* la phosphorylation de protéines associées à NPT2a.

Le FGF23 est une molécule plus récemment décrite, impliquée dans des pathologies acquises ou génétiques liées à une fuite rénale de Pi, ainsi que nous le reverrons ultérieurement. Le FGF23 est surexprimé par les tumeurs associées à une ostéomalacie tumorale (34). L'ADHR (rachitisme hypophosphatémique autosomique dominant) est dû à une mutation du gène codant pour le FGF23 (35) : la protéine mutée est résistante au clivage protéolytique par certaines enzymes (36). Enfin, le FGF23 pourrait jouer un rôle au cours du XLH (rachitisme hypophosphatémique lié à l'X) : cette pathologie est due à la mutation du gène PHEX, appartenant à une classe de métalloprotéases, dont un des substrats possibles pourrait être le FGF23.

L'implication du FGF23 dans les hyperphosphaturies est confirmée par des données expérimentales. L'administration de FGF23 chez la souris entraine une phosphaturie (37) et diminue le niveau d'expression de NPT2a et de 1 $\alpha$ -hydroxylase, enzyme responsable de la synthèse de la vitamine D<sub>3</sub> (38). Il a également été montré que, dans des cultures de cellules rénales épithéliales, le FGF23 inhibait spécifiquement le transport de Pi dépendant du sodium (39).

L'action de ces principaux facteurs est résumée dans la figure 4.

En routine, le taux sérique de PTH est déterminé au cours de l'exploration des hypophosphatémies ainsi que des lithiases calciques. Ce taux est normalement compris entre 11 et 62 pg/ml. Le taux sérique de FGF23 n'est en revanche pas mesuré en première intention.



Figure 4 : Régulation du co-transport apical sodium-Pi et de la synthèse de vitamine  $D_3$  dans le tubule contourné proximal par l'apport alimentaire de Pi, la PTH et le FGF23. (40)

## 6-Fuites rénales de phosphate et lithiase urinaire

## 6.1-Mécanismes de formation des lithiases secondaires à une fuite rénale de phosphate

Une fuite rénale de Pi se définit par une hypophosphatémie liée à un déficit de réabsorption rénale du Pi. Cette hypophosphatémie est donc associée à une hyperphosphaturie. Un défaut de réabsorption rénale du Pi peut entraîner une déminéralisation osseuse et des lithiases rénales calciques. La déminéralisation osseuse est à type de rachitisme ou d'ostéomalacie ; elle peut être responsable d'un retard de croissance, de déformations et de douleurs osseuses et de fractures. Les lithiases calciques sont constituées d'oxalate de calcium et/ou de phosphate de calcium.

L'augmentation de la synthèse rénale de vitamine  $D_3$  en réponse à l'hypophosphatémie joue un rôle majeur dans le mécanisme de formation de lithiases au cours des fuites rénales de Pi. La vitamine D<sub>3</sub> est responsable, au niveau du tube digestif, d'une augmentation de l'absorption de calcium, ce qui entraîne une augmentation de l'élimination urinaire de calcium afin de maintenir une calcémie normale. Or, l'augmentation du produit calcium x Pi dans les fluides extracellulaires (normalement proche de 4.5 mmoles<sup>2</sup>/ $L^2$ ) est le principal facteur de risque de formation de calcifications extra-squelettiques comme, par exemple, les lithiases rénales. Le rôle prépondérant de la vitamine D<sub>3</sub> a été confirmé par Tenenhouse et al (41) au moyen de souris « knock-out » pour NPT2a et pour la 1α-hydroxylase. Les souris invalidées pour le gène codant pour NPT2a présentent une fuite urinaire massive de Pi, une augmentation de l'activité 1a-hydroxylase et du taux sérique de vitamine D<sub>3</sub>, une hypercalciurie et des calcifications rénales constituées d'apatite (29, 42). La réalisation d'une double invalidation pour le gène de NPT2a et celui de la  $1\alpha$ -hydroxylase montre une diminution de la calciurie et une diminution de 80 % du nombre de calcifications rénales. Les mêmes observations ont été faites avec des souris NPT2a<sup>-/-</sup> soumises à un régime riche en Pi. Cette étude suggère donc le rôle majeur de la vitamine D<sub>3</sub> dans le développement de l'hypercalciurie et des calcifications rénales au cours des fuites rénales de Pi.

Ces données sont par ailleurs confortées par l'observation de pathologies génétiques et acquises responsables d'une fuite rénale de Pi. En effet, l'hypophosphatémie entraine une augmentation du taux sérique de vitamine D<sub>3</sub> au cours d'une pathologie génétique associée à une fuite rénale de Pi appelée HHRH (rachitisme hypophosphatémique héréditaire avec hypercalciurie); or, cette pathologie est associée au développement de lithiases urinaires. Au (rachitisme contraire. les patients présentant des maladies comme l'ADHR hypophosphatémique autosomique dominant), le XLH (rachitisme hypophosphatémique lié à l'X ou "X-linked hypophophatemia") ou une ostéomalacie tumorale n'ont pas de lithiases et leur concentration sérique en vitamine D<sub>3</sub> est normale avec un taux sérique compris entre 15 et 42 pg/ml. L'exemple de ces maladies montre le rôle de la vitamine  $D_3$  dans l'apparition de lithiases rénales, comme cela sera détaillé dans le paragraphe 6.2. Cependant le taux de vitamine D<sub>3</sub> n'est pas le seul facteur de formation des lithiases, et l'analyse des facteurs de risque se révèle complexe.

L'étude menée par Prié et al en 2001 (8) a montré que, au sein d'une population de patients présentant des lithiases calciques et un taux sérique de PTH normal, ceux ayant une

diminution du TmPi présentaient des valeurs de calciurie significativement supérieures à celles des autres patients lithiasiques. Par ailleurs, cette même étude (8) ne montrait aucune différence significative du taux sérique de vitamine  $D_3$  entre les patients lithiasiques avec TmPi normal ou bas.

La première observation semble indiquer que l'hyperphosphaturie est également un facteur de risque pour la formation de lithiases calciques. Cette conclusion est confortée par une étude menée chez l'animal (43) : des rats hypercalciuriques, présentant des lithiases rénales calciques, ont été soumis à un régime pauvre en Pi. Ce régime a conduit à une baisse de la phosphaturie, une diminution de la saturation des urines et l'absence de formation de nouvelles lithiases et ce malgré l'augmentation de la calciurie. Les auteurs concluent que l'augmentation de la saturation urinaire peut suffire à elle seule dans la constitution de lithiases rénales.

D'autre part, l'absence de différence significative du taux sérique de vitamine  $D_3$  entre les patients pose le problème des stimulus conduisant à la synthèse de vitamine  $D_3$ . Ceci a conduit à suspecter des polymorphismes du gène codant pour le récepteur à la vitamine  $D_3$  et du gène de la 1 $\alpha$ -hydroxylase.

Cette même étude (8) souligne la complexité des troubles de réabsorption rénale de Pi en étudiant la distribution des valeurs de TmPi/DFG parmi une population de sujets témoins, non lithiasiques: cette distribution est gaussienne, comme chez les patients lithiasiques, soulignant la présence de phénotypes apparemment normaux malgré un TmPi bas.

#### 6.2-Origine des fuites rénales de phosphate

Une relation entre la fuite rénale de Pi et l'apparition de lithiases ou d'une déminéralisation osseuse a donc été rapportée au cours de pathologies génétiques ou acquises (8).

Comme cela a précédemment été souligné, trois principales maladies génétiques avec défaut de réabsorption rénale du Pi ont été décrites: le XLH, l'ADHR et le HHRH (44). Ces patients présentent tous une hypophosphatémie profonde et une fuite rénale de Pi. Cependant, selon le type de pathologie, les patients développent ou non des lithiases rénales. Dans le cadre du XLH, les patients ne présentent pas de lithiases rénales (mutation du gène PHEX ou Phosphate regulating gene with Homology to Endopeptidase and X-chromosome), tout comme les patients présentant un ADHR (mutation du gène codant pour le FGF23). Dans ces 2 pathologies, les patients ont une calcémie normale, une hypocalciurie et une diminution du taux de vitamine D<sub>3</sub>.

Au contraire, dans le cadre du HHRH, les patients développent des lithiases rénales. Ils présentent une hypercalcémie, une hypercalciurie et un taux sérique de vitamine  $D_3$  augmenté. Il est intéressant de noter que ces patients présentent les mêmes caractéristiques biochimiques que les souris NPT2a-/-. Toutefois, aucune mutation de NPT2a n'a pu être mise en évidence chez ces patients, tout comme chez les patients atteints de XLH ou d'ADHR.

Le défaut de réabsorption rénale de Pi peut aussi être d'origine acquise au cours de l'ostéomalacie « tumorale » (oncogenic hypophosphatemic osteomalacia (OHO) ou tumorinduced osteomalacia (TIO)). Une tumeur, le plus souvent mésenchymateuse, produit de grandes quantités de FGF23. Cette hyperproduction de FGF23 a pour effet de diminuer l'expression de NPT2a à la membrane des cellules du TCP et de diminuer la synthèse de  $1\alpha$ -hydroxylase, d'où une baisse du taux sérique de vitamine D<sub>3</sub>. Ces patients ne présentent pas de lithiases rénales.

Toutefois, dans la plupart des cas, les hypophosphatémies avec hyperphosphaturie demeurent idiopathiques.

#### 6.3-Implication de NPT2a

Une étude aboutie en 2002 (9) a été initiée par le Service de Physiologie et d'Explorations Fonctionnelles de l'Hôpital Bichat. Ce travail décrit pour la 1<sup>ère</sup> fois 2 cas symptomatiques d'hyperphosphaturie liée à une mutation de NPT2a chez l'Homme. Ces patients présentaient l'un une déminéralisation osseuse, l'autre des lithiases urinaires. Chacun était porteur d'une mutation hétérozygote du gène de NPT2a touchant l'extrémité N-terminale (A48F) ou le 2<sup>ème</sup> segment transmembranaire (V147M). Ces formes mutées ont été étudiées après expression dans l'ovocyte de Xénope. Des mesures de flux radiomarqués (influx de <sup>32</sup>P comme traceur du Pi) ainsi que des mesures de courant induit par le Pi (voltage-clamp) ont montré une diminution du transport par les NPT2a mutés ainsi qu'un effet dominant négatif de chacune de ces mutations sur le transporteur NPT2a sauvage. La conclusion de cette étude est que des lithiases urinaires ainsi que des déminéralisations osseuses peuvent être dues à des mutations hétérozygotes de NPT2a.

## 7- Justification de l'étude

Deux nouvelles mutations de NPT2a ont été identifiées chez des patients de sexe masculin présentant tous deux des lithiases urinaires sans déminéralisation osseuse. Ces patients ont un tableau de fuite urinaire de Pi avec hypophosphatémie et baisse du taux de réabsorption rénale du Pi. L'hypercalciurie est modeste, la calcémie normale, ainsi que le taux de vitamine D<sub>3</sub>. Un seul des 2 patients présente une valeur de PTH élevée. Les valeurs biologiques des principaux dosages plasmatiques et urinaires sont indiquées dans le tableau II.

	normes	Patient 1	Patient 2
Taux de calcium ionisé (mM)	1.15 - 1.25	1.22	1.19
Phosphatémie (mM)	0.9 - 1.4	0.65	0.45
TmPi/DFG (mM)	0.75 - 1.44	0.48	0.31
Calciurie des 24 h (mmol/j)	2 - 5	5.5	7.3
PTH (pg/ml)	11 - 62	14	100
250H-vitamine D <sub>2</sub> (ng/ml)	5 - 37	15	3.3
1,250H-vitamine D <sub>3</sub> (pg/ml)	15 - 42	40	35

Tableau II : Bilan phosphocalcique des patients présentant les nouvelles mutations de NPT2a. (TmPi/DFG : taux de réabsorption rénale du Pi normalisé par rapport au débit de filtration glomérulaire ou DFG)

Devant le tableau de fuite rénale de Pi observée chez ces 2 patients, des mutations de NPT2a ont été recherchées. Les 13 exons du gène codant pour NPT2a ont été amplifiés puis séquencés. Cette étude a permis d'identifier une mutation de NPT2a chez chacun des patients étudiés (figure 5). Chez le patient 1, la mutation (P75S) est un remplacement de la proline en position 75 par une sérine au niveau de l'extrémité N-terminale de la protéine. Chez le patient 2, l'alanine en position 133 est remplacée par une valine dans la 1<sup>ère</sup> boucle extracellulaire (A133V).



Figure 5 : Localisation des 2 nouvelles mutations de NPT2a identifiées chez les patients présentant une fuite rénale de Pi.

Les 2 acides aminés cibles de ces mutations sont très conservés au cours de l'évolution (homme, souris, rat, lapin, opossum) (45), laissant penser que ces mutations pourraient avoir des conséquences fonctionnelles. Cette hypothèse a fait l'objet de notre travail expérimental.

## **OBJECTIF DU TRAVAIL EXPERIMENTAL**

Le but de ce travail est la caractérisation fonctionnelle des formes mutées de NPT2a par rapport à la forme sauvage. L'ovocyte de Xénope a été choisi comme système d'expression hétérologue de ces protéines. La caractérisation fonctionnelle a été faite par approche électrophysiologique (technique de voltage-clamp à 2 microélectrodes) :

- Nous avons mesuré dans des ovocytes exprimant NPT2a sauvage ou muté le courant induit par une même concentration de Pi (1 mM) extracellulaire.
- 2) Nous avons recherché un effet dominant négatif de ces mutations.

## PARTIE EXPERIMENTALE

#### **MATERIELS ET METHODES**

#### 1-Animal d'expérience

Les *Xenopus laevis* adultes femelles sont fournis par le centre d'élevage du CNRS de Montpellier. Ils sont maintenus dans une animalerie (Faculté Necker), agréée par les Services Vétérinaires de la Préfecture de Police de Paris, dans des aquariums munis de pompes filtrantes. Ils sont nourris 2 fois par semaine par du cœur de bœuf ou des vers de vases (Grébil).

#### 2-Préparation des ovocytes

Le Xénope (*Xenopus laevis*) est anesthésié par immersion dans une solution à 0,05 % d'acide éthyl-3-aminobenzoïque méthane sulfonate (Sigma, Steinheim, Allemagne) associée à de la glace. Une incision est ensuite réalisée en région latéro-abdominale, permettant de prélever des lobules ovariens. L'incision est suturée plan par plan avec du fil résorbable (Ethicon). L'animal est réveillé par rinçage prolongé à l'eau courante, et surveillé quelques heures dans le laboratoire avant d'être replacé à l'animalerie. Un délai minimal de 4 à 6 semaines est respecté avant un nouveau prélèvement sur le même animal.

Les lobules ovariens prélevés sont placés pendant 90 min dans une solution de Ringer adaptée à l'amphibien mais dépourvu de calcium (NaCl 88 mM, NaHCO<sub>3</sub> 2,4 mM, KCl 1 mM, MgSO<sub>4</sub> 0,82 mM, TrisHCl 5 mM, à pH = 7,5) et supplémenté par de la collagénase IA, 1 mg pour 100 ml (Sigma, Steinheim, Allemagne). L'ensemble est ensuite agité de façon douce afin de compléter la défolliculation des ovocytes. Les ovocytes sont triés sous loupe binoculaire afin de ne conserver que les ovocytes de stade V et VI de taille supérieure à 1mm et correctement défolliculés. Ces ovocytes sont caractérisés par une pigmentation particulière séparant la cellule en 2 hémisphères : blanchâtre ou jaune pâle pour l'hémisphère végétal, brun ou noir pour l'hémisphère animal.

Ces ovocytes sont placés dans une solution de Ringer avec calcium (NaCl 88 mM, NaHCO<sub>3</sub> 2,4 mM, KCl 1 mM, MgSO<sub>4</sub> 0,82 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,41 mM, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 0,33 mM, TrisHCl 5 mM, à pH = 7,5) et supplémentée en antibiotiques (pénicilline et streptomycine Sigma, Steinheim,

Allemagne, à une dilution de 1%) puis incubés à 18°C. Le mauvais maintien en survie des ovocytes à un stade quelconque de la préparation se traduit très rapidement par une dépigmentation de l'hémisphère animal, suivie de l'expulsion de matériel cytosolique ; ces ovocytes sont exclus avant toute autre manipulation.

## **3-Préparation des ARN**

L'ADN complémentaire (ADNc) a été obtenu par insertion du gène codant pour NPT2a sauvage dans un plasmide (pSP64) comportant également les extrémités 3' et 5' UTR (Untranslated Regions) du gène de la  $\beta$  globine de Xénope, nécessaire à la stabilisation des ARN dans l'ovocyte. Le gène NPT2a a été inséré entre les sites de restriction XhoI et NotI. Les formes de NPT2a mutés ont été synthétisées par mutagénèse dirigée à partir de la forme sauvage. Les plasmides ont été linéarisés à l'aide de l'enzyme Xba I.

Les ARN sont obtenus par transcription in vitro à l'aide du kit mMESSAGE mMACHINE high yield capped RNA transcription kit (Ambion, Austin, USA) utilisant la SP6 polymérase. Ce kit permet la production d'ARN cappés par la 7 méthyl-guanosine, ce qui permet la stabilisation des ARN et évite leur dégradation dans l'ovocyte. Un  $\mu$ g d'ADNc a été mélangé à 10  $\mu$ L de ribonucléotides 2X NTP/CAP, 2  $\mu$ L de tampon de réaction 10X puis 2  $\mu$ L d'enzyme RNA polymérase. La réaction de transcription s'est faite à 37°C pendant 2 h. Un  $\mu$ L de DNAse I a ensuite été ajouté et incubé 15 min à 37°C.

Les ARN sont purifiés avec le kit MEGAclear (Ambion, Austin, USA). La précipitation des ARN est réalisée avec l'acétate d'ammonium et l'éthanol.

La concentration des ARN est ensuite estimée par mesure de la densité optique à 260 nm. La qualité des ARN est également vérifiée par migration sur gel d'agarose à 1%.

#### 4-Injection des ARN dans les ovocytes

Les ARN sont injectés dans le cytoplasme des ovocytes au moyen de micropipettes de verre Drummond Microcaps (Drummond Scientific Company, Broomall, USA). Ces pipettes sont étirées par une étireuse verticale Narishige PE-2 (Narishige Company, Tokyo, Japon). La pointe de chaque pipette est ensuite cassée sous l'objectif (muni d'un réticule) d'un microscope pour obtenir un diamètre de la pointe compris entre 10 et 15  $\mu$ m. Le corps de la pipette est alors gradué par un trait par mm, 1mm correspondant à un volume de 100 nL.

La solution d'ARN est dans un premier temps aspirée par cette micropipette reliée à un microinjecteur (Inject + Matix) sous loupe binoculaire. Les ARN sont ensuite injectés dans une série d'ovocytes. Le volume injecté dans chaque ovocyte est de 50 nL, la concentration en ARN étant la seule variable. Des ovocytes contrôles sont injectés avec 50 nL d'eau "DNAse RNAse free" (Sigma, Steinheim, Allemagne ). Les ovocytes sont placés dans une nouvelle solution de Ringer avec antibiotiques et incubés à 18°C.

Les ovocytes contrôles sont injectés avec 50 nL d'eau.

## 5-Etude électrophysiologique

Les tests fonctionnels sont réalisés 3 jours (J3) et 4 jours (J4) après les injections (J0) par la technique de voltage-clamp à 2 microélectrodes.

Le principe est le suivant. L'ovocyte est empalé par 2 microélectrodes. L'une injecte un courant pour imposer une valeur de potentiel transmembranaire choisi par l'expérimentateur, tandis que l'autre mesure ce courant. En cas d'activation d'un transporteur électrogène, une variation de courant sera détectée par la  $2^{eme}$  microélectrode : elle correspond au courant supplémentaire (ou à la diminution de courant) nécessaire pour maintenir le potentiel à la valeur imposée. La mesure de variation de courant est plus sensible qu'une simple mesure de variation de potentiel transmembranaire qui serait réalisée en circuit ouvert (mesure de la ddp avec une seule microélectrode) puisque – comme l'indique la loi d'Ohm, V = RI – celle ci peut être faible si la résistance, R, de la membrane l'est aussi. Dans nos expériences, la différence de potentiel (ddp) transmembranaire, ou Vc, est imposée à -50mV. Le courant induit par la perfusion d'une solution supplémentée par 1 mM de Pi est mesuré : il correspond à l'activation du transporteur électrogène NPT2a, qui entraîne l'influx de 3 ions Na<sup>+</sup> pour 1 PO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, d'où un flux net de charges positives entrant dans la cellule (courant entrant, c.a.d. négatif selon les conventions).



Figure 6 : Schéma de l'appareillage d'électrophysiologie : les 2 microélectrodes (1) qui empalent l'ovocyte sont reliées à l'amplificateur (2), lui-même connecté à l'enregistreur (3) ; le boîtier de commande (4) permet de contrôler le système de perfusion (5).

Concrètement, l'ovocyte est placé dans une chambrette où il est maintenu en place par un système d'aspiration, relié à une pompe à vide (figure 6). Un système de perfusion contrôlé à distance (électrovannes) permet de modifier la composition du bain dans lequel se trouve l'ovocyte. Le débit de perfusion et d'aspiration sont identiques. Le bain est totalement changé en moins d'1 seconde. Dans ce travail, les ovocytes ont ainsi été perfusés par une solution de Ringer adaptée à l'amphibien en alternance avec une solution de Pi 1 mM.

Les microélectrodes introduites dans l'ovocyte sont formées de tubes de verre borosilicate munis d'une fibre interne (Clark Electromedical Instruments) dont le diamètre externe est de 2 mm, étirés par l'étireuse Narishige. Elles sont ensuite remplies de KCl 3 M et connectées à des électrodes Ag/AgCl, elles mêmes reliées à un amplificateur Axoclamp 2A (Axon instrument). Leur résistance est voisine de 5 mégohms. Les différents paramètres (ddp transmembranaire en circuit ouvert, puis Vc et courant) sont enregistrés par un enregistreur Arc-En-Ciel (Sefram, Servofram, France).

## **6-Etude statistique**

Les résultats sont présentés en moyenne  $\pm$  SEM, avec n = nombre d'ovocytes provenant de 2 à 4 expériences indépendantes. L'étude statistique a été réalisée à l'aide du logiciel "Sigma Plot". La significativité a été déterminée au moyen de tests de t (à 2 queues) non pairés. Les différences étaient significatives lorsque p < 0,05.

## RESULTATS

Nous avons observé une diminution significative de l'intensité du courant induit par le Pi dans les ovocytes exprimant les formes mutées de NPT2a par rapport à la forme sauvage (WT ou wild type) comme le montre la figure 7.



Figure 7 : Courant induit par une solution de Pi (1mM) dans des ovocytes injectés avec 10 ng d'ARN NPT2a WT, A133V ou P75S. A : Courant induit par une solution de Pi 1mM dans des ovocytes injectés avec 10 ng d'ARN WT ou muté, en technique de voltage clamp (Vc = -50mV). **B** : Valeurs moyennes des courants induits par le Pi (1 mM) dans les ovocytes exprimant NPT2a WT ou muté. \*Significativement différent de I mesuré dans les ovocytes injectés par 10ng d'ARN WT (p < 0.01). Les résultats sont normalisés par rapport à la moyenne  $I_{max}$  des courants enregistrés dans les ovocytes injectés par 10 ng d'ARN NPT2a WT (moyenne  $\pm$  SE). n = 8 - 12.

Nous avons ensuite établi des courbes doses/réponses en fonction de la concentration des ARN injectés dans chaque ovocyte afin de déterminer à partir de quelle concentration apparaissait une saturation du courant induit par 1 mM de Pi. Cette étape était nécessaire avant d'entreprendre les expériences de co-injection des ARN WT et mutés. Les résultats sont présentés dans la figure 8 après normalisation par rapport au courant moyen  $I_{max}$  induit dans les ovocytes injectés par l'ARN WT.



Figure 8 : Courant induit par une solution de Pi (1mM) dans des ovocytes injectés avec des doses croissantes d'ARN NPT2a WT ou A133V. \*Significativement différent (p<0.005). Les résultats sont normalisés par rapport à la moyenne  $I_{max}$  des courants enregistrés dans les ovocytes injectés par 40 ng d'ARN NPT2a WT (moyenne  $\pm$  SE). n = 4 - 14.

Nous avons observé une augmentation du courant pour des concentrations croissantes d'ARN injectés jusqu'à un plateau obtenu pour une concentration de 20 ng dans le cas de NPT2a WT, ce qui confirme les résultats publiés (9). Ce plateau était aussi atteint à la concentration de 20 ng d'ARN dans le cas de NPT2a A133V ; il est à noter cependant que les ovocytes injectés avec 30 et 40 ng d'ARN A133V étaient souvent non viables ou difficilement analysables (mauvaise qualité du clamp). Dans le cas de NPT2a P75S, le courant restait indétectable quelle que soit la concentration des ARN (résultats non présentés).

Les 2 patients présentant une mutation de NPT2a à l'état hétérozygote, nous avons ensuite recherché s'il existait un effet dominant négatif de chacune des mutations. Pour cela, nous avons co-injectés des ovocytes avec des ARN WT et mutants. Nous avons comparé les valeurs des courants induits dans ces ovocytes avec le courant dans des ovocytes injectés par des ARN WT seuls. Les résultats sont illustrés dans la figure 9.



Figure 9 : Courant induit par une solution de Pi (1mM) dans des ovocytes injectés avec des ARN NPT2a WT seuls ou associés à des ARN NPT2a mutés ; 1- WT 20ng ; 2- WT 10ng ; 3-A133V 10ng ; 4-A133V 10ng + WT 10ng ; 5-P75S 10ng ; 6-P75S 10ng + WT 10ng (moyenne  $\pm$  SE). \*Significativement différent (p<0.001). n = 29 - 54.

La co-injection de 10 ng d'ARN WT et 10ng d'ARN muté induit un courant significativement inférieur à celui enregistré dans les ovocytes injectés par 10 ng d'ARN WT seul. Ce courant est égal en moyenne à  $-26 \pm 9$  nA dans les ovocytes co-injectés avec les ARN WT et P75S et à  $-29 \pm 15$  nA dans ceux co-injectés avec les ARN WT et A133V, tandis que le courant moyen dans les ovocytes injectés avec 10 ng d'ARN WT est de  $-43 \pm 15$  nA. Le courant induit dans ces ovocytes co-injectés (10 ng d'ARN WT + 10 ng d'ARN mutés) est aussi significativement inférieur au courant mesuré dans les ovocytes injectés par 20 ng d'ARN WT (p < 0.001).

Par ailleurs, le courant induit dans les ovocytes injectés par 20 ng d'ARN WT est significativement supérieur à celui observé dans les ovocytes injectés par 10 ng d'ARN WT,

ce qui permet de s'assurer qu'il n'y a pas d'effet de saturation du courant pour des doses injectées d'ARN comprises entre 10 et 20 ng.

Ces résultats montrent donc qu'il existe un effet dominant négatif des 2 formes mutées de NPT2a. Ceci suggère qu'un tel effet participe au retentissement clinique de mutations de NPT2a chez des patients hétérozygotes pour cette mutation.

#### DISCUSSION

Au cours de ce travail, nous avons montré que les 2 nouvelles mutations humaines de NPT2a identifiées, A133V et P75S, sont associées à un déficit de fonction du transporteur. Le courant induit par le Pi dans les ovocytes exprimant NPT2a muté est significativement diminué par rapport à la forme WT. Il existe par ailleurs un effet dominant négatif de ces mutations. Ces observations pourraient être compatibles avec le phénotype clinique et biologique des patients, tous 2 hétérozygotes pour NPT2a muté. Les résultats de l'étude de ces 2 mutations confirment et étendent les résultats de l'étude menée en 2002 (9) montrant un retentissement fonctionnel de 2 autres mutations de NPT2a, A48F et V147M.

On observe de plus une relation entre le degré de la perte fonctionnelle (appréciée après expression hétérologue dans l'ovocyte) et l'importance de la diminution du TmPi/DFG (évaluée chez les patients) pour ces 2 mutations. Ainsi, chez le patient 1, la mutation A133V est responsable d'une diminution du courant induit par le Pi de 57 % dans les ovocytes injectés avec 10 ng d'ARN. Chez ce même patient, le TmPi/DFG initial était de 0.48 mM. La mutation P75S mise en évidence chez le patient 2 est responsable d'une abolition quasi-totale du courant induit dans les ovocytes exprimant cette forme mutée. Le TmPi/DFG initialement calculé chez ce patient était de 0.31 mM, indiquant une fuite rénale de Pi plus importante que chez le patient 1. Toutefois, il n'existe pas de différence significative entre le courant induit dans les ovocytes par des ARN WT et A133V et ceux injectés avec des ARN WT et P75S, alors que les patients sont hétérozygotes, ce qui confirme – si besoin était – que l'étude fonctionnelle *in vitro* de transporteurs mutés ne peut rendre un compte strict de la complexité des régulations fonctionnelles dans l'organisme humain.

On peut noter que la relation entre le déficit fonctionnel des protéines NPT2a mutées après expression dans l'ovocyte et la baisse de TmPi mesurée chez les patients porteurs des mutations, avait déjà été rapportée dans l'étude initiale, portant sur 2 autres types de mutations de NPT2a (9) : dans cette étude de 2002, la mutation A48F était associée à une diminution plus importante du courant induit par le Pi dans les ovocytes et le patient chez qui cette mutation avait été découverte avait un TmPi/DFG égal à 0.47 mM. Chez le 2<sup>ème</sup> patient, qui présentait une mutation V147M, la diminution du courant dans l'ovocyte était moins marquée et la baisse du TmPi/DFG était aussi moins marquée (0.58 mM).

On peut par ailleurs remarquer que les souris hétérozygotes NPT2a<sup>+/-</sup> ne présentent ni anomalies biologiques ni calcifications rénales (par contre observées chez les souris homozygotes NPT2a<sup>-/-</sup>). Ces observations sur l'animal hétérozygote paraissent donc ne pas

reproduire les observations trouvées chez les 2 patients hétérozygotes sur lesquels porte la présente étude. Ceci s'explique par plusieurs raisons. Chez les patients, ce sont des mutations de NPT2a qui ont été identifiées, alors que les études sur l'animal ont été faites à partir de l'invalidation du gène npt2a. D'autre part, les inhibiteurs de cristallisation des urines sont présents en quantité beaucoup plus importante chez la souris que chez l'homme : cette protection contre la formation de lithiases urinaires est probablement lié à une adaptation d'espèce : l'osmolarité urinaire est en effet bien plus élevée chez la souris (5000 mOsm/kg H<sub>2</sub>O chez la souris contre 1200 chez l'homme). Cet exemple illustre quelques uns des problèmes posés par la comparaison entre modèles animaux et pathologies humaines, et souligne l'importance d'étudier en parallèle, lorsque cela est possible, la symptomatologie et la biologie des patients, et explorer les relations structure/fonction des produits de leur gène mutés.

La localisation des 4 mutations de NPT2a identifiées à ce jour chez des patients est indiquée dans la figure 9. Ces 4 mutations, toutes identifiées chez des patients suivis pour des lithiases rénales ou une déminéralisation osseuse, sont situées dans la même région, entre l'extrémité N-terminale et le 2<sup>ème</sup> segment transmembranaire. Ceci pose la question du rôle de cette région de NPT2a dans le transport du sodium et du Pi, en plus de la 1<sup>ère</sup> boucle intracellulaire et de la 3<sup>ème</sup> boucle extracellulaire, comme cela avait été préalablement proposé (27, 28).



Figure 10 : Localisation des 4 mutations de NPT2a identifiées chez l'homme, associées à des lithiases rénales ou une déminéralisation osseuse, responsables d'une perte de fonction du transporteur (extrémité N-terminale : mutations A48F et P75S ; 1<sup>ère</sup> boucle extra-cellulaire : A133V ; 2<sup>ème</sup> segment transmembranaire : V147M).

Ces 4 mutations ont par ailleurs un effet dominant négatif après expression hétérologue. Ceci suggère que cet effet participe à la fuite de Pi observée chez les patients, alors qu'ils sont hétérozygotes pour les mutations. Au plan de la structure du transporteur inséré dans la membrane, l'effet dominant négatif pourrait s'expliquer par la nécessité d'une dimérisation, voire d'une oligomérisation, pour l'activation de NPT2a. Ainsi, les dimères NPT2a WT-muté adressés à la membrane seraient non ou peu fonctionnels, d'où la diminution du courant induit par le Pi dans les ovocytes co-injectés avec NPT2a WT et muté. Alternativement, de tels dimères pourraient également être retenus au niveau d'organelles intracellulaires, et la perte fonctionnelle serait liée à une faible expression membranaire.

La question de la prévalence de mutations de NPT2a dans la pathologie lithiasique ne peut être abordées à partir des 4 mutations de NPT2a rapportées à ce jour. En effet, dans l'étude initiale publiée en 2002 (9), 18 patients sur les 20 présentant une fuite rénale de Pi idiopathique n'avaient aucune mutation de NPT2a identifiable dans les régions explorées du gène (exons et une partie du promoteur). Dans la présente étude, les 2 patients ont été sélectionnés en raison de l'importance de la fuite urinaire de Pi, qui en faisait des bons candidats pour une mutation de NPT2a. Il est très probable que les fuites rénales de Pi ont une origine complexe, sans doute multifactorielle, et que seuls de rares cas sont liés à des mutations de NPT2a. On peut cependant souligner que des mutations de ce co-transporteur pourraient être impliquées dans des déminéralisations pathologiques, puisque l'un des 2 patients de l'étude menée en 2002 présentait, outre la fuite urinaire de Pi, une déminéralisation osseuse mais pas de lithiase urinaire (9). De plus, cette observation renforce la notion d'un continuum physiopathologique entre lithiases rénales et déminéralisation osseuse.

Ce patient était une femme âgée de 64 ans. Sa fille a pu être explorée : elle présentait une déformation vertébrale et des antécédents de fractures du bras et une fuite rénale de Pi a également été diagnostiquée chez elle ; la même mutation de NPT2a que celle de sa mère a été identifiée lors du séquençage. Les 3 autres patients porteurs de mutations de NPT2a et dont la fuite rénale de Pi se manifestait par des lithiases urinaires sont de sexe masculin (une enquête familiale n'a pour l'instant pas pu être réalisée chez les proches des 2 patients dont les observations sont rapportées dans ce travail). Bien que le nombre de patients soit beaucoup trop faible pour indiquer un sexe-ratio, la question du rôle des hormones sexuelles pourrait être intéressante à évoquer, compte tenu du fait que l'on observe une prédominance masculine parmi l'ensemble des patients présentant des lithiases calciques (3). Des études ont

ainsi porté sur le rôle des oestrogènes notamment chez le rat et chez l'homme dans la constitution de lithiases rénales (3, 46), concluant à un possible rôle protecteur des oestrogènes (diminution de la concentration urinaire en calcium et oxalate).

Un autre facteur pouvant intervenir dans la constitution des lithiases serait la vitamine  $D_3$ . D'une part, le taux de vitamine  $D_3$  est plus ou moins augmenté en réponse à une hypophosphatémie selon les individus. D'autre part, la réponse à la vitamine  $D_3$  serait également différente d'un patient à l'autre, ce qui a conduit à poser la question de polymorphismes du récepteur à la vitamine  $D_3$ . Ainsi, on pourrait supposer que la réponse à une fuite rénale de Pi puisse être de 2 types.

Dans le 1<sup>er</sup> cas, l'hypophosphatémie entraînerait une importante augmentation de synthèse de vitamine  $D_3$ , ce qui augmenterait l'absorption digestive de calcium et secondairement la calciurie. Ces patients développeraient donc des lithiases rénales calciques. Dans le 2<sup>ème</sup> cas, la synthèse de vitamine  $D_3$  serait peu ou pas augmentée. Le maintien de la phosphatémie serait assuré grâce à la libération de Pi à partir du stock osseux. Ces patients développeraient ainsi une déminéralisation osseuse. Ainsi, selon le type de réponse à la fuite rénale de Pi, un « choix » serait fait entre la protection du parenchyme rénal ou celle du tissu osseux.

Il est intéressant de souligner qu'aucun des patients dont NPT2a était muté n'a présenté de troubles de la croissance. On peut donc supposer que, pendant la croissance de ces patients, leur bilan phospho-calcique était équilibré et que la perte de fonction de NPT2a était alors compensée par un autre mécanisme. Chez la souris, le rôle de NPT2c a été mis en avant au cours de la croissance, son expression diminuant progressivement jusqu'à l'âge adulte (22). Un tel rôle de NPT2c n'est pas documenté chez l'homme.

## SYNTHESE ET PERSPECTIVES

Les lithiases urinaires calciques sont un problème majeur de santé publique et environ 20 % d'entre elles sont associées à un défaut de réabsorption rénale de Pi. Récemment, le lien a pu être fait entre des mutations hétérozygotes du co-transporteur NPT2a chez l'homme et une fuite rénale de Pi (9). Cette étude a ainsi montré pour la 1<sup>ère</sup> fois un rôle direct de mutations de NPT2a dans des pathologies humaines. Notre travail expérimental confirme ces données par l'étude de 2 nouvelles mutations humaines de NPT2a. En effet, il existe un lien entre le phénotype clinique et biologique des patients étudiés et la perte de fonction des formes mutées de NPT2a après expression dans l'ovocyte de Xénope. Cette étude confirme le rôle de mutations de ce co-transporteur à l'état hétérozygote dans la formation de certaines lithiases rénales chez l'homme, donc leur origine génétique.

Sur l'ensemble de ces données, il est justifié, lors du bilan de lithiases rénales avec hypercalciurie, de rechercher si cette hypercalciurie est primitive ou secondaire à une hypophosphatémie. Dans le cas d'une hypophosphatémie, l'opportunité d'un séquençage du gène npt2a pourrait se discuter. Comme l'étude menée en 2002 (9) montrait également le lien entre mutations de NPT2a, fuite rénale de Pi et déminéralisation osseuse, la question de recherche de mutations est également posée. Cependant, cette dernière pathologie semble complexe et multifactorielle et fait intervenir, entre autre, les hormones sexuelles (oestrogènes et androgènes) et la notion de « sensibilité » à la vitamine D<sub>3</sub> qui pourrait être liée à des polymorphismes du récepteur à la vitamine D<sub>3</sub> dans le développement de fuites rénales de Pi.

D'une façon plus générale se pose la question de l'intérêt d'un « dépistage » des mutations de NPT2a puisqu'il a été observé chez de nombreux patients asymptomatiques une diminution du taux de réabsorption rénale de Pi (8). Ceci ne semble envisageable que dans le cadre d'une méta-analyse à long terme de l'ensemble des facteurs de risque lithiasiques.

Par contre, il paraît licite de proposer de prolonger notre étude par une enquête familiale à la recherche de mutations de NPT2a parmi les sujets apparentés aux 2 patients. Cette enquête présenterait d'autant plus d'intérêt qu'un traitement peut être proposé aux patients présentant une fuite rénale de Pi responsable d'une hypophosphatémie. Le traitement de base des fuites rénales de Pi consiste en une supplémentation en Pi et/ou en vitamine D. Ce traitement est parfois insuffisant pour compenser la fuite de Pi et peut de plus induire la formation de nouvelles lithiases urinaires.

Le dipyridamole est principalement utilisé comme antiagrégant plaquettaire et vasodilatateur ; il diminue également l'élimination urinaire du Pi chez l'homme et le rat (47). Le mode d'action de ce médicament est encore mal connu. Il agit d'une part en inhibant la recapture de l'adénosine présente dans la lumière par les cellules du TCP (48). L'adénosine est issue de la dégradation de l'AMPc urinaire par des phosphodiestérases et des 5'-nucléotidases. L'AMPc et l'AMP ne sont pas perméants à travers la membrane cellulaire et donc ne peuvent entrer dans les cellules contrairement à l'adénosine. La diminution de l'entrée d'adénosine dans ces cellules serait responsable d'une diminution du taux intracellulaire d'AMPc directement ou *via* des récepteurs membranaires à l'adénosine. D'autre part, le dipyridamole inhibe le fonctionnement de la glycoprotéine P MDR (Multi-Drug Resistance) qui pourrait elle-même inhiber NPT2a dans le TCP (49).

Concernant la partie expérimentale de ce travail, il est important d'en souligner la principale limite dans l'interprétation du mécanisme du déficit de transport de Pi par les protéines NPT mutées. En effet, l'injection d'une concentration donnée d'ARN NPT2a dans l'ovocyte ne permet pas de présager de la quantité de protéine exprimée à la membrane. Cette donnée doit être particulièrement prise en compte dans le cas des expériences de co-injections d'ARN WT et muté. Il n'est alors pas possible de déterminer si l'effet dominant négatif observé en électrophysiologie est dû à une faible expression à la membrane de NPT2a, par exemple en cas de rétention de la protéine au niveau d'organelles intracellulaires, ou si la forme mutée forme un dimère avec la forme sauvage correctement exprimé à la membrane mais dont l'activité de transport est réduite.

Par la suite, il sera donc nécessaire d'affiner cette étude par des co-injections d'ARN WT et muté comportant tous deux un « tag » permettant ensuite, en isolant la fraction membranaire des ovocytes injectés, de quantifier l'expression à la membrane de chacune des 2 formes de NPT2a. Ceci pourrait être réalisé par des expériences de western blot après biotinylation des ovocytes, la biotine se liant fortement à la partie extracellulaire des protéines membranaires. Le tag, par exemple un motif de 5 résidus histidine, permet ensuite de marquer la fraction protéique d'intérêt au moyen d'un anticorps dirigé contre lui. Une autre approche de l'estimation de l'expression membranaire serait de réaliser une étude cinétique (détermination de V<sub>max</sub> et K<sub>m</sub> par mesure du courant induit par des concentrations croissantes de Pi) dans des ovocytes exprimant la forme sauvage et/ou mutée de NPT2a. Cette approche pourrait être complétée par des études sur les cellules du TCP dans lesquelles NPT2a est normalement

exprimé à la membrane apicale : en effet, des protéines régulatrices telles que NHERF1 pourrait intervenir dans le routage de NPT2a.

En conclusion, les résultats de notre étude expérimentale sont en accord avec le phénotype des patients étudiés. Ces données confirment, plusieurs années après l'identification moléculaire et la caractérisation fonctionnelle de NPT2a, les liens entre mutations humaines de NPT2a et fuites rénales de Pi, ainsi que l'intérêt de la collaboration entre chercheurs et cliniciens.

## REFERENCES

- Ramello A, Vitale C, Marangella M. *Epidemiology of nephrolithiasis*. J Nephrol 2000:13 Suppl 3: S45-50
- 2. Trinchieri A. *Epidemiology of urolithiasis*. Arch Ital Urol Androl 1996:68: 203-249
- 3. Fan J, Chandhoke PS, Grampsas SA. *Role of sex hormones in experimental calcium oxalate nephrolithiasis.* J Am Soc Nephrol 1999:10 Suppl 14: S376-380
- 4. Resnick M, Pridgen DB, Goodman HO. *Genetic predisposition to formation of calcium oxalate renal calculi*. N Engl J Med 1968:278: 1313-1318
- 5. Pridgen DB, Resnick M, Goodman HO, Boyce WH. *Inheritance of calcium renal stones*. Lancet 1968:1: 537-538
- Ljunghall S, Danielson BG, Fellstrom B, Holmgren K, Johansson G, Wikstrom B.
  *Family history of renal stones in recurrent stone patients*. Br J Urol 1985:57: 370-374
- Coe FL, Parks JH, Moore ES. *Familial idiopathic hypercalciuria*. N Engl J Med 1979:300: 337-340
- 8. Prie D, Ravery V, Boccon-Gibod L, Friedlander G. *Frequency of renal phosphate leak among patients with calcium nephrolithiasis*. Kidney Int 2001:60: 272-276
- 9. Prie D, Huart V, Bakouh N, Planelles G, Dellis O, Gerard B, et al. *Nephrolithiasis and osteoporosis associated with hypophosphatemia caused by mutations in the type 2a sodium-phosphate cotransporter*. N Engl J Med 2002:347: 983-991
- 10. Pak CY. Pathophysiology of calcium nephrolothiasis. *The kidney: Physiology and pathophysiology, 2<sup>nd</sup> edition.* Seldin DW, Giebisch G. New York: Raven Press. 1992
- 11. Low RK, Stoller ML. Endoscopic mapping of renal papillae for randall's plaques in patients with urinary stone disease. J Urol 1997:158: 2062-2064
- 12. Evan AP, Lingeman JE, Coe FL, Parks JH, Bledsoe SB, Shao Y, et al. *Randall's* plaque of patients with nephrolithiasis begins in basement membranes of thin loops of henle. J Clin Invest 2003:111: 607-616
- Bushinsky DA. Nephrolithiasis: Site of the initial solid phase. J Clin Invest 2003:111: 602-605
- 14. Tenenhouse HS. *Regulation of phosphorus homeostasis by the typ IIa Na/phosphate cotransporter*. Annu Rev Nutr 2005:25: 197-214

- Prie D, Beck L, Friedlander G, Silve C. Sodium-phosphate cotransporters, nephrolithiasis and bone demineralization. Curr Opin Nephrol Hypertens 2004:13: 675-681
- 16. Walton RJ, Bijvoet OL. *Nomogram for derivation of renal threshold phosphate concentration*. Lancet 1975:2: 309-310
- Hediger MA, Romero MF, Peng JB, Rolfs A, Takanaga H, Bruford EA. *The ABCs of solute carriers: Physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins introduction*. Pflugers Arch 2004:447: 465-468
- Murer H, Forster I, Biber J. *The sodium phosphate cotransporter family SLC34*.
  Pflugers Arch 2004:447: 763-767
- Tenenhouse HS, Roy S, Martel J, Gauthier C. Differential expression, abundance, and regulation of Na<sup>+</sup>-phosphate cotransporter genes in murine kidney. Am J Physiol 1998:275: F527-534
- 20. Jutabha P, Kanai Y, Hosoyamada M, Chairoungdua A, Kim do K, Iribe Y, et al. *Identification of a novel voltage-driven organic anion transporter present at apical membrane of renal proximal tubule.* J Biol Chem 2003:278: 27930-27938
- 21. Hilfiker H, Kvietikova II, Hartmann CM, Stange G, Murer H. *Characterization of the human type II Na/Pi-cotransporter promoter*. Pflugers Arch 1998:436: 591-598
- 22. Segawa H, Kaneko I, Takahashi A, Kuwahata M, Ito M, Ohkido I, et al. *Growthrelated renal type II Na/Pi cotransporter*. J Biol Chem 2002:277: 19665-19672
- 23. Gupta A, Tenenhouse HS, Hoag HM, Wang D, Khadeer MA, Namba N, et al. Identification of the typeII Na<sup>+</sup>-Pi cotransporter (npt2) in the osteoclast and the skeletal phenotype of npt2-/- mice. Bone 2001:29: 467-476
- Collins JF, Bai L, Ghishan FK. The SLC20 family of proteins: Dual functions as sodium-phosphate cotransporters and viral receptors. Pflugers Arch 2004:447: 647-652
- 25. Magagnin S, Werner A, Markovich D, Sorribas V, Stange G, Biber J, et al. *Expression* cloning of human and rat renal cortex Na/Pi cotransport. Proc Natl Acad Sci U S A 1993:90: 5979-5983
- 26. Kos CH, Tihy F, Econs MJ, Murer H, Lemieux N, Tenenhouse HS. *Localization of a renal sodium-phosphate cotransporter gene to human chromosome 5q35*. Genomics 1994:19: 176-177

- 27. Kohler K, Forster IC, Stange G, Biber J, Murer H. Identification of functionally important sites in the first intracellular loop of the napi-IIa cotransporter. Am J Physiol Renal Physiol 2002:282: F687-696
- 28. Lambert G, Forster IC, Stange G, Kohler K, Biber J, Murer H. *Cysteine mutagenesis* reveals novel structure-function features within the predicted third extracellular loop of the type IIa Na+/Pi cotransporter. J Gen Physiol 2001:117: 533-546
- 29. Beck L, Karaplis AC, Amizuka N, Hewson AS, Ozawa H, Tenenhouse HS. *Targeted inactivation of npt2 in mice leads to severe renal phosphate wasting, hypercalciuria, and skeletal abnormalities.* Proc Natl Acad Sci U S A 1998:95: 5372-5377
- Busch A, Waldegger S, Herzer T, Biber J, Markovich D, Hayes G, et al.
  Electrophysiological analysis of na+/pi cotransport mediated by a transporter cloned from rat kidney and expressed in xenopus oocytes. Proc Natl Acad Sci U S A 1994:91: 8205-8208
- 31. Forster I, Hernando N, Biber J, Murer H. *The voltage dependence of a cloned* mammalian renal type II Na<sup>+</sup>/Pi cotransporter (napi-2). J Gen Physiol 1998:112: 1-18
- 32. Murer H, Hernando N, Forster I, Biber J. *Regulation of Na/Pi transporter in the proximal tubule*. Annu Rev Physiol 2003:65: 531-542
- 33. Saito H, Kusano K, Kinosaki M, Ito H, Hirata M, Segawa H, et al. *Human fibroblast* growth factor-23 mutants suppress Na<sup>+</sup>-dependent phosphate co-transport activity and 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 production. J Biol Chem 2003:278: 2206-2211
- 34. De Beur SM, Finnegan RB, Vassiliadis J, Cook B, Barberio D, Estes S, et al. *Tumors* associated with oncogenic osteomalacia express genes important in bone and mineral metabolism. J Bone Miner Res 2002:17: 1102-1110
- 35. Autosomal dominant hypophosphataemic rickets is associated with mutations in *FGF23*. Nat Genet 2000:26: 345-348
- White KE, Carn G, Lorenz-Depiereux B, Benet-Pages A, Strom TM, Econs MJ.
  Autosomal-dominant hypophosphatemic rickets (ADHR) mutations stabilize FGF-23.
  Kidney Int 2001:60: 2079-2086
- 37. Shimada T, Mizutani S, Muto T, Yoneya T, Hino R, Takeda S, et al. Cloning and characterization of FGF23 as a causative factor of tumor-induced osteomalacia. Proc Natl Acad Sci U S A 2001:98: 6500-6505
- 38. Shimada T, Kakitani M, Yamazaki Y, Hasegawa H, Takeuchi Y, Fujita T, et al. Targeted ablation of FGF23 demonstrates an essential physiological role of FGF23 in phosphate and vitamin D metabolism. J Clin Invest 2004:113: 561-568

- 39. Bowe AE, Finnegan R, Jan de Beur SM, Cho J, Levine MA, Kumar R, et al. Fgf-23 inhibits renal tubular phosphate transport and is a phex substrate. Biochem Biophys Res Commun 2001:284: 977-981
- 40. Kronenberg HM. *Npt2a--the key to phosphate homeostasis*. N Engl J Med 2002:347: 1022-1024
- 41. Tenenhouse HS, Gauthier C, Chau H, St-Arnaud R. *1alpha-hydroxylase gene ablation and Pi supplementation inhibit renal calcification in mice homozygous for the disrupted npt2a gene*. Am J Physiol Renal Physiol 2004:286: F675-681
- 42. Chau H, El-Maadawy S, McKee MD, Tenenhouse HS. *Renal calcification in mice homozygous for the disrupted type IIa Na/Pi cotransporter gene npt2*. J Bone Miner Res 2003:18: 644-657
- Bushinsky DA, Parker WR, Asplin JR. Calcium phosphate supersaturation regulates stone formation in genetic hypercalciuric stone-forming rats. Kidney Int 2000:57: 550-560
- 44. Brame LA, White KE, Econs MJ. *Renal phosphate wasting disorders: Clinical features and pathogenesis*. Semin Nephrol 2004:24: 39-47
- 45. Werner A, Kinne RK. *Evolution of the Na-Pi cotransport systems*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2001:280: R301-312
- 46. Heller HJ, Sakhaee K, Moe OW, Pak CY. *Etiological role of estrogen status in renal stone formation*. J Urol 2002:168: 1923-1927
- 47. Prie D, Blanchet FB, Essig M, Jourdain JP, Friedlander G. *Dipyridamole decreases* renal phosphate leak and augments serum phosphorus in patients with low renal phosphate threshold. J Am Soc Nephrol 1998:9: 1264-1269
- 48. Friedlander G, Couette S, Coureau C, Amiel C. Mechanisms whereby extracellular adenosine 3',5'-monophosphate inhibits phosphate transport in cultured opossum kidney cells and in rat kidney. Physiological implication. J Clin Invest 1992:90: 848-858
- 49. Prie D, Couette S, Fernandes I, Silve C, Friedlander G. *P-glycoprotein inhibitors stimulate renal phosphate reabsorption in rats*. Kidney Int 2001:60: 1069-1076

## ANNEXE

## Histoire clinique des patients étudiés

## 7.1-Patient 1

Le patient 1 est un homme âgé de 67 ans sans antécédent familial.

Il a des antécédents d'hypertension artérielle, d'hyperuricémie et d'hypercholestérolémie. Il n'a pas présenté de troubles de la croissance dans l'enfance.

Il est traité par Aprovel<sup>R</sup>, Zyloric<sup>R</sup> et Lipanthyl<sup>R</sup>.

Il a présenté des coliques néphrétiques récidivantes depuis 20 ans dues à des calculs d'oxalate et de phosphate de calcium. Une fuite rénale de Pi a été diagnostiquée en 2002 suite à des explorations fonctionnelles. Les principales données biologiques figurent dans le tableau III. Le taux de FGF23 sérique était normal.

	normes		Après charge en calcium
Taux de calcium ionisé (mM)	1.15 - 1.25	1.22	1.26
Phosphatémie (mM)	0.9 - 1.4	0.65	
TmPi/DFG (mM)	0.75 - 1.44	0.48	0.53
Calciurie des 24 h (mmol/j)	2 - 5	5.5	
PTH (pg/ml)	11 - 62	14	7
25OH-vitamine D <sub>2</sub> (ng/ml)	5 - 37	15	
1,250H-vitamine D <sub>3</sub> (pg/ml)	15 - 42	40	

Tableau III : Bilan phosphocalcique du patient 1. (TmPi/DFG : taux de réabsorption rénaledu Pi normalisé par rapport au débit de filtration glomérulaire ou DFG)

Ce patient présentant un tableau de fuite urinaire de Pi, avec hypophosphatémie et baisse du taux de réabsorption rénale du Pi (TmPi), un traitement par Persantine a été instauré en janvier 2002.

Un nouveau bilan réalisé à distance de l'instauration de ce traitement a montré une amélioration des données biologiques avec une phosphatémie de 0.84 mM. Le TmPi/DFG était peu amélioré, égal à 0.58 mM, du fait de l'absence de prise médicamenteuse le jour de

l'examen. Les bilans suivants ont montré le maintien d'une phosphatémie dans les limites de la normale sous Persantine<sup>R</sup>. Ce patient n'a pas présenté de nouvelles crises de coliques néphrétiques.

## 7.2-Patient 2

Le patient 2 est un homme âgé de 55 ans. Ce patient a un antécédent familial de néphrectomie pour lithiases rénales chez sa mère. Il n'a pas présenté de troubles de la croissance dans l'enfance.

Il a présenté des coliques néphrétiques depuis 1995 dues à des calculs d'oxalate et de phosphate de calcium. Un bilan biologique plasmatique et urinaire a été réalisé dès 1996 permettant de mettre en évidence une fuite rénale de Pi. Les principales données biologiques figurent dans le tableau IV. Le taux de FGF23 sérique était normal.

Par ailleurs, une densitométrie osseuse a également été réalisée et ne montrait pas de déminéralisation osseuse.

	normes		Après charge en calcium
Taux de calcium ionisé (mM)	1.15 - 1.25	1.19	1.23
Phosphatémie (mM)	0.9 - 1.4	0.45	
TmPi/DFG (mM)	0.75 - 1.44	0.31	0.39
Calciurie des 24 h (mmol/j)	2 - 5	7.3	
PTH (pg/ml)	11 - 62	100	30
25OH-vitamine D <sub>2</sub> (ng/ml)	5 - 37	3.3	
1,250H-vitamine D <sub>3</sub> (pg/ml)	15 - 42	35	

Tableau IV : Bilan phosphocalcique du patient 2.

Il est à noter que ce patient présentait initialement un taux de PTH très élevé et des taux de 25 OH-vitamine  $D_2$  et de 1,25 OH-vitamine  $D_3$  normaux mais non cohérents avec une calcémie diminuée. Ces résultats ont été interprétés comme une diminution du stock de 25 OHvitamine  $D_2$ , consécutive à la fuite rénale persistante de Pi ; le taux de PTH aurait ainsi augmenté secondairement pour maintenir une calcémie normale. Devant ce tableau d'hyperparathyroidie secondaire et de baisse des réserves en vitamine  $D_3$ , une supplémentation en calcium et en vitamine  $D_3$  a été instaurée. Ce traitement a permis de corriger l'hyperparathyroidie: le bilan biologique au terme de ce traitement montrait un taux de PTH égal à 55 pg/ml, de 25OH-vitamine  $D_2$  égal à 24.7 ng/ml et de 1,25OH-vitamine  $D_3$ de 106 pg/ml. On notait également une persistance de l'hypophosphatémie (0.60 mM) et d'un taux de réabsorption rénale de Pi abaissé (0.49).

Devant cette fuite rénale de Pi confirmée, un traitement par Persantine<sup>R</sup> a été introduit, sans effet toutefois sur la phosphatémie après 6 mois de traitement (phosphatémie égale à 0.58 mM).

**Titre de Thèse :** Mutations du transporteur rénal sodium/phosphate NPT2a associées à des lithiases rénales chez l'Homme.

#### RESUME

Le co-transporteur sodium-phosphate NPT2a joue un rôle majeur dans la réabsorption rénale du phosphate (Pi). Deux mutations de NPT2a viennent d'être identifiées à l'état hétérozygote chez 2 patients présentant des lithiases rénales avec hyperphosphaturie. Nous avons caractérisé fonctionnellement ces mutations après expression hétérologue et étude électrophysiologique.

Le courant (I) induit par le Pi est significativement inférieur dans les ovocytes exprimant le transporteur NPT2a muté que NPT2a sauvage, suggérant un déficit de fonction des NPT2a mutés. D'autre part, I est diminué dans les ovocytes coexprimant NPT2a muté et sauvage par rapport aux ovocytes exprimant NPT2a sauvage seul, montrant un effet dominant négatif des mutations.

Les conséquences fonctionnelles de ces mutations de NPT2a peuvent rendre compte du phénotype des patients et confirment le rôle de mutations de NPT2a dans la formation de certaines lithiases rénales chez l'Homme, donc leur origine génétique.

## MOTS-CLEFS

Ovocyte de Xénope, co-transporteur sodium-phosphate, lithiase, hypophosphatémie, voltageclamp,