

Université de Montréal

Vers le gène de la lithiase calcique familiale

Par:

Patrick Scott

Département de médecine  
Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Philosophiæ Doctor (Ph.D.)  
en sciences biomédicales

Juillet 2000

©Patrick Scott, 2000



W  
4  
US8  
2001  
v. 046

Department of Justice

Office of the Inspector General

Page 2

Department of Justice  
Office of the Inspector General

The Inspector General is pleased to announce the release of this report. The report is available on the OIG website at [www.oig-jdo.gov](http://www.oig-jdo.gov). For more information, please contact the OIG at (202) 252-0800.

Inspector General



Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

Vers le gène de la lithiase calcique familiale

présentée par:

Patrick Scott

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Daniel Bichet, président du jury

Alain Bonnardeaux, directeur de recherche

Denise Arsenault, membre du jury

Kenneth Morgan, examinateur externe

Marie Trudel, représentante du doyen

Thèse acceptée le: .....

## Sommaire

Le caractère familial de la lithiase rénale calcique est depuis longtemps suspecté. Par contre, les gènes de susceptibilité n'ont pas encore été identifiés. L'objectif à long terme du laboratoire est donc de caractériser les variations génétiques qui influencent la susceptibilité à la lithiase calcique familiale et à son plus important facteur de risque, l'hypercalciurie idiopathique.

Plusieurs évidences suggèrent que les anomalies héréditaires de métabolisme du calcium peuvent contribuer à la formation des lithiases, incluant la fréquence élevée de lithiases de calcium et d'hypercalciurie dans les parents de premier degré de patients lithiasiques, l'expression phénotypique similaire d'hypercalciurie absorptive dans plusieurs membres d'une même famille et l'accouplement sélectif de rats hypercalciuriques augmente l'ampleur et la fréquence de l'hypercalciurie parmi la descendance.

Dans cette thèse, l'hypothèse que des variations génétiques à des locus associés au métabolisme du calcium cause une augmentation de son excrétion urinaire et, par conséquent, la néphrolithiase calcique, a été testée. Ces locus incluent les gènes qui codent pour la  $1\alpha$ -hydroxylase rénale; le récepteur de la vitamine D et le récepteur sensible au calcium.

Des familles lithiasiques canadiennes-françaises ont été recrutées à partir de proposants rencontrés à des cliniques spécialisées dans le traitement des lithiases rénales. Le diagnostic a été confirmé par l'analyse chimique du calcul, lorsque disponible, et/ou par les évidences radiologiques. Une évaluation métabolique standard a été effectuée afin de déterminer la présence des facteurs de risques urinaires associés à la lithiase calcique, en particulier l'hypercalciurie idiopathique. La taille importante de l'échantillon, de même que son homogénéité génétique, devraient faciliter l'identification des variations génétiques responsables de ces traits.

L'analyse de liaison non-paramétrique des paires de germains est particulièrement adaptée à l'étude des traits complexes puisqu'elle ne requiert aucune connaissance *a priori* du mode de transmission, largement indéfini pour les traits lithiasique et hypercalciurique.

L'analyse des paires de germains a démontré un excès significatif de partage d'allèles avec un marqueur près du récepteur de la vitamine D (D12S339,  $P=0.01$ ), de même qu'avec des marqueurs adjacents (D12S1663:  $P=0.03$  et D12S368:  $P=0.01$ ). De plus, l'analyse de liaison de la calciurie a démontrée une liaison à certains marqueurs. Au meilleur de notre connaissance, cette étude fut la première à suggérer une liaison à la formation de lithiases calciques rénales d'un locus génétique.

Les analyses de liaison aux locus de la  $1\alpha$ -hydroxylase et du récepteur sensible au calcium se sont avérées négatives. Le locus de  $1\alpha$ -hydroxylase a été exclu avec un  $\lambda_s$  de 2 alors que le locus du récepteur sensible au calcium a été exclu avec un  $\lambda_s$  de 1.5. Ces résultats suggèrent que les variants de ces gènes menant à la néphrolithiase calcique doivent être rares dans notre population ou influencent de façon minime la susceptibilité au trait lithiasique.

Les résultats préliminaires du criblage du génome, bien qu'ils n'aient pas confirmé la liaison au locus du récepteur de la vitamine D, suggèrent plusieurs régions chromosomiques potentiellement intéressantes. Ces données devront être confirmées par l'étude d'un second groupe d'individus. Ces études devraient permettre l'identification des gènes de susceptibilité à la lithiase calcique et de l'hypercalciurie, nécessaire à une meilleure compréhension des événements pathogéniques de ces désordres.

## Table des matières

<i>Sommaire</i>	<i>iii</i>
<i>Liste des tableaux</i>	<i>vii</i>
<i>Liste des figures</i>	<i>viii</i>
<i>Remerciements</i>	<i>ix</i>
<b>1 Analyse de liaison génétique : cas de la lithiase rénale calcique</b>	<b>1</b>
<b>2 Généralités sur les lithiases urinaires</b>	<b>2</b>
<b>3 Étiologie de la lithiase calcique</b>	<b>5</b>
3.1 Facteurs environnementaux	5
3.2 Facteurs héréditaires	6
3.3 Mode de transmission	9
<b>4 Régulation hormonale de l'excrétion urinaire du calcium</b>	<b>10</b>
4.1 Mécanismes d'action de la vitamine D	11
4.2 Mécanismes d'action de la PTH	11
<b>5 Hypercalciurie idiopathique</b>	<b>13</b>
5.1 Études familiales	13
5.2 Mode de transmission	14
5.3 Classification et diagnostique de l'hypercalciurie	14
5.4 Vitamine D et hypercalciurie	16
5.5 Modèle animal : le rat lithiasique hypercalciurique	16
<b>6 Méthodes d'analyse en épidémiologie génétique</b>	<b>18</b>
6.1 L'approche criblage du génome versus gènes candidats	18
6.2 Analyse de liaison	18
6.2.1 Étude d'association basée sur la population	20
6.2.2 Étude d'association familiale	20
6.2.3 Étude de liaison paramétrique	21
6.2.4 Étude de liaison non-paramétrique	22
<b>7 Familles lithiasiques</b>	<b>25</b>
7.1 Le recrutement	25
7.2 Évaluation des participants	26
<b>8 Évaluation de gènes candidats de la lithiase calcique</b>	<b>29</b>
8.1 La 1 $\alpha$ -hydroxylase	29
8.2 Le récepteur de la vitamine D	58
8.3 Le récepteur sensible au calcium	84
<b>9 Discussion</b>	<b>103</b>
9.1 Sommaire des résultats	103
9.2 Vers le gène de la lithiase calcique : Rôle du récepteur de la vitamine D	104
9.3 Puissance de l'étude	106
9.4 Étude du trait lithiasique: problèmes et solutions	107
9.4.1 Stratification basée sur les données cliniques	108
9.4.2 Étude de populations isolées	109
9.5 Autres gènes candidats	110
9.5.1 Métabolisme du calcium	110
9.5.2 Inhibiteurs de la cristallisation	111
9.6 Criblage du génome	114
<b>10 Conclusions</b>	<b>118</b>
<b>11 Références</b>	<b>119</b>

<b>12</b>	<b><i>Appendices</i></b>	<b><i>134</i></b>
12.1	Appendice 1 : Questionnaire, évaluation des participants	134
12.2	Appendice 2 : Rôle des inhibiteurs de la cristallisation	136

**Liste des tableaux**

<i>Tableau 1. Types et fréquence des lithiases</i>	3
<i>Tableau 2. Inhibiteurs urinaires</i>	4
<i>Tableau 3. Épidémiologie génétique du trait lithiasique</i>	7
<i>Tableau 4. Critères diagnostiques de l'hypercalciurie idiopathique</i>	15
<i>Tableau 5 Nombre d'individus atteints par fratrie concordants pour le trait lithiasique</i>	26
<i>Tableau 6. Bilan métabolique</i>	27
<i>Tableau 7. Analyses pairées des phénotypes urinaires chez les germains</i>	28
<i>Tableau 8. Critères diagnostiques pour le criblage du génome</i>	114



**Liste des figures**

<i>Figure 1. Régulation hormonale de l'homéostasie du calcium</i>	10
<i>Figure 2. Carte génétique de marqueurs sur le chromosome 22</i>	19
<i>Figure 3. Test de transmission du déséquilibre de liaison</i>	21
<i>Figure 4. Exemple de pedigree montrant une évidence de liaison génétique</i>	22
<i>Figure 5. Analyse d'un trait quantitatif</i>	23
<i>Figure 6. Criblage du génome</i>	115

## Remerciements

Je tiens à remercier sincèrement mon directeur scientifique, le Dr Alain Bonnardeaux, de m'avoir permis d'entreprendre ce stage de doctorat dans son laboratoire. Le Dr Bonnardeaux m'a initié à la démarche scientifique en m'apportant la profondeur et la rigueur essentielles à cette démarche. De plus, ses grandes connaissances, sa vaste expérience et son sens critique aiguisé ont grandement aidé à la réalisation de ce travail.

Un merci tout spécial à Marie-Lucie Trouvé, infirmière de recherche. C'est grâce à son exceptionnel travail de recrutement que ce projet a pu se réaliser. Je tiens également à remercier Sophie Ouellet et Yanick Proulx pour leurs assistances techniques. Je ne pourrais passer sous silence les nombreuses discussions animées avec mes collègues étudiants Robert Mio et Martin Pettruci.

Ce travail n'aurait pu se réaliser sans la contribution exceptionnelle des Drs Denis Ouimet, Gérald Guay, Luc Valiquette et Bernard Gagnon, respectivement de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont, de l'Hôpital Hôtel-Dieu de Québec, de l'Hôpital St-Luc et de l'Hôpital de St-Hyacinthe. Ce sont eux qui ont permis le recrutement des familles lithiasiques.

Je réserve un merci tout spécial à mes parents, Gonzague et Ginette, ainsi qu'à mes soeurs, Isabelle et Véronique. Ils m'ont toujours épaulé et encouragé à poursuivre des études universitaires. Leur soutien a été pour moi un atout déterminant dans la réussite de mes objectifs.

## **1 Analyse de liaison génétique : cas de la lithiase rénale calcique**

L'analyse de liaison génétique est un puissant outil qui permet l'identification d'un ou des gènes contrôlant l'expression phénotypique d'un trait. Bien qu'il existe certaines variantes, le processus de cartographie est constitué de quelques étapes successives et applicables aux traits monogéniques et polygéniques. La première étape consiste à définir le phénotype d'intérêt. Cette définition formera la base des critères de sélection permettant la distinction entre les individus atteints et non atteints. La seconde étape consiste à démontrer que l'étiologie du trait est explicable, du moins en partie, par la présence d'une composante héréditaire. La présence d'une composante héréditaire est démontrée par les études de jumeaux, de ségrégation et d'adoption. Lorsque ces deux étapes auront été complétées, le recrutement des familles chez lesquelles se transmet le trait d'intérêt pourra débuter. Le génotypage des individus et l'analyse statistique complètent cette démarche. Lorsque les évidences statistiques sont suffisamment importantes, les techniques de la biologie moléculaire permettent le clonage du gène morbide et la caractérisation de ses variations. Les recherches ultérieures essaient de comprendre la fonction du gène.

L'intérêt de l'analyse de liaison génétique en médecine réside dans la caractérisation des événements moléculaires de pathologies humaines. Elle a permis le clonage d'une multitude de gènes de maladies à transmission simple. Le défi réside maintenant dans la caractérisation des traits dits complexes, beaucoup plus fréquents dans la population générale. Cette complexité provient de l'interaction entre des facteurs génétiques et environnementaux, mais aussi par la présence d'hétérogénéité génétique et de polygénie. Cette thèse s'intéresse à la cartographie des gènes de susceptibilité d'un tel trait, la lithiase rénale calcique, un désordre défini par la formation de concrétions au niveau de l'appareil urinaire.

## 2 Généralités sur les lithiases urinaires

Les lithiases rénales, un des désordres les plus communs du système urinaire, ont affecté l'humanité depuis la nuit des temps. Des évidences archéologiques suggèrent la présence de lithiases rénales chez une momie égyptienne âgée de plus de 7000 ans. De nos jours, la lithiase rénale affecte entre 5 et 10 % de la population nord-américaine et constitue la cause d'environ 1 % des hospitalisations<sup>1</sup>. Le coût total annuel pour les lithiases rénales aux États-Unis (évaluation, hospitalisation, traitement et honoraires) a été estimé à \$2 milliards en 1995<sup>2</sup>. Les urolithiases ont une incidence d'environ 12 % chez les hommes et 5 % chez les femmes avant l'âge de 70 ans. L'âge d'apparition du trait se situe entre 20 et 50 ans et ce, chez les deux sexes<sup>3,4</sup>. Ainsi, les individus atteints le sont durant les années les plus productives de leurs vies. Le taux de récurrence est particulièrement élevé, le risque de faire un second épisode sur une période de 10 ans est de 50 %<sup>5</sup>. Le passage d'un calcul rénal cause une grande détresse chez le patient et est parmi les désordres humains les plus douloureux. La colique néphrétique se manifeste par une douleur soudaine et sévère, localisée dans le flanc, irradiant dans le bas de l'abdomen et souvent associée avec de l'hématurie<sup>1</sup>. Les symptômes incluent une augmentation de la fréquence urinaire, dysurie, nausée et vomissements.

La formation d'une lithiase est possible lorsque la concentration des sels lithogènes dépasse leurs solubilités, ce qui entraînera la formation de cristaux. Si ces cristaux demeurent suffisamment petits, ils seront excrétés de façon normale et n'auront pas de conséquence clinique. Dans le cas contraire, la croissance et l'agrégation des cristaux entraîneront la formation de lithiases. Les principales conséquences cliniques des urolithiases sont l'obstruction de l'appareil urinaire, l'hématurie et une prédisposition aux infections. Les calculs rénaux peuvent contenir différentes combinaisons de sels. La fréquence des urolithiases selon la composition est

indiquée dans le tableau 1<sup>6,7</sup>. Dans la majorité des cas, les calculs sont à base de calcium.

**Tableau 1. Types et fréquence des lithiases**

Type	Fréquence (%)
Calcium	70-88
Oxalate de calcium	36-70
Phosphate de calcium	6-20
Mixte	11-31
Struvite	6-20
Acide urique	6-17
Cystine	0.5-3
Autres	1-4

La formation des calculs commence par la germination de cristaux (cristallogenèse) et se poursuit avec l'agrégation et une phase de croissance<sup>8,9</sup>. Cette dernière est favorisée par la rétention de cristaux dans le néphron, probablement par des interactions avec les cellules épithéliales<sup>10</sup>. La germination est la conséquence d'un déséquilibre entre promoteurs et inhibiteurs de la cristallisation. Les premiers sont représentés par toutes les substances susceptibles, isolément ou en association, de cristalliser dans les urines: calcium, oxalate, phosphate... Les seconds sont des ions de faible poids moléculaire (citrate, magnésium) ou des macromolécules polyanioniques appartenant à plusieurs familles chimiques, principalement les glycosaminoglycanses (héparane sulfate) et les protéines (tableau 3)<sup>11-13</sup>. Les effets des inhibiteurs organiques ont été les plus étudiés<sup>12,14-17</sup>. Les macromolécules protéiques urinaires ont toutes démontré la capacité d'inhiber l'une ou l'ensemble des étapes de la cristallisation de l'oxalate de calcium in vitro<sup>12</sup>.

**Tableau 2. Inhibiteurs urinaires**

---

Inorganiques
Citrate
Magnésium
Pyrophosphate
Organiques
Bikunine
Lithostatine
Néphrocalcine
Protéine de Tamm-Horsfall (uromoduline)
Prothrombine
Uropontine

---

### 3 Étiologie de la lithiase calcique

#### 3.1 Facteurs environnementaux

Le rôle possible des facteurs environnementaux influençant l'étiologie de la lithiase a été évalué par de nombreuses études épidémiologiques. La distribution géographique des individus atteints, de même que la composition chimique du calcul et le site rénal de formation coïncide avec les conditions socio-économiques<sup>18</sup>. L'incidence de la lithiase est en progression, particulièrement dans les pays industrialisés<sup>19,20</sup>. Les lithiases vésicales sont assez répandues en Asie et dans les pays en voie de développement, avec des calculs composés d'urate d'ammonium et d'oxalate de calcium. La calculose composée principalement de calcium en association avec l'oxalate et le phosphate est actuellement plus fréquente dans des pays économiquement développés. Cette distinction est généralement expliquée par les différentes habitudes alimentaires<sup>20</sup>. L'étude de l'incidence saisonnière d'épisodes lithiasiques a montré que le taux de passage de lithiase par mois était 50 % plus élevé en été qu'en hiver<sup>21</sup>.

L'influence des habitudes alimentaires sur le risque lithiasique a été évaluée prospectivement à partir d'une cohorte de 45,619 hommes, âgés de 40 à 75 ans, et sans histoire de lithiase rénale<sup>22</sup>. Une association entre la formation de lithiase et la consommation de calcium, de potassium, de protéines animales et de fluides a été démontrée. L'incidence de la lithiase rénale durant le suivi était moindre chez les individus ayant un apport élevé de calcium (1326mg, 5<sup>ième</sup> quintile) par rapport à ceux ayant un apport moins élevé (516mg, 1<sup>er</sup> quintile). Les auteurs suggèrent que cette observation reflète la chélation de l'oxalate par le calcium dans l'intestin, diminuant ainsi l'absorption intestinale et l'excrétion urinaire de l'oxalate. La consommation de protéines animales était directement associée avec le risque de formation de la lithiase, probablement le résultat d'une augmentation de la charge

acide<sup>23</sup>, alors que les apports de potassium et de fluides étaient inversement associés<sup>22</sup>

### 3.2. Facteurs héréditaires

Documenter l'agrégation familiale est une étape essentielle avant d'entreprendre l'analyse de liaison génétique. L'étude des membres d'une famille, principalement les frères et sœurs mais aussi cousins/cousines et parents/enfants, constitue la base de la démonstration du caractère familial d'un trait. Pour ce qui est de la lithiase calcique idiopathique, l'agrégation familiale est depuis longtemps suspectée. Les premières évidences d'une composante génétique dans la formation des lithiases nous proviennent des travaux de McGeown qui, en examinant les parents, les frères et sœurs et les descendants de multiples patients avec des calculs contenant du calcium, a observé une fréquence plus élevée de lithiases chez les parents et les enfants des proposants que dans une population contrôle<sup>24</sup>. La seconde grande étude fut celle de Resnick et collaborateurs<sup>25</sup>. Ils ont observé, comme McGeown, un nombre plus grand d'individus lithiasiques chez les parents et les enfants des proposants que dans une population contrôle. La conclusion que les facteurs héréditaires jouent un rôle important dans la prédisposition à la lithiase rénale est aussi supportée par Ljundhall<sup>26</sup>. Abondant dans le même sens, Trinchieri et collaborateurs<sup>27</sup> ont observé une fréquence plus élevée de lithiases parmi les parents de premier degré des individus atteints que parmi les parents d'un groupe contrôle de même âge et de même sexe. Plus récemment, Curhan *et al.* ont évalué si l'augmentation du risque était attribuable aux facteurs génétiques, l'exposition aux facteurs environnementaux ou une combinaison des deux<sup>28</sup>. Même après ajustement pour les facteurs environnementaux, le risque relatif de formation d'une lithiase chez les hommes avec une histoire familiale positive, en comparaison avec ceux sans histoire familiale était de 2,57 (intervalle de confiance 95%, 2,19 à 3,02). Collectivement, ces résultats suggèrent que l'histoire familiale positive augmente significativement le risque à la formation de lithiases.



L'évaluation de l'agrégation familiale d'un trait peut également s'effectuer par le calcul du ratio de la proportion de parents du proposant manifestant le trait et de la prévalence du trait dans la population générale<sup>29</sup>. La majorité des études s'intéresse au calcul du  $\lambda_s$  (lambda s, s pour sibs), le risque associé aux germains du proposant. Généralement, plus la valeur de  $\lambda$  est élevée, plus la contribution présumée des facteurs génétiques est importante. Il doit être noté, cependant, que plus la prévalence d'un trait est élevée, ce qui est généralement le cas pour les traits complexes, plus la valeur du  $\lambda$  diminuera. Pour le trait lithiasique<sup>24-26,30</sup> (tableau 3), le  $\lambda_s$  varie entre 2,5 et 4, une valeur plus importante que celle de l'hypertension essentielle et le diabète de type II (2), mais plus petite que le diabète de type I (15).

**Tableau 3. Épidémiologie génétique du trait lithiasique**

	$\lambda_s$	$\lambda_f$
McGeown (1960)	4.0	15.5
Resnick (1968)	2.9	3.7
Ljundhall (1979)	2.7	2.6
Robertson (1983)	2.5	< 2.0

f: familial

La méthode classique pour distinguer l'importance relative entre les facteurs génétiques et environnementaux dans les maladies héréditaires consiste en l'étude de jumeaux et d'adoption. La comparaison des taux de concordance entre les jumeaux mono et dizygotes permet l'appréciation de l'influence des facteurs génétiques dans l'étiologie d'un désordre<sup>31</sup>. Les jumeaux monozygotes sont génétiquement identiques alors que les jumeaux dizygotes ont en commun 50% de leurs génomes. Si les facteurs génétiques sont importants, le taux de concordance chez les jumeaux monozygotes sera plus élevé que les jumeaux dizygotes. Les études d'adoption comparent la prévalence de la maladie chez les parents biologiques (parents, frères, sœurs...) avec celle des parents des individus adoptés vivant dans le même environnement. En présence d'une prédisposition génétique, la prévalence devrait

être plus élevée chez les parents biologiques. Malheureusement, les résultats des études de jumeaux et d'adoption ne sont pas encore disponibles.

L'étude des conjoints/conjointes d'individus atteints permet de différencier entre la contribution des facteurs génétiques et la contribution des facteurs environnementaux. Dans l'éventualité où les facteurs environnementaux seraient la principale cause des lithiases, la fréquence des épisodes devrait être similaire chez ces deux groupes d'individus. Marya *et al.*<sup>32</sup> ont comparé la fréquence d'épisodes lithiasiques dans des familles d'individus atteints avec celle de leurs conjoints/es et ont observé une fréquence plus élevée chez les individus atteints. De plus, les parents, les frères et sœurs d'individus atteints de lithiase calcique sont affectés plus souvent que les parents, frères et sœurs de leurs conjoints/es correspondants<sup>27</sup>. Donc, la prédisposition à la lithiase rénale est beaucoup plus importante chez les individus ayant en commun un patrimoine génétique et ne peut s'expliquer uniquement par l'exposition aux facteurs environnementaux.

L'identification des altérations moléculaires de formes rares de lithiases calciques constitue également des évidences en faveur d'une base héréditaire à la formation de la lithiase calcique idiopathique. Ces conditions monogéniques incluent l'hyperoxalurie primaire<sup>33</sup>, un désordre du métabolisme du glyoxylate, et l'acidose tubulaire rénale distale, un désordre associé avec la formation de lithiase phosphocalcique étant donné l'environnement urinaire relativement alcalin, l'hypocitraturie et l'hypercalciurie qui se produit en présence de l'acidose<sup>34</sup>. La maladie de Dent, ou néphrolithiase liée à l'X, laquelle résulte des mutations d'un canal à ion chlore<sup>35</sup>, est associée avec une protéinurie de faible poids moléculaire, hypercalciurie, néphrocalcinose et/ou néphrolithiase. Ce canal a été découvert grâce aux efforts de cartographie génétique dans des familles avec cette pathologie<sup>36</sup>.

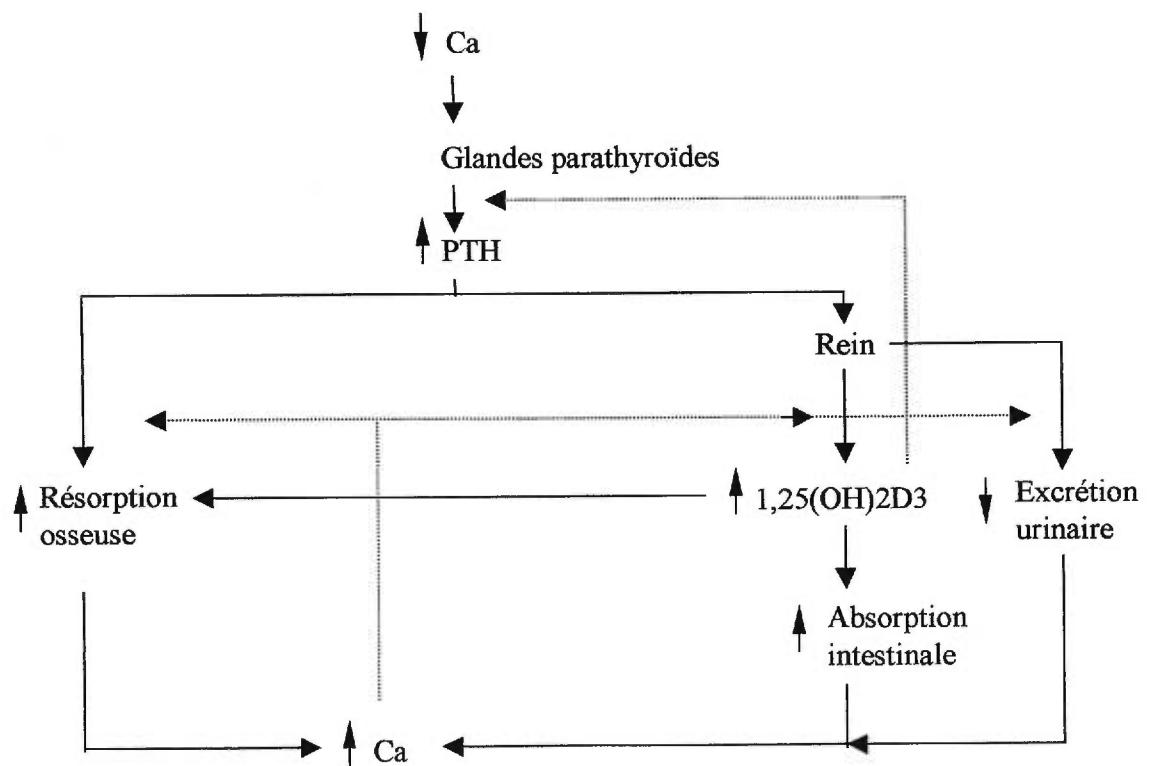
### 3.3 Mode de transmission

Dans le but d'élucider le mode de transmission du trait lithiasique, Resnick *et al.* ont comparé la proportion d'individus lithiasiques chez les jeunes membres de la famille du proposant dans lesquelles zéro, un ou deux individus plus âgés étaient atteints<sup>25</sup>. Ils ont observé une fréquence significativement plus élevée d'individus lithiasiques lorsqu'au moins un membre plus âgé était atteint, suggérant un mode de transmission polygénique plutôt que monogénique. Cependant, le nombre de gènes prédisposant à la formation de néphrolithiase calcique n'est pas connu tout comme le risque associé à chacun des allèles de susceptibilité.

#### 4 Régulation hormonale de l'excrétion urinaire du calcium

Le calcium joue un rôle important dans plusieurs fonctions vitales de l'organisme de sorte qu'il est impératif de maintenir les concentrations ioniques du calcium à un niveau optimal<sup>37</sup>. Ultiment, l'excrétion urinaire du calcium doit représenter la différence entre sa concentration dans l'espace extracellulaire et sa mobilisation via l'intestin et l'os. Les facteurs principaux contrôlant ces flux de calcium sont représentés par les hormones calcitropiques<sup>37</sup> (figure 1), principalement la vitamine D3 et l'hormone parathyroïdienne (PTH).

Figure 1. Régulation hormonale de l'homéostasie du calcium



Lignes pointillées indiquent actions inhibitrices.

#### 4.1 Mécanismes d'action de la vitamine D

Les rôles classiques de la vitamine D sont de réguler l'homéostasie du calcium et du phosphate et de promouvoir la minéralisation de l'os<sup>38</sup>. Cette hormone agit sur l'os, le rein et l'intestin afin de maintenir des niveaux sériques normaux de calcium et de phosphate. Son rôle physiologique le plus important est la stimulation de l'absorption gastro-intestinale du calcium<sup>39</sup>. Indépendamment de la source, la vitamine D est inactive, son activation nécessite l'ajout de deux groupes hydroxyles. Dans le foie, la vitamine D subit une première hydroxylation en position 25 par la 25-hydroxylase<sup>40</sup>. La seconde hydroxylation est catalysée par la 1 $\alpha$ -hydroxylase rénale<sup>41</sup>, étape limitant la production de vitamine D. Le clonage récent de la 1 $\alpha$ -hydroxylase<sup>42-44</sup> a permis d'identifier cette cytochrome P450 comme étant responsable de la conversion de la 25(OH)D3 en 1,25(OH)<sub>2</sub>D3<sup>41</sup>, la forme biologiquement active de la vitamine D. La PTH<sup>45</sup>, la vitamine D elle-même<sup>41</sup>, ainsi que le calcium et le phosphate régulent la production de vitamine D. L'action génomique de la 1,25(OH)<sub>2</sub>D3 est modulée par le récepteur de la vitamine D, une phosphoprotéine de 60kDa qui lie l'hormone avec une grande affinité<sup>46</sup>. La liaison de l'hormone entraîne la phosphorylation du récepteur<sup>47</sup> qui, via un motif en doigt de zinc de liaison à l'ADN<sup>48</sup>, régule l'expression de gènes dans les tissus cibles. La plupart de ces gènes ont un rôle direct dans le métabolisme du calcium. Ces gènes incluent l'ostéocalcine<sup>49</sup>, l'ostéopontine<sup>50</sup>, la PTH<sup>51</sup>, les hydroxylases CYP24<sup>52</sup> et CYP1 $\alpha$ <sup>41</sup> et les calbindines<sup>53</sup>.

#### 4.2 Mécanismes d'action de la PTH

Il est depuis longtemps reconnu que la glande parathyroïde est l'organe du corps qui jauge les niveaux de calcium sérique. En réponse à l'hypocalcémie, la glande parathyroïde sécrète la PTH, une hormone peptidique de 84 acides aminés<sup>37</sup>. Le gène qui code le récepteur de la PTH est connu et cloné<sup>54</sup>. Ce récepteur est retrouvé

sur toute la longueur du néphron et dans les ostéoblastes mais pas dans l'intestin<sup>55</sup>. Son action stimule la résorption osseuse et la réabsorption rénale du calcium. La PTH stimule aussi l'activité de la  $1\alpha$ -hydroxylase en agissant sur son promoteur<sup>45</sup>. La 1,25-D3 stimule l'absorption intestinale de calcium.

Les cellules de la glande parathyroïde sont très sensibles aux changements sériques de calcium, lesquels sont détectés par le récepteur sensible au calcium (RSC)<sup>56,57</sup>. Le RSC appartient à la superfamille de récepteurs à 7 passages transmembranaires couplés à une protéine G<sup>58</sup>. Les mécanismes par lesquels ce récepteur stimule la sécrétion de PTH ne sont pas encore complètement élucidés bien que la stimulation de la phospholipase C, menant à l'accumulation d'inositol 1,4,5-triphosphate, ait été démontrée<sup>59</sup>. Le RSC est exprimé à plusieurs endroits le long des tubules rénaux<sup>60</sup>, dont le rôle présumé consiste à augmenter le transport du calcium (réabsorption) et à inhiber les mécanismes de concentration de l'urine<sup>61</sup>.

## 5 Hypercalciurie idiopathique

Les vues actuelles de la pathogénèse de la lithiase calcique sont basées sur le rôle des anomalies métaboliques qui rendent l'urine plus susceptible à la cristallisation. L'approche diagnostique vise la détection de ces anomalies et le traitement médical suppose que l'atténuation de ces facteurs de risque aboutira à la rémission ou à l'amélioration de répétitions. Parmi ces facteurs, l'hypercalciurie constitue certainement le plus important exemple clinique. Elle constitue le facteur de risque le plus fréquemment rencontré chez les patients lithiasiques et se retrouve chez environ 40 % d'entre eux<sup>1,62,63</sup>. En comparaison, le trait hypercalciurique affecte seulement 5 % de la population générale<sup>64</sup>. Les grandes concentrations de calcium dans l'urine augmentent la saturation de sels d'oxalate de calcium et de phosphate de calcium. Cependant, les mécanismes moléculaires responsables de l'hypercalciurie chez l'humain demeurent partiellement indéfinis. Ainsi, l'identification des gènes impliqués dans l'hérédité de l'excrétion du calcium devrait permettre la caractérisation des événements moléculaires menant à l'hypercalciurie et, possiblement, à la lithiase calcique.

L'hypercalciurie idiopathique est définie par un calcium urinaire  $> 7,5\text{mmol/jour}$  pour les hommes et  $> 6,3\text{mmol/jour}$  pour les femmes ou  $0,1\text{mmol/kg}$  par jour indépendamment du sexe et de l'âge. Cette définition est basée sur la moyenne d'excrétion urinaire de calcium d'individus normaux qui se situe à  $3,9 \pm 1,6\text{mmol/kg}$ <sup>62</sup>. Donc, la moyenne à laquelle est ajoutée 2 fois la valeur de la déviation standard représente la limite supérieure de  $7,1\text{mmol/jour}$ .

### 5.1 Études familiales

La fréquence d'hypercalciurie a été déterminée dans 9 familles de patients hypercalciuriques également affectés par la lithiase rénale oxalo-calcique<sup>65</sup>.

L'hypercalciurie idiopathique a été observée chez 26 de 73 individus apparentés, sur trois générations successives pour deux familles et sur deux générations successives pour quatre autres familles. Plusieurs membres de la famille du proposant étaient atteints dans les 3 familles restantes. Dix-neuf des 44 parents de premier degré (43%) étaient hypercalciuriques. Tous formaient des lithiases. Cette étude démontre qu'il y a une forme familiale d'hypercalciurie de même que l'agrégation du trait lithiasique avec l'hypercalciurie.

## 5.2 Mode de transmission

Bien que le mode de transmission autosomique dominant<sup>65-67</sup> ait été suggéré, la transmission polygénique du trait hypercalciurique<sup>68</sup> apparaît plus probable. Les évidences en ce sens nous proviennent d'études sur la distribution de l'excrétion urinaire de calcium. Dans la population générale, la distribution de l'excrétion urinaire de calcium est continue<sup>69,70</sup>. Cette distribution est similaire en forme chez les patients lithiasiques mais dévie vers les grandes valeurs<sup>71</sup>. Ces observations ne suggèrent donc pas la présence d'un sous-groupe dit hypercalciurique de sorte qu'il apparaît plus approprié de traiter la calciurie, n'ont pas comme un trait qualitatif (binaire) avec des individus atteints et non atteints, mais comme l'expression d'un trait quantitatif (continu) comme le sont la tension artérielle et les niveaux de cholestérol.

## 5.3 Classification et diagnostique de l'hypercalciurie

Il a été suggéré par Pak et collaborateurs<sup>6,7,72</sup> que l'hypercalciurie pouvait être divisée en deux groupes majeurs : l'hypercalciurie absorptive (HA), caractérisée par une hyperabsorption intestinale de calcium et l'hypercalciurie rénale (HR), caractérisée par un défaut de réabsorption rénal du calcium (tableau 4). L'hypercalciurie absorptive est de plus subdivisée en deux formes, le type I et le type II. Le type II est une forme moins sévère que le type I en ce qu'elle se produit



uniquement avec une diète riche en calcium. Les formes mineures incluent la fuite rénale de phosphate avec hypophosphatémie et hypercalciurie et l'hypercalciurie à jeun associée avec des niveaux normaux de PTH, calcium et phosphate.

**Tableau 4. Critères diagnostiques de l'hypercalciurie idiopathique**

Condition	Ca sérique	P sérique	PTH	Ca 24 h <sup>a</sup>	Ca À jeun	Ca Charge
HA I	N	N	N	↑	N	↑
HA II	N	N	N	N	N	↑
HR	N	N	↑	↑	↑	N/↑
Fuite P	N	↓	N/↓	↑	↑	↑
À jeun	N	N	N	↑	↑	↑

A : diète restreinte en calcium; N : excrétion urinaire de calcium normal; ↑ augmenté, ↓ diminué.

Le test de Pak<sup>73</sup> permet la différenciation de l'origine de l'hypercalciurie selon la réponse à une surcharge de calcium ou en sa privation. La prémisse du test est la suivante : durant le jeûne, le calcium urinaire sera élevé en présence d'un défaut rénal de réabsorption ou d'une mobilisation osseuse excessive; après la prise orale de 1g de calcium, le calcium urinaire sera élevé en présence d'une hyperabsorption intestinale. La calciurie normale à jeun est < 0,11 mg de calcium par dL de filtrat glomérulaire et la calciurie normale après la charge calcique est de calcium:créatinine < 0,20 mg de calcium par mg de créatinine.

Cependant, la pertinence de cette classification, et par conséquent, l'utilité de ce test, est de plus en remis en question. Cette remarque est fondée sur l'observation de la normalisation de la calciurie chez des patients suivis à long terme initialement définie comme HA ou HR<sup>74</sup>. Dans la même étude, un certain nombre de patients initialement HR manifestait les caractéristiques de l'HA et vice versa. Ces observations sur la calciurie sont plus compatibles avec l'expression d'un trait continu avec divers degrés de sévérité et de présentation clinique.

#### 5.4 Vitamine D et hypercalciurie

Les patients hypercalciuriques<sup>62,63,75,76</sup> présentent une augmentation de l'absorption intestinale de calcium, laquelle peut se produire par un mécanisme dépendant de la vitamine D ou par un défaut dans le transport du calcium indépendant de la vitamine D. L'absorption du calcium au niveau de l'intestin est régulée par la 1-25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> sérique<sup>37,77</sup>, quelques études ont démontré que cette dernière est plus élevée chez les patients hypercalciuriques par rapport à des sujets normaux<sup>78-81</sup>. Le rôle de la vitamine D dans le métabolisme du calcium est également supportée par l'administration de vitamine D active chez des sujets normaux<sup>82-84</sup>, lesquels développent les caractéristiques attendues de l'hypercalciurie provoquée par la vitamine D : hyperabsorption intestinale du calcium et la mobilisation de l'os induite par une diète restreinte en calcium. Même les élévations minimales de la 1,25-dihydroxyvitamine D<sub>3</sub> pourraient causer l'hypercalciurie puisque la vitamine D contrôle l'expression de son propre récepteur *in vivo*<sup>85</sup>. Par contre, certains patients avec hypercalciurie absorptive ne présentent pas d'élévation 1,25-D<sub>3</sub> sérique<sup>78</sup>, suggérant que la vitamine D puisse augmenter l'expression de son récepteur au niveau de l'intestin<sup>85</sup> ou que les mécanismes de transport indépendants de la vitamine D soient responsables de l'augmentation du calcium et de l'hypercalciurie.

#### 5.5 Modèle animal : le rat lithiasique hypercalciurique

Pour étudier les mécanismes responsables de l'excrétion urinaire excessive du calcium, un modèle de rat lithiasique hypercalciurique a été développé<sup>86</sup>. Les rats étaient sélectionnés sur la base de la calciurie sur plus de 40 générations afin de produire une situation dans laquelle l'excrétion urinaire de calcium est beaucoup plus grande que celle des rats contrôles<sup>87</sup>. De plus, ces rats forment des calculs rénaux de phosphate de calcium<sup>88</sup>. Chez ce modèle, un mode de transmission polygénique du trait hypercalciurique est également suspecté. Les mesures du calcium urinaire ont

démontré que l'intensité de l'hypercalciurie augmente avec les générations successives d'accouplement sélectif<sup>89</sup>. La calciurie étant passée de 1.18mg/24h à 8mg/24h sur une période de 40 générations.

L'analyse de ce modèle a révélé que les rats ont non seulement une augmentation de l'absorption intestinale de calcium<sup>86</sup>, mais présentent aussi, lors d'une diète basse en calcium, un défaut de la résorption rénale tubulaire<sup>90</sup> et une tendance accrue à la déminéralisation de l'os<sup>91</sup>. Ces observations reflètent étroitement celles faites chez les patients avec hypercalciurie idiopathique. Chez ce modèle, l'excès de l'excrétion urinaire de calcium secondaire à l'hyperabsorption intestinale n'est pas causé par une élévation de la 1,25(OH)<sub>2</sub>D3 sérique, mais semble être associé à une élévation intestinale<sup>92</sup>, rénale et osseuse<sup>92,93</sup> du nombre de récepteurs de la 1,25(OH)<sub>2</sub>D3 (RVD). Ces résultats suggèrent que le rat hypercalciurique lithiasique réponde d'une manière anormale et exagérée à la liaison de la 1,25(OH)<sub>2</sub>D3. Cette hypothèse a été vérifiée et les résultats suggèrent que la sensibilité accrue à la 1,25(OH)<sub>2</sub>D3 des rats hypercalciuriques lithiasiques se manifeste par une élévation de la stabilité de l'ARN messager du RVD sans altération de la transcription, de la synthèse protéique<sup>94</sup>.

## 6 Méthodes d'analyse en épidémiologie génétique

### 6.1 L'approche criblage du génome versus gènes candidats

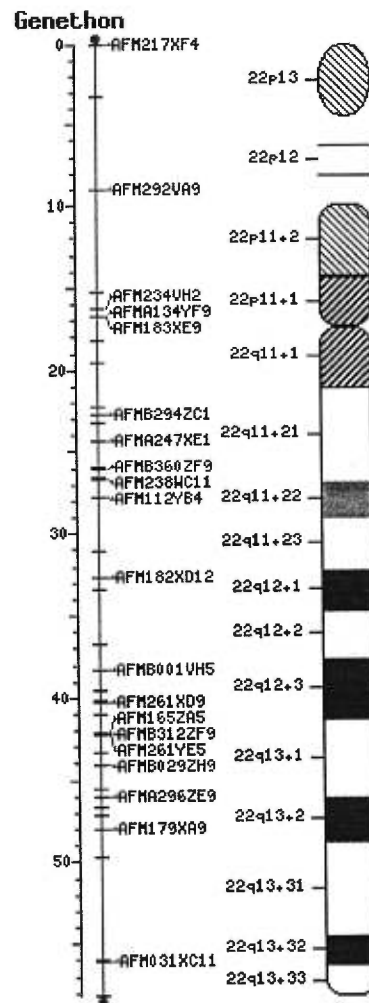
L'identification des gènes qui augmentent la susceptibilité aux traits complexes peut se faire selon deux approches différentes. La première, dite criblage du génome, analyse la liaison génétique d'un trait avec plusieurs marqueurs polymorphes répartis de façon plus ou moins uniforme à travers le génome. Cette démarche vise la localisation du gène de susceptibilité et ne requiert aucune connaissance *a priori* de sa fonction. Lorsqu'une liaison a été identifiée, le clonage du gène avec les outils de la biologie moléculaire et la détermination de sa fonction peut débiter. L'approche criblage du génome est généralement limitée par la taille de l'échantillon et les coûts associés au recrutement des familles et au génotypage des individus.

L'approche dirigée, au contraire, analyse la liaison avec des marqueurs spécifiques. Ces marqueurs sont choisis selon leur proximité à des gènes dont l'implication dans l'étiologie du trait est envisageable. Par exemple, le locus HLA (Human Leucocyte Antigen) sur le chromosome 6p21 est une région candidate pour les maladies génétiques ayant une composante auto-immunitaire<sup>95,96</sup>. L'identification des gènes candidats, cependant, est limitée par la solidité des connaissances de la pathophysiologie du trait.

### 6.2 Analyse de liaison

Deux stratégies sont couramment utilisées pour l'identification des gènes de susceptibilité des traits complexes<sup>97</sup>. Les études d'association comparent la fréquence des allèles d'un marqueur polymorphe (c.f. figure 2 pour une définition des marqueurs couramment utilisés aujourd'hui) dans une population d'individus atteints avec celle d'un groupe d'individus contrôle. Les études de liaison cherchent à mettre en évidence la coségrégation d'un allèle d'un marqueur polymorphe avec le locus maladie dans des familles comportant plusieurs membres atteints.

Figure 2. Carte génétique de marqueurs sur le chromosome 22<sup>98</sup>



Les marqueurs génétiques permettent l'estimation de la liaison dans les familles; ces marqueurs peuvent être ordonnés pour former des cartes génétiques (pour une discussion des progrès générés par le Projet du génome humain voir Hudson, 1998)<sup>99</sup>. La première carte génétique était composée de marqueur de type RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)<sup>100</sup>. Basé sur le patron de restriction enzymatique, ces marqueurs peu informatifs ont été remplacés par les marqueurs microsatellites, habituellement des répétitions de dinucléotides, surtout CA. Ces marqueurs ont le triple avantage d'être fréquents, de posséder un indice d'hétérozygotie élevé et d'être répandus de façon uniforme à travers le génome. De plus, les différents allèles d'un marqueur sont facilement identifiables par la PCR. La troisième génération de carte génétique, en cours de développement, sera composée de polymorphismes d'un nucléotide unique<sup>101</sup> (single-nucleotide polymorphism). Ces marqueurs sont moins informatifs que les microsatellites, cependant, ils sont beaucoup plus fréquents, 1 à

toutes les 1000 paires de bases<sup>102</sup>. Les technologies d'ADN sur « chip » permet déjà l'identification et le génotypage à grande échelle de ces marqueurs<sup>103</sup>.

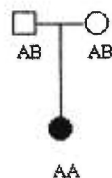
### 6.2.1 Étude d'association basée sur la population

Les études d'association comparent la fréquence allélique d'un marqueur d'un groupe d'individus non-apparentés atteints (groupe cas) avec celle d'individus non-apparentés et non-atteints (groupe contrôle). L'identification d'une différence significative entre le groupe témoin et le groupe contrôle suggère qu'un locus génétique à proximité du marqueur influence la prédisposition à la pathologie, l'association étant le résultat d'une liaison, avec un déséquilibre de liaison entre le locus marqueur et le locus maladie. Le déséquilibre de liaison signifie que les combinaisons d'allèles à deux locus sont non-aléatoires. Cependant, la méthode basée sur la population peut produire une fausse association lorsqu'il y a stratification des individus échantillonnés (e.g. différence ethnique).

### 6.2.2 Étude d'association familiale

Pour éviter une association fausse résultant de l'utilisation d'un groupe témoin inapproprié, des méthodes d'analyse faisant usage d'un groupe contrôle interne ont été développées<sup>104,105</sup>. Dans ce cas-ci, la comparaison des fréquences des allèles transmis à l'enfant atteint et des allèles non transmis est effectuée. L'échantillon nécessaire est constitué des individus atteints et de leurs parents. Le test de la transmission du déséquilibre de liaison (TDT)<sup>106</sup> et le test HRR<sup>107</sup> (haplotype relative risk) mesurent l'association. Un exemple du TDT est présenté à la figure 3.

**Figure 3. Test de transmission du déséquilibre de liaison**



La statistique est calculée par le test du chi-carré selon la formule suivante :

$$\chi^2 = (a-b)^2/(a+b) \quad (1)$$

où a et b dénotent le nombre de fois l'allèle A et B sont respectivement transmis d'un parent hétérozygote à un enfant atteint.

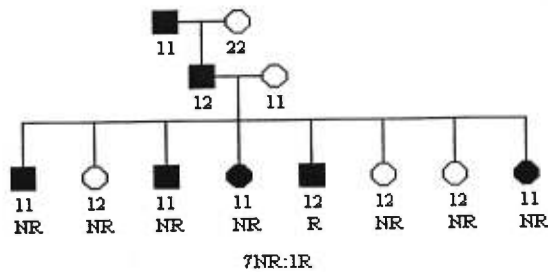
### 6.2.3 Étude de liaison paramétrique

La méthode la plus puissante pour la détection d'une liaison génétique consiste en l'approche paramétrique (dépendante d'un modèle de transmission). Cette approche utilise la méthode du maximum de vraisemblance<sup>108</sup>. Le lod score est le logarithme en base 10 du ratio de deux vraisemblances - la probabilité que le locus marqueur et le locus maladie soient liés ( $\theta < 0.5$ ) sur la probabilité qu'ils ne le soient pas ( $\theta = 0.5$ ). Le lod score  $[Z(\theta)]$  est calculé selon la formule suivante :

$$Z(\theta) = \log_{10} [\theta^R (1-\theta)^{NR} / (0.5)^R (0.5)^{NR}] \quad (2)$$

où  $Z(\theta)$  correspond au score à une valeur de  $\theta$  ;  $\theta$  correspond à la fraction de recombinaison et R et NR correspondent au nombre de recombinants et non-recombinants, respectivement.

**Figure 4. Exemple de pedigree montrant une évidence de liaison génétique**



La valeur du lod score pour cette famille à une valeur de  $\theta = 0.05$  (5% de recombinaison) est calculé de la façon suivante :

$$Z(0.05) = \log_{10} [(0.05)^1 (0.95)^7] - \log_{10} (0.5)^8$$

$$Z(0.05) = 0.9513.$$

La distance exprimée en pourcentage de recombinaison la plus probable entre le marqueur génétique et le locus maladie est la fraction de recombinaison à laquelle le lod score est maximum. Traditionnellement, on considère un lod score  $>3$  comme une évidence statistique significative en faveur de la liaison, ce qui correspond à un ratio de probabilité de 1000 contre 1, alors qu'un lod score plus petit que  $-2$  mène à la conclusion d'une absence de liaison<sup>108</sup>. Cette approche requiert la spécification d'un modèle ou de paramètres, tel que le mode de transmission, la fréquence allélique du locus maladie et la pénétrance. Ces paramètres, par contre, sont inconnus pour les traits complexes, les méthodes non-paramétriques, plus robustes mais moins puissantes, ont été développées pour parer à ce problème.

#### 6.2.4 Étude de liaison non-paramétrique

La méthode non-paramétrique ne requiert pas une connaissance du modèle de transmission de la maladie. La liaison est mesurée par le partage d'allèles, la plus utilisée étant la méthode des paires de germains<sup>109</sup>. Selon la ségrégation mendélienne pour un locus autosomique, les germains ont en commun 0, 1 ou 2 allèles identiques-par-descendance, c'est-à-dire hérités d'un parent commun, dans les



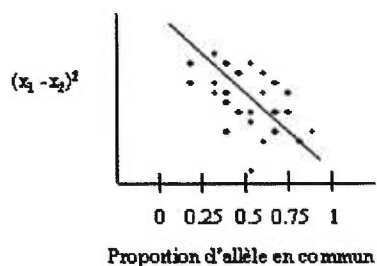
proportions 25%, 50% et 25%, respectivement<sup>110</sup>. En présence d'une liaison génétique avec le locus maladie, ce ratio dévie et la proportion des germains atteints ayant en commun deux allèles au marqueur augmente. Plusieurs tests simples ont été développés<sup>109,110</sup>, cependant, des études ont démontré que le test de la moyenne (équation 3)<sup>109</sup> s'accommode le mieux des différents modèles génétiques<sup>111</sup>. La statistique est calculée selon la formule suivante :

$$T = (2n_2 + n_1 - N) (2/N)^{1/2} \quad (3)$$

Test unilatéral t avec N-1 degré de liberté ou N est le nombre total de paires de germains de l'échantillon,  $n_1$  et  $n_2$  représentent les proportions des paires ayant en commun un et deux allèles, respectivement.

Les traits quantitatifs que sont les mesures de la tension artérielle, la résistance à l'insuline et la calciurie peuvent aussi faire l'objet d'analyse par les méthodes basées sur le partage d'allèles. En présence d'une liaison entre un trait et un locus génétique, les germains ayant en commun plus d'allèles identiques-par-descente devraient être similaires pour les mesures phénotypiques que les germains ayant peu d'allèles en commun. Ainsi, la régression entre la différence au carré des mesures phénotypiques et la proportion des allèles, sert de test pour la mesure de la liaison (figure 5)<sup>109</sup>.

**Figure 5. Analyse d'un trait quantitatif**



Régression du carré des différences phénotypiques sur la proportion des allèles identiques-par descente.

Lorsque la pente ( $p$ ) de la droite de régression est significativement négative, telle qu'estimée par l'équation 4, elle suggère une liaison.

$$t = p / \sqrt{\text{variance}(p)} \quad (4)$$

## 7 Familles lithiasiques

### 7.1 Le recrutement

Le recrutement des familles constitue l'étape la plus longue et la plus fastidieuse dans l'effort de cartographie génétique. Il débute avec la rencontre du proposant qui, dans cette étude, est référé par le médecin dans les cliniques spécialisées pour le traitement des lithiases. Cette démarche permet l'évaluation du proposant (antécédents personnels et histoire familiale) et le contact initial avec les membres de sa famille. Les critères de sélection doivent être respectés afin d'éviter le recrutement de familles non-conformes (hyperparathyroïdie, maladie de Crohn et infections) tout comme les familles avec évidence de transmission bilinéaire, situation où les deux parents sont atteints. De plus, certaines caractéristiques du phénotype lithiasique limitent le recrutement des familles. Le trait lithiasique apparaissant surtout à l'âge adulte, entre 30 et 50 ans, les parents des individus atteints sont généralement non-disponibles. De plus, pour les traits complexes, où le modèle génétique ne peut être inféré, le recrutement de familles simples, tel que sont les paires de germains, est favorisé. Pour cette étude, la présence d'au moins deux individus atteints de la lithiase calcique sert de critère d'entrée, la rencontre des participants est organisée et la collecte d'informations cliniques et d'échantillons biologiques s'en suit. Le tableau 5 présente le nombre de familles recrutées jusqu'à ce jour.

**Tableau 5 Nombre d'individus atteints par fratrie concordants pour le trait lithiasique**

Nombre d'atteints par fratrie	Nombre de fratrie
2	40
3	23
4	8
5	10
6	7
7	1
8	1
9	0
10	0
11	1
Fratries (familles)	88 (76)

## 7.2 Évaluation des participants

Le but de l'évaluation des participants est de rechercher la présence de facteurs étiologiques de la lithiase rénale. L'entrevue se fait avec l'aide d'un questionnaire (annexe 1). La confirmation du diagnostic est basée sur l'analyse du calcul lorsque celui-ci est disponible et la revue des registres médicaux et documents radiologiques. Les manifestations typiques d'une colique néphrétique : douleurs subites et localisées, hématurie et dysurie sont également recherchées. Dans les antécédents personnels, on recherche les causes de lithiase secondaire : malformation rénale, crise de goutte, infection urinaire, la prise de médicaments lithogènes et les désordres affectant l'intestin.

Un bilan métabolique de base des participants est également effectué afin de déterminer la présence de désordres associés à la lithiase. Pour ce faire, différents paramètres sériques et urinaires sont mesurés (tableau 6). Ces mesures permettent en outre le calcul de l'excrétion urinaire du calcium et la confirmation de l'hypercalciurie lorsque supérieur à 0.1mmol/kg par 24h. Le tableau 7 présente les résultats de comparaisons intra-familiales entre individus lithiasiques et individus contrôles. Des différences significatives ont été observées uniquement pour l'excrétion urinaire de calcium et de magnésium.

**Tableau 6. Bilan métabolique**

---

Sérique	Urine des 24h
Ca, PO <sub>4</sub>	Ca, PO <sub>4</sub>
Mg	Mg
Na, K, HCO <sub>3</sub>	Na, NH <sub>3</sub>
Cl	Oxalate
Urate	Urée, urate
Créatinine	Citrate
PTH	Acidité titrable
1,25(OH) <sub>2</sub> D3	Volume
	Créatinine

---

Tableau 7. Analyses paires des phénotypes urinaires chez les germains

	Hommes			Femmes			Valeurs-P Totales
	Valeurs P		Cas	Valeurs P		Cas	
	Contrôles			Contrôles			
Âge (années)	46.3 ± 11.7	46.6 ± 10.1	46.6 ± 10.1	NS	49.5 ± 10.2	49.3 ± 10.9	NS
Épisodes	-	5.6 ± 5.5	5.6 ± 5.5	-	3.5 ± 4.0	3.5 ± 4.0	-
DMO (kg/m <sup>2</sup> )	26.1 ± 3.6	25.7 ± 3.2	25.7 ± 3.2	NS	24.8 ± 4.0	26.6 ± 5.2	NS
Clairance créatinine (ml sang/min)	87 ± 26	86 ± 17	86 ± 17	NS	66 ± 23	71 ± 21	NS
Volume (L)	1.7 ± 0.7	1.6 ± 0.6	1.6 ± 0.6	NS	1.8 ± 0.7	1.5 ± 0.6	NS
Calcium (mmol/Kg/j)	0.069 ± 0.030	0.104 ± 0.055	0.104 ± 0.055	<10 <sup>-3</sup>	0.067 ± 0.033	0.089 ± 0.043	<10 <sup>-4</sup>
Oxalate (mmol/Kg)	4.5 ± 1.4	4.9 ± 1.6	4.9 ± 1.6	NS	4.7 ± 1.5	4.8 ± 1.5	NS
Sodium (mmol/Kg/j)	2.27 ± 1.06	2.40 ± 0.66	2.40 ± 0.66	NS	2.11 ± 0.66	2.27 ± 0.73	NS
Magnésium (mmol/Kg/j)	0.056 ± 0.016	0.068 ± 0.024	0.068 ± 0.024	0.04	0.056 ± 0.019	0.059 ± 0.020	NS
Phosphore (mmol/l)	28.6 ± 9.5	29.2 ± 6.3	29.2 ± 6.3	NS	20.5 ± 8.3	21.4 ± 7.1	NS
Acide urique (mmol/l)	3.3 ± 1.2	3.4 ± 0.6	3.4 ± 0.6	NS	2.7 ± 0.8	2.7 ± 0.7	NS
Citrate (mmol/l)	2.4 ± 1.0	2.3 ± 0.7	2.3 ± 0.7	NS	2.6 ± 1.0	2.5 ± 0.9	NS
Ammonium (mmol/l)	30.8 ± 13.1	31.6 ± 9.7	31.6 ± 9.7	NS	23.4 ± 6.8	26.5 ± 13.4	NS
Urée (mmol/l)	357 ± 139	345 ± 73	345 ± 73	NS	257 ± 77	264 ± 72	NS

Valeur : moyenne ± écart type, DMO : densité minérale osseuse, NS : non significatif

## 8 Évaluation de gènes candidats de la lithiase calcique

### 8.1 La 1 $\alpha$ -hydroxylase

Hypothèse : Un polymorphisme du gène qui code pour la 1- $\alpha$  hydroxylase rénale est associé à la néphrolithiasique calcique et/ou l'excrétion urinaire excessive de calcium.

Rationnelle : L'hypercalciurie observé chez une majorité de patients lithiasiques pourrait être causée par une variation génétique dans le gène qui code pour la 1 $\alpha$ -OHase. La perte de contrôle dans la régulation de son expression aurait pour conséquence d'augmenter la production de vitamine D active (1,25D<sub>3</sub>) et ainsi augmenter l'absorption intestinale de calcium. La régulation anormale de la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> constitue l'hypothèse la plus attrayante. Avancée par Coe et collaborateurs (1982)<sup>81</sup>, cette hypothèse suggère que l'hypercalciurie familiale soit causée par une anomalie héréditaire du tubule proximal qui mène à la régulation anormale de la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub><sup>63,81</sup>. La production excessive de vitamine D induit l'absorption intestinale de calcium et réduit la réabsorption tubulaire de calcium résultant en l'hypercalciurie normocalcémique.

Conclusion : Cette étude, telle que publiée dans le « Journal of the American Society of Nephrology » (9; p425-432 (1998)), a démontré l'absence de liaison entre le locus qui code pour la 1- $\alpha$  hydroxylase rénale et le trait lithiasique et hypercalciurie dans des familles québécoises.

**The Putative  $1\alpha$ -hydroxylase Locus is not Linked to Calcium Stone Formation or Calciuric Phenotypes in French-Canadian Families**

**Authors:** Patrick Scott, Denis Ouimet, Yanick Proulx, Marie-Lucie Trouvé, Gérald Guay, Bernard Gagnon, Luc Valiquette, Alain Bonnardeaux.

Article publié dans la revue "Journal of the American Society of Nephrology", volume 9, numéro3, pages 425-432 (1998).



**ABSTRACT**

Calcium urolithiasis is frequently associated with increased intestinal absorption and urine excretion of calcium, and has been suggested to result from increased vitamin D production. The role of the enzyme  $1\alpha$ -hydroxylase, the rate-limiting step in active vitamin D production, was evaluated in 36 families, including 28 sibships with at least a pair of affected sibs, using qualitative and quantitative trait linkage analyses. Sibs with a verified calcium urolithiasis passage ( $n=117$ ) had higher 24-hour calciuria ( $P=0.03$ ), oxaluria ( $P=0.02$ ), fasting and post-calcium loading urine calcium/creatinine (Ca/cr) ratios ( $P=0.008$  and  $P=0.002$ , respectively), and serum  $1,25(\text{OH})_2$  vitamin D levels ( $p=0.02$ ), compared to non-stone forming sibs ( $n=120$ ). Markers from a 9 cM interval encompassing the VDD1 locus on chromosome 12q13-14 (putative  $1\alpha$ -hydroxylase) were analyzed, in 28 sibships (146 sib-pairs) of single and recurrent stone formers, and 14 sibships (65 sib-pairs) with recurrent-only ( $\geq 3$  episodes) stone-forming sibs. Two-point and multipoint analyses did not reveal excess in alleles shared among affected sibs at the VDD1 locus. Linkage of stone formation to the VDD1 locus could be excluded respectively with a  $\lambda_d$  of 2.0 (single and recurrent stone-formers) and 3.25 (recurrent stone-formers). Quantitative trait analyses revealed no evidence for linkage to 24-h calciuria and oxaluria, serum  $1,25(\text{OH})_2$  vitamin D levels, and Ca/cr ratios. This study shows absence of linkage of the putative  $1\alpha$ -hydroxylase locus to calcium stone formation or to quantitative traits associated with idiopathic hypercalciuria. In addition, there is co-aggregation of calciuric and oxaluric phenotypes with stone formation.

## INTRODUCTION

The passage of a kidney stone is a common and recurrent disorder affecting 1 to 5% of the Caucasian population, and has important economic and medical consequences. It is usually associated with intolerable pain and can result in loss of renal function and/or infection. Calcium stones constitute the most prevalent type of nephrolithiasis, and are thought to result from a combination of metabolic factors of environmental and genetic origin. Recognized urinary factors which may predispose to stone formation include increased urinary excretion of calcium and oxalate <sup>1,2</sup>. Dietary risk factors include decreased fluid, calcium and potassium intake as well as increased protein intake <sup>3</sup>.

Large epidemiological surveys have demonstrated familial aggregation for kidney stone formation <sup>4-6</sup> with an increased risk for first-degree relatives. From such studies, one can derive indices of family clustering, termed  $\lambda$  factors <sup>7</sup>, by extracting the ratios between the prevalence of the disease in relatives of an affected proband (parent, sibling, offspring), and the population prevalence. For stone passage, the lifetime  $\lambda$  factor for male siblings ( $\lambda_s$ ) can be estimated to vary from 2.5 to 4, a value higher than essential hypertension and non-insulin dependent diabetes mellitus (2), but lower than insulin-dependent diabetes mellitus (15). A polygenic model of inheritance has been proposed by Resnick *et al* based on the observation that there is a higher proportion of affected younger siblings in sibships where one of 2 oldest siblings is affected, than when both are unaffected <sup>5</sup>. However, little is known about the number of genes predisposing to calcium stone formation, or about the relative contribution of environmental and genetic factors. The elucidation of the molecular bases of monogenic disorders associated with the formation of calcium nephrolithiasis such as primary hyperoxaluria <sup>8</sup> and Dent's disease, a rare X-linked hypercalciuric nephropathy resulting from inactivating mutations in a renal chloride channel termed CLC-5 <sup>9,10</sup>, also indicates that genetic factors are likely to play a significant role in common calcium stone formation. In addition, stone formation is

observed in monogenic disorders such as cystinuria <sup>11</sup>, Lesch-Nyhan syndrome (hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase deficiency) <sup>12</sup>, and adenine phosphoribosyltransferase deficiency <sup>13</sup>.

Numerous studies have attempted to define the causes of calcium stone formation by analyzing *in vivo* and *in vitro* biochemical markers related to calcium and oxalate metabolism, and to inhibition of crystallization. Perhaps the most consistently reported anomaly is increased urinary calcium excretion (>0.1 mmol/Kg/24 hours). Hypercalciuria without a known systemic cause, i.e. idiopathic hypercalciuria, is present in approximately 40% of stone formers compared with only 5% in the general population, and is usually associated with increased intestinal calcium absorption. Sporadic reports have suggested that idiopathic hypercalciuria is heritable and transmitted as an autosomal dominant trait <sup>14,15</sup>, but this hypothesis has not been rigorously tested using standard segregation analysis. Further investigations <sup>16</sup> have proposed that idiopathic hypercalciuria is heterogeneous and results from a variety of causes including dietary excess of calcium, idiopathic intestinal calcium hyperabsorption, renal calcium leak (leading to secondary hyperparathyroidism), and renal phosphate leak (leading to hypophosphatemia, increased vitamin D production and hypercalciuria). However, these categories of idiopathic hypercalciuria might not represent specific entities but rather the extremes of a continuous spectrum <sup>17</sup>. This is also suggested by the fact that a significant proportion of hypercalciurics are now deemed “unclassifiable” <sup>18</sup>, and present with various degrees of fasting hypercalciuria and intestinal calcium hyperabsorption.

Although controversy persists regarding the primary event(s) responsible for idiopathic hypercalciuria, the vitamin D pathway, which is the only known hormonal stimulus for intestinal calcium absorption, is a preeminent hypothesis to explain this trait. Among the candidate genes that could contribute to hypercalciuria, and hence to the formation of calcium stones, a disordered  $1\alpha$ -hydroxylase activity is perhaps the most attractive for the following reasons: 1)  $1\alpha$ -hydroxylation of vitamin D<sub>3</sub> is

the rate-limiting step in the formation of active vitamin D3 (1,25(OH)<sub>2</sub>D3). 2) Subjects with idiopathic hypercalciuria maintain a calcium balance that is very much similar to control subjects given 1,25(OH)<sub>2</sub>D3, showing a combination of increased intestinal absorption of calcium and increased urinary fasting calcium excretion<sup>19-22</sup>. 3) Hypercalciuric subjects may have increased plasma levels of 1,25(OH)<sub>2</sub>D3 under a free diet<sup>17,23-25</sup>. Moreover, 1,25(OH)<sub>2</sub>D3 production rates, as measured by the equilibrium infusion of tritium-labeled 1,25(OH)<sub>2</sub>D3, are increased without changes in metabolic clearance rates<sup>26</sup>. 4) Ketoconazole, an inhibitor of 1,25(OH)<sub>2</sub>D3 synthesis, induces a reduction in intestinal calcium absorption and renal excretion when administered to hypercalciuric subjects<sup>27</sup>.

To test whether genetic variation at the 1 $\alpha$ -hydroxylase locus might be associated with calcium stone formation, renal calcium excretion, intestinal calcium absorption as well as plasma 1,25(OH)<sub>2</sub>D3 levels, we performed genetic linkage studies in large families of French Canadian descent with multiple affected members. Our results suggest that the putative 1 $\alpha$ -hydroxylase locus on chromosome 12q is neither linked to calcium stone formation nor to intermediate phenotypes relevant to calcium metabolism and vitamin D homeostasis.

## METHODS

### *Family ascertainment*

**Pedigrees.** This study was approved by institutional review committees and all subjects gave informed consent. Proband with at least one episode of renal stone of predominant calcium-oxalate content as determined by crystallographic analysis (Louis C. Herring & Co., Orlando, Florida) and with a family history of nephrolithiasis (at least one affected sibling), were interviewed by a clinical research nurse and asked to contact affected and unaffected siblings and parents, or intervening relatives when parents were deceased. We ascertained 36 French-Canadian sibships from probands recruited at several urology and nephrology clinics in the Montréal and Québec city regions. After interviews and reviewing hospital records, 26 of 36 families (28 sibships) comprised at least one pair of affected siblings with one or more verified episodes of nephrolithiasis.

### *Phenotypic traits*

**Affection status for renal stones.** Age, sex, weight, height and sitting blood pressure were obtained in each relative participating in the study. Episodes and onset age of stone passage for sibs and probands were confirmed by a detailed review of all the records available from the respective hospitals where clinical assessments were made. All affected siblings had at least one definite stone episode verified by either: 1) stone passage; 2) intravenous pyelogram (radio-opaque stone) with suggestive symptoms when absence of passage; 3) surgery. If at least one episode could be verified, the total number of episodes was determined according to the patient's description (stone passage and renal colic with spontaneous resolution). Crystallographic analysis was performed on all stones available from the siblings and biochemical analyses of stones from hospital records were retrieved. We also reviewed the hospital records from unaffected siblings (abdominal ultrasounds and X-rays) when possible, to confirm an unaffected status. We assigned the unaffected status when no previous passage of stone and/or suggestive symptoms were elicited on interview. Unaffected sibs with evidence of a stone on an abdominal ultrasound or plain X-ray film, and sibs with suggestive symptoms (renal colic, hematuria and no passage of stone) but no concomittant radiologic evidence, were considered as

unknown for the trait. Siblings with a history of stone passage and with clinical evidence of infection (fever, leukocyturia, positive urine culture), chronic diarrhea, primary hyperparathyroidism, inflammatory bowel disease or small bowel resection, were also assigned an undetermined affection status.

**24-h urine collection.** The phenotyping protocol entailed a single 24-hour urinary collection under a moderately-restricted calcium diet. Calcium and vitamin supplements, as well as diuretics, were stopped 1 week prior to sampling. Patients were instructed (verbal and written) to avoid dairy products (i.e. milk, yogurt, cheese) for 5 days prior to the collection. Urines were collected in 4-liter disposable collection bags containing thymol. Family members were instructed by a clinical research nurse, in writing and verbally, to initiate the collection at 7 AM in the morning after the first void and collect the urine (including urine voided during defecation) until the next morning (including the first morning void).

**Calcium loading test.** All family members were ascertained concomitantly by a clinical research nurse with a nephrologist (A.B.) or a Ph.D. student responsible for the project (P.S.) on the morning ending the 24-hour urine collection. A supervised calcium loading test was performed according to the following protocol: a 2-hour fasting urine collection (from 7 AM to 9 AM) was obtained, followed by a 4-hour collection (9 AM to 13 PM) after the ingestion of 1 g effervescent elemental calcium (Novartis, Montreal, Canada). A light breakfast (2 toasts, black coffee) was allowed, and 2 glasses (300 ml) of water given at 9 AM and 11 AM. Lunch was delayed until after the final urine was collected (13 PM). Urine samples were transported to our institution on the same day, and biochemical analyses performed on the following day.

**Biochemical analyses.** Biochemical analysis of urine and serum samples was performed by an autoanalyzer. Urine oxalate levels were determined by an enzymatic assay (Sigma Diagnostics, St Louis, Missouri). Serum  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  levels were measured by a radioimmunoassay (Incstar, Stillwater, Minnesota). Inter-assay variation coefficient was 24.4% on a control test sample and 11.2% on a sample with increased (+50%) levels. Serum intact parathyroid (PTH) levels were

assessed using a radioimmunoassay kit (Nicholls Institute, San Juan Capistrano, California).

### *Genotyping*

DNA was extracted from peripheral leukocytes or from established lymphoblastoid cell lines. We used a polymorphic marker (D12S90) in linkage disequilibrium with the putative  $1\alpha$ -hydroxylase gene on chromosome 12q (VDD1 locus<sup>28</sup>), as well as centromeric (D12S368) and telomeric (D12S83) markers to D12S90 from the Généthon map spanning a 9 cM region. We enzymatically amplified the dinucleotide repeats from genomic DNA in 96-well plates using a thermal cycler (PTC-100; MJ Research Inc., Watertown, Massachusetts) in 30 cycles of PCR with one of 2 primers end-labeled ( $\gamma$ P32) under standard conditions. PCR products were submitted to denaturing gel electrophoresis (6% polyacrylamide, 7M urea, 1X TBE) and genotypes were determined from reading the major bands for each subject. Allele numbers were assigned starting at 1 for the shortest allele, and increasing by 1 for each step of 1 dinucleotide repeat.

### *Linkage analyses*

All genetic analyses were performed using programs compiled on a Sun ULTRA 1 workstation. The MULTIMAP and CRIMAP programs<sup>29</sup> were used to order the markers and calculate genetic distances on our pedigrees. The most likely order (with a likelihood ratio at least 1000:1 over the next best order) was (D12S368-D12S90-D12S83) with sex-averaged intervals of 6.7 and 2.3 cM. This is similar to data published by Généthon.

**Affected sib-pair method.** Genetic linkage between markers and traits was analyzed with parameter-free methods. For qualitative traits, the number of alleles shared identical-by-descent in affected pairs of a sibship was compared to the proportion expected under the hypothesis of independent segregation of marker and trait using the SIBPAIR program (ANALYZE package) and SIBPAL programs (version 2.6) from the S.A.G.E. package<sup>30</sup>. We also used the MAPMAKER/SIBS

program (version 2.1) <sup>31</sup> to calculate multipoint Lod scores (MLS or maximum likelihood scores) and allele sharing with all 3 markers. To extract all of the pair data available, we used all pairs available from a sibship, weighted according to the number of independent pairs, i.e. number of sibs minus 1. Allele frequencies were estimated from founders in the families. We used 2 affection status in pairs of siblings, according to the severity of the disease (sibs concordant for at least one episode of stone passage, and for at least 3 episodes). An age-of-onset covariate computed with the subroutine program AGEON (version 2.2) of S.A.G.E. was included, based on the information available in the pedigrees. This program uses maximum likelihood methods to estimate parameters of the distribution of age of onset in 6 different classes, determined by each parent's affection status (affected, unaffected, unknown). Quantitative linkage analyses were performed using the squared sib-pair trait difference regressed on the number of alleles shared identical-by-descent. Urine collections with 24-hour creatinine excretions within 20% of that predicted by the Cockcroft-Gault formula <sup>32</sup> were used. Regressions were performed under 3 scales of measurements (untransformed, square root, and log-transformed).

**Transmission disequilibrium test.** We used the TDTLIKE program of the ANALYZE package as an intrafamilial association test on multiplex as well as simplex pedigrees <sup>33</sup>. This test has been shown to be a powerful alternative to sib-pair analysis in detecting genes in gametic disequilibrium, and evaluates all affected offspring of heterozygous parents for a given allele, comparing the frequency with which they transmit this allele with the frequency with which they transmit the other allele to their affected children <sup>34</sup>. In this program, exact P values from a binomial distribution are computed looking at the probability of the allele under analysis transmitted X or more times to affected offspring of heterozygous parents out of (X+Y) opportunities. To reduce the number of necessary tests one should correct for in an unbiased way, only alleles which have at least five opportunities to be transmitted were considered, and P values were corrected for multiple testing. A likelihood-ratio based TDT test which considers all alleles jointly and allows that



one allele be transmitted to affected offspring but not the other alleles, was also performed, as implemented in the TDTLIKE program <sup>33</sup>. Missing parental genotypes were completed when genetic information in the pedigree allowed unequivocally to reconstruct parental haplotypes.

## RESULTS

### *Sibships and siblings*

Table 1 describes the pedigrees as well as the number of corresponding sibships and their sizes. The pedigrees comprised 469 individuals (including intervening deceased relatives) and DNA was available for 342 of them. A total of 237 same-generation siblings (affected and unaffected) underwent clinical evaluation that included a 24-hour urine collection, a calcium loading test and serum biochemical analyses. Clinical characteristics are shown in table 2. There were no differences in, body mass index, height or weight in affected versus unaffected male or female sibs (not shown). There was a significant difference in unaffected/affected ratios between male and female siblings ( $P < 0.001$ ) in complete sibships. Three sets of identical twins were phenotyped (only one twin included in the analyses). Two were concordant for the presence of kidney stones and were recurrent stone-formers ( $> 3$  episodes), and one pair was discordant, with the affected twin having passed a single stone during pregnancy. Crystallographic or biochemical analysis of stones was available for all probands and in 22 affected siblings from 14 sibships (27 stones). Of those, 24 were predominantly calcium stones (18 predominantly calcium-oxalate, 4 calcium-phosphate, 1 mixed calcium-phosphate and oxalate), 3 were ammonium magnesium phosphate, and 1 uric acid (spouse with a known history of uric acid nephrolithiasis). Relatives with the latter 2 types of stones were assigned an undetermined affection status, as were 2 other siblings (affected) with inflammatory bowel disease and previous parathyroidectomy for hyperparathyroidism, respectively.

### *Intermediate phenotypes in siblings*

Phenotype characteristics are also included in table 2. There were significant differences in 24-h calciuria corrected for body weight between affected and unaffected siblings. However, this difference was only significant in females. There were also significant increases in fasting and net ( $\Delta$ ) calcium/creatinine ratios in affected compared to unaffected siblings. 24-h urinary oxalate excretion was increased in stone-forming siblings compared to non stone-formers. Serum

1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> levels were slightly increased in affected siblings. No significant differences in serum phosphate, calcium and intact PTH levels were noted between stone-forming and non stone-forming sibs (data not shown).

*Genetic linkage analysis of the 1 $\alpha$ -hydroxylase locus with stone passage*

We identified 9, 9, and 13 alleles respectively, for the D12S368, D12S90, and D12S83 dinucleotide markers. Marker allele frequencies were not significantly different from those published by the Genethon ([www.genethon.fr](http://www.genethon.fr)). Table 3 describes the allele sharing among sibs, as well as corresponding significance values, and shows no evidence for excess in alleles shared at the D12S90 locus. No linkage was present when male-male or female-female pairs were considered independently (data not shown). Multipoint analysis enabled to extract 94% of the inheritance information, and also confirmed the lack of linkage at the D12S90 locus. The exclusion routine (LOD score < -2.0) of MAPMAKER/SIBS excluded the D12S90 locus at  $\lambda_d$  values of 2.0 and 3.25, for the single and recurrent, and the recurrent stone passage phenotypes, respectively. The TDTLIKE program of the ANALYZE package was also used on multiplex as well as simplex pedigrees. As shown in table 4, no evidence for segregation distortion in allele transmission was present in this subset of pedigrees, confirming the absence of linkage to the D12S90 locus. Therefore, the results suggest that allelic variation at the putative 1 $\alpha$ -hydroxylase locus is not associated with susceptibility to calcium kidney stone formation.

*Genetic linkage analysis of the 1 $\alpha$ -hydroxylase locus to vitamin D levels and calciuric phenotypes*

Given the possibility that sibships might include phenocopies, which would decrease the power of our study, it is appropriate to determine whether genetic variation at the VDD1 locus is linked to intermediate phenotypes relevant to calcium handling and idiopathic hypercalciuria. This is particularly justified since affected sibs in our pedigrees demonstrate several characteristics related to idiopathic hypercalciuria. We performed genetic linkage analyses on serum 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> levels, 24-hour calciuria and oxaluria (since intestinal oxalate absorption is indirectly coupled to calcium absorption) on complete urine collections, and calcium/creatinine ratios

before and after an oral calcium load. As demonstrated in table 5, no evidence for linkage to any of the quantitative traits was obtained under 3 scales of measurements (untransformed, square root, and log-transformed). Multiple test-corrected, marginally significant P values were noted for 24-hour oxaluria, but when the analyses were carried on the entire sib-pair group (and not the smaller group where genotypes are available for all 3 markers), no significant values were noted (not shown). This suggests that, in addition to the lack of linkage of D12S90 to the discrete traits (with relaxed and stringent definitions), no linkage to quantitative traits relevant to vitamin D physiology and hypercalciuria is present in these sibships.

## DISCUSSION

We have conducted genetic linkage studies of the putative  $1\alpha$ -hydroxylase locus in sibling pairs from large pedigrees of French Canadian descent, a genetically homogeneous population with an elevated birth rate until recently, and located within a well-defined geographic area because of linguistic barriers. Geographic and genetic homogeneity have the advantages of potentially reducing variability due to environmental factors, as well as the size of the oligogenic pool contributing to the disease, thus increasing the power to detect major susceptibility loci. We have used markers at close proximity with the putative locus of the  $1\alpha$ -hydroxylase gene (VDD1 locus). Pseudovitamin D deficiency rickets type 1 (VDD1) is associated with decreased plasma calcium, phosphate and  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  levels, and with severe skeletal changes. The specific response to physiologic doses of  $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ , but not to  $25(\text{OH})\text{D}_3$ , strongly suggests that it is secondary to decreased  $1\alpha$ -hydroxylase activity (likely its p450 component), or to dysfunction of a regulatory protein<sup>35</sup>. Proof that the basic defect involves  $1\alpha$ -hydroxylation has been obtained by direct assay on decidual cells from patients with the disease<sup>36</sup>. In addition, the specific enzyme deficiency has been confirmed in kidneys from pigs with the analogous disorder<sup>37</sup>. These results strongly indicate that  $1\alpha$ -hydroxylase or one of its co-factors is the defective protein, and that markers linked to VDD1 can be analyzed to evaluate whether genetic variation at this locus, presumably through a gain of function, is linked to calcium stone disease and idiopathic hypercalciuria. The analyses linking D12S90 to VDD1 have been performed, in part, on an isolated population of French-Canadians with a founder effect dated 12 generations ago, and all affected individuals from the same region carried the same allele<sup>28</sup>, implying not only linkage, but also linkage disequilibrium. This suggests that the genetic distance between the D12S90 and VDD1 loci is likely to be in the infra-centiMorgan range<sup>38</sup>, and that maximal power is achieved for linkage analyses when using this marker.

We have excluded the putative  $1\alpha$ -hydroxylase gene as a susceptibility locus that predisposes to calcium kidney stone formation in our group of multiplex sibships

using a relaxed (at least one stone passage) and a more stringent (recurrent stone-formers) affection status. Moreover, we have not found evidence that this locus explains any of the variance of intermediate phenotypes relevant to  $1\alpha$ -hydroxylase activity, including serum  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  levels, urinary calcium excretion and intestinal absorption (24-hour and following an oral calcium load), as well as 24-hour urine oxalate excretion, adding further evidence that allelic variation at this locus is not associated with relevant phenotypes. This is particularly important since a disordered regulation of  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  production has been proposed as a preeminent hypothesis to explain idiopathic hypercalciuria, a major trait contributing to calcium stone formation<sup>22</sup>. These results obviously apply to the families studied here and although they do not completely rule out the possibility that genetic variation at the  $1\alpha$ -hydroxylase locus has major effects on kidney stone formation, or on intestinal and/or renal calcium handling in certain individuals, they do indicate that hypothetical mutations of this gene must be uncommon in our stone-forming population.

We have used an affected sib-pair design, as it is well suited to situations where inheritance of the trait is complex or unknown. To our knowledge, this is the largest collection of multiplex sib-pair pedigrees with calcium kidney stone disease gathered so far. Presently, the number of pairs available for this study allows the exclusion of major loci contributing to the traits considered ( $\lambda_d$  of 2.0 and 3.25, respectively for status  $\geq 1$  and  $\geq 3$  episodes, at a recombination fraction of 0%). Additional families, or alternatively, parametric linkage analysis would be required to detect weaker genetic effects. However, kidney stone passage is a late-onset trait, and it has not been possible to phenotype both parents in all of our pedigrees to conduct segregation analyses which would indicate genetic parameters (penetrance function and gene frequency) to use in traditional parametric analyses. For intermediate quantitative traits related to calcium stone formation, no data is available on the proportion of phenotypic variability that would result from genetic effects. Segregation analyses on quantitative traits in nuclear families, as well as twin studies should be performed to provide this information. In the event that a segregation pattern consistent with that of a major gene effect is obtained (for example, well-

known major gene effects have been described for the red blood cell sodium-lithium countertransport<sup>39</sup>, and the serum angiotensin I-converting enzyme<sup>40</sup>, and immunoglobulin E levels<sup>41</sup>), parametric linkage analyses using the inferred genetic parameters (gene frequencies and corresponding phenotype levels), could be performed to corroborate our findings. This would also be valuable to demonstrate homogeneity of the results across families.

As for any study, certain notes of caution must be provided. First, the present findings only apply to the D12S90 region, and it is possible that other  $1\alpha$ -hydroxylases are present in the kidney<sup>42</sup>, which we are not able to investigate at the moment. Second, it is also possible that this locus encodes a co-factor and not the P-450 component of the enzyme, although this study would still be of significant scientific interest even if that would be the case.

We have also shown that there is familial co-aggregation of calciuric and oxaluric phenotypes with the passage of calcium and/or radio-opaque kidney stones. Although this was not the primary purpose of the study and is an expected finding considering a number of studies that have been published so far, the use of family-based controls provides a more homogeneous study design than simple case-control analysis. Affected sibs, particularly males have increased 24-hour urinary excretion of oxalate over unaffected ones, and this confirms previous case-control studies<sup>2</sup> in suggesting that mild hyperoxaluria might be an important risk factor for stone formation. Affected sibs also have increased 24-hour urine calcium excretion (particularly females), and demonstrate increased calcium absorption following a calcium loading test and increased fasting calciuria. This pattern is compatible with both increased intestinal absorption and renal excretion of calcium, and is the most frequent finding in hypercalciuric calcium stone formers. In our group of families, hypercalciuric phenotypes (24 hour calcium excretion under a moderately-restricted calcium diet, calcium loading tests) have been found to be particularly prevalent in women, with male subjects showing only a modest trend towards increased baseline 24-hour and after-loading urine calcium excretion. This was not associated with

menopause, since affected and unaffected female sibs were of comparable ages. Similar findings have been described previously<sup>43</sup>, and could reflect a decreased susceptibility for kidney stone formation in females, which would depend more on calciuric risk factors than males. Finally, we have found slightly higher serum 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> levels in stone-formers compared to controls. This is similar to some studies<sup>23-25</sup>, but at variance with others<sup>17</sup>. In view of the present linkage findings, the significance of these results is undetermined.

This study is not the first one on the analysis of candidate genes in idiopathic hypercalciuria and calcium-oxalate nephrolithiasis. A previous case-control study has demonstrated a lack of association of the vitamin D receptor locus (on the same chromosome and centromeric to the D12S90 locus) with absorptive hypercalciuria and stone formation<sup>44</sup>. Combined with our study, this suggests that neither increased vitamin D production (from increased 1 $\alpha$ -hydroxylase activity), nor action (from increased vitamin D receptor expression) is implicated in hypercalciuria and/or calcium stone formation. Other loci encoding proteins involved in calcium handling by the kidney and the intestine, in the metabolism of oxalate, or in crystallization inhibition of urine, would be interesting candidates. It will also be particularly important to look at the corresponding (syntenic) human loci of genes linked to renal calcium excretion in the genetic hypercalciuric rat. Such studies are being performed at the moment<sup>45</sup>. As further candidate genes are identified through subsequent investigations, genome-wide approaches should provide a first estimation of the number and respective weights of genetic loci linked to calcium oxalate stone formation and idiopathic hypercalciuria. However, the optimal family structure and linkage approaches remain to be defined. Ultimately, these studies should elucidate the pathophysiology of calcium stone formation and hypercalciuria.



**NOTE ADDED IN PROOF**

Since submitting this manuscript, the cDNA for 25-hydroxyvitamin D3 1 $\alpha$ -hydroxylase has been cloned in the mouse (1) and the human cDNA and genomic DNA have also been published (2). Therefore, we enzymatically amplified a sequence tag from the 3' region of the gene on a low resolution radiation hybrid panel (GB4, Research Genetics) to locate the gene relative to the sequence tag site framework map of the Whitehead Institute (3). We determined that the gene is located between markers D12S90 and D12S83 used in this study (Lodscore > 15), in agreement with recent findings (4). This confirms that we have excluded the 1 $\alpha$ -hydroxylase as a major gene for calcium oxalate kidney stone formation.

1. Takeyama K, Kitanaka S, Sato T, Kobori M, Yanagisawa J, Kato S: 25-Hydroxyvitamin D3 1 $\alpha$ -hydroxylase and vitamin D synthesis. *Science* 277: 1827-1830, 1997
2. Monkawa T, Yoshida T, Wakino S, Shinki T, Anazawa H, Deluca HF, Suda T, Hayashi M, Saruta T: Molecular cloning of cDNA and genomic DNA for human 25-hydroxyvitamin D3 1 $\alpha$ -hydroxylase. *Biochem Biophys Res Commun* 239: 527-533, 1997
3. Hudson T, Stein L, Gerety S, Ma J, Castle A, Silva J, Slonim D, Baptista R, Kruglyak L, Xu S-H, Hu X, Colbert A, Rosenberg C, Reeve-Daly M, Rozen S, Hui L, Wu X, Vestergard C, Lander E: An STS-based map of the human genome. *Science* 22: 1945-1954, 1995
4. St-Arnaud R, Messerlian S, Moir JM, Omdahl JL, Glorieux FH: The 25-hydroxyvitamin D 1 $\alpha$ -hydroxylase gene maps to the pseudovitamin D-deficiency rickets (PDDR) disease locus. *J Bone Miner Res* 12: 1552-1559, 1997

## ACKNOWLEDGEMENTS

These studies were supported by the Kidney Foundation and the Medical Research Council of Canada. A.B. is a scholar of the Fonds de Recherche en Santé du Québec. We would like to thank Kenneth Morgan, PhD, for helpful discussions.

**Table 1** Number of Calcium Stone-Forming Families and Sibships According to Disease Status

No. of Affected Siblings per Sibship	No. of Sibships	
	Status 1 <sup>a</sup>	Status 2 <sup>b</sup>
1	24	10
2	13	6
3	6	6
4	2	1
5	3	0
6	3	0
7	0	0
8	1	1
Total No. of Sibships	52	24
Total No. of Families	36	20

a: Affected individuals with at least one episode of stone passage;

b: Affected individuals with at least three episodes of stone passage.

**Table 2** Clinical Characteristics of Siblings in 36 Pedigrees with Calcium and/or Radioopaque Stones

Status	Males			Females			Total		
	Unaffected	Affected	P	Unaffected	Affected	P	Unaffected	Affected	P
No	45	68		75	49		120	117	
Age	47.1±16.7	52.1±12.5	0.08	48.2±15.1	48.1±12.6	0.98	47.8±15.7	50.4±12.7	0.16
Age of onset	--	33.3±10.7		--	30.0±11.6		--	32.0±11.1	
No episodes	--	7.6±17.7		--	3.2±2.1		--	5.8±13.8	
*Calciuria (mmol/Kg/d)	0.070±0.027 n=20	0.077±0.030 n=27	0.46	0.056±0.027 n=28	0.074±0.034 n=23	0.04	0.062±0.028 n=48	0.076±0.032 n=50	0.03
Fasting Ca/cr (mmol/mmol)	0.36±0.20 n=33	0.42±0.18 n=51	0.20	0.32±0.18 n=58	0.43±0.20 n=40	0.006	0.33±0.18 n=91	0.42±0.19 n=91	0.002
DCa/cr (mmol/mmol)	0.30±0.24 n=27	0.43±0.27 n=40	0.06	0.39±0.25 n=46	0.54±0.29 n=31	0.02	0.36±0.25 n=73	0.48±0.28 n=71	0.008
*Oxalaturia (mmol/Kg/d)	4.5±1.1 n=18	5.5±1.5 n=25	0.02	5.2±1.2 n=26	5.6±1.3 n=23	0.28	4.9±1.2 n=44	5.6±1.4 n=48	0.02
1,25(OH) <sub>2</sub> D3 (I.U./L)	51.0±15.1 n=26	55.6±15.2 n=45	0.21	50.7±16.5 n=43	59.1±14.7 n=23	0.05	50.8±15.9 n=69	57.0±15.0 n=68	0.02

All values mean±SD;

\*24-hour urine collections with variation in measured creatinine content within 20% of predicted (Cockcroft-Gault estimation).

**Table 3** Sib-Pair Linkage Analysis of Calcium and/or Radio-Opaque Stone Disease at the VDD1 (D12S90) Locus According to Severity of Disease

Type of Analysis:	No. of Pairs Sharing <sup>a</sup>		No. of Parental Alleles IBD <sup>b</sup>		Significance <sup>c</sup>	
	0 Alleles 1 Allele 2 Alleles		Shared	Not Shared	$\chi^2$	P
	Unaffected	9.9	17.9	5.0	37.4	43.6
Affected ( $\geq 1$ Episode)						
Not Affected-Affected	21.1	46.1	22.8	105.8	108.8	0.15 NS
Affected-Affected	11.9	22.0	12.8	56.9	55.9	0.03 NS
Affected ( $\geq 3$ Episodes)						
Not Affected-Affected	18.6	42.1	26.5	108.8	97.4	2.93 NS
Affected-Affected	4.3	6.8	8.4	26.8	19.7	2.60 NS

<sup>a</sup> Expected ratios are 0.25, 0.50 and 0.25 for sharing 0, 1, and 2 alleles, respectively.

<sup>b</sup> Expected shared:non-shared ratio is 50:50.

<sup>c</sup> Measurement of departure from expected 50:50 shared:non-shared ratio ( $\chi^2$  with 1 df).

**Table 4** Transmission/Disequilibrium Test of the VDD1 (D12S90) locus in 36 Kidney Stone Pedigrees

Allele	Affection Status: at Least 1 Episode		Affection Status: at Least 3 Episodes		p <sup>b</sup>
	Not Transmitted	TDT <sup>a</sup> p <sup>b</sup>	Not Transmitted	TDT <sup>a</sup> p <sup>b</sup>	
1	14	1.64	7	2.78	0.43
2	37	0.60	18	0.86	1.00
5	21	0.02	11	1.47	0.66
6	24	0.89	11	1.29	1.00
7	55	2.37	28	0.49	0.87
8	14	0.76	5	0.91	1.00

<sup>a</sup> Estimates for alleles that appear at least 5 times.

<sup>b</sup> Corrected for multiple testing.

**Table 5** Genetic Linkage Analysis of Quantitative Traits Related to Calcium Stone Formation to the D12S90 Locus with Nominal Significance Values on Three Scales of Measurement

Trait	Slope of the Regression Analysis <sup>a</sup>	P Values on Scale <sup>b</sup>		
		Untransformed	Square Root	Log
1,25(OH) <sub>2</sub> D3	+33.5	0.65	0.66	0.70
UCaV/Kg/d	-0.002	0.78	0.80	0.83
Fasting Ca/cr	+0.01	0.68	0.66	0.66
ΔCa/cr	+0.07	0.88	0.87	0.79
UOxV/Kg/d	-1.39	0.06	0.05	0.04

<sup>a</sup> Values for slopes are shown for untransformed phenotypes. Squared trait differenceLinkage is possible only when value is negative.

<sup>b</sup> P values for regression analyses of the squared differences on the alleles IBD matrix, corrected for multiple testing.

## References

1. Parks, J.H. & Coe, F.L. Pathogenesis and treatment of calcium stones. *Semin Nephrol* 16, 398-411 (1996).
2. Robertson, W.G., Peacock, M., Ouimet, D. & Heyburn, P.J. The main risk factor for calcium oxalate stone disease in man: hypercalciuria or mild hyperoxalaluria? in *Urolithiasis Clinical Basic Research* (eds. Smith, L.H., W.G., R. & Finlayson, B.) pp 3-12 (Plenum, New York, 1981).
3. Curhan, G.C., Willett, W.C., Rimm, E.B. & Stampfer, M.J. A prospective study of dietary calcium and other nutrients and the risk of symptomatic kidney stones. *N Engl J Med* 328, 833-838 (1993).
4. McGeown, M. Heredity in renal stone disease. *Clin Sci* 19, 465-471 (1960).
5. Resnick, M., Pridgen, D. & Goodman, H. Genetic predisposition to formation of calcium oxalate renal calculi. *N Engl J Med* 278, 1313-1318 (1968).
6. Robertson, W. *et al.* Studies on the prevalence and epidemiology of urinary stone disease in men in Leeds. *Br J Urol* 55, 595-598 (1983).
7. Risch, N. Linkage strategies for genetically complex traits. I. Multilocus models. *Am J Hum Genet* 46, 222-228 (1990).
8. Danpure, C.J. & Purdue, P.E. Primary Hyperoxaluria. in *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, Vol. II (eds. Scriver, C., Beaudet, A., Sly, W. & Valle, D.) 2385-2424 (McGraw-Hill, New York, 1995).
9. Lloyd, S. *et al.* A common molecular basis for three inherited kidney stone diseases. *Nature* 379, 445-449 (1996).
10. Bonnardeaux, A., Lapointe, J.Y. & Bichet, D.G. Chloride channels and hypercalciuria: an unturned stone. *J Clin Invest* 99, 819-21 (1997).
11. Calonge, M.J. *et al.* Cystinuria caused by mutations in rBAT, a gene involved in the transport of cystine. *Nat Genet* 6, 420-5 (1994).
12. Rossiter, B.J.F. & Caskey, C.T. Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase deficiency: Lesch-Nyhan syndrome and gout. in *The metabolic and molecular basis of inherited disease*, Vol. II (eds. Scriver, C., Beaudet, A., Sly, W. & Valle, D.) 1679-1706 (McGraw-Hill, New York, 1995).
13. Simmonds, H., Sahota, A. & Van Acker, K. Adenine phosphoribosyltransferase and 2,8-dihydroxyadenine lithiasis. in *The metabolic and*



*molecular bases of inherited disease*, Vol. II (eds. Scriver, C., Beaudet, A., Sly, W. & Valle, D.) 1707-1724 (McGraw-Hill, New York, 1995).

14. Coe, F., Parks, J. & Moore, E. Familial idiopathic hypercalciuria. *N Engl J Med* 300, 337-340 (1979).
15. Mehes, K. & Szelid, Z. Autosomal dominant inheritance of hypercalciuria. *Eur J Pediatr* 133, 239-242 (1980).
16. Pak, C., Kaplan, R., Bone, H., Townsend, J. & Waters, O. A simple test for the diagnosis of absorptive, resorptive and renal hypercalciurias. *New Engl J Med* 292, 497-500 (1975).
17. Coe, F. *et al.* Effects of low-calcium diet on urine calcium excretion, parathyroid function and serum 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> levels in patients with idiopathic hypercalciuria and in normal subjects. *Am J Med* 72, 25-32 (1982).
18. Levy, F., Adams-Huet, M. & Pak, C. Ambulatory evaluation of nephrolithiasis: an update of a 1980 protocol. *Am J Med* 98, 50-59 (1995).
19. Adams, N., Gray, R., Lemann, J.J. & Cheung, H. Effects of calcitriol administration on calcium metabolism healthy men. *Kidney Int* 21, 90-97 (1982).
20. Maierhofer, W., Gray, R., Cheung, H. & Lemann, J.J. Bone resorption stimulated by elevated serum 1,25 (OH)<sub>2</sub> vitamin D concentrations in healthy man. *Kidney Int* 24, 555-566 (1983).
21. Maierhofer, W., Lemann, J.J., Gray, R. & Cheung, D. Dietary calcium and serum 1,25-(OH)<sub>2</sub>-vitamin D concentrations as determinants of calcium balance in healthy men. *Kidney Int* 26, 752-759 (1984).
22. Broadus, A.E., Insogna, K.L., Lang, R., Ellison, A.F. & Dreyer, B.E. Evidence for disordered control of 1,25-dihydroxyvitamin D production in absorptive hypercalciuria. *N Engl J Med* 311, 73-80 (1984).
23. Kaplan, R., Haussler, M., Deftos, L., Bone, H. & Pak, C. The role of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D in the mediation of intestinal hyperabsorption of calcium in primary hyperparathyroidism and absorptive hypercalcemia. *J Clin Invest* 59, 756-760 (1977).
24. Shen, F. *et al.* Increased serum 1,25-dihydroxyvitamin D in idiopathic hypercalciuria. *J Lab Clin Med* 90, 955-962 (1977).

25. Gray, R., Wilz, D., Caldas, A. & Lemann, J.J. The importance of phosphate in regulating plasma 1,25-(OH)<sub>2</sub>-vitamin D levels in humans: studies in healthy subjects in calcium-stone formers and in patients with primary hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 45, 299-306 (1977).
26. Insogna, K., Broadus, A., Dreyer, B., Ellison, A. & Gertner, J. Elevated production rate of 1,25-dihydroxyvitamin D in patients with absorptive hypercalciuria. *J Clin Endocr Metab* 61, 490-495 (1985).
27. Breslau, N.A., Preminger, G.M., Adams, B.V., Otey, J. & Pak, C.Y. Use of ketoconazole to probe the pathogenetic importance of 1,25- dihydroxyvitamin D in absorptive hypercalciuria. *J Clin Endocrinol Metab* 75, 1446-1452 (1992).
28. Labuda, M. *et al.* Linkage disequilibrium analysis in young populations: pseudo-vitamin-D-Deficiency rickets and the founder effect in french canadians. *Am J Hum Gen* 59, 633-643 (1996).
29. Matisse, T.C., Perlin, M. & Chakravarti, A. Automated construction of genetic linkage maps using an expert system (MultiMap): a human genome linkage map. *Nat Genet* 6, 384-390 (1994).
30. S.A.G.E. Statistical analysis for Genetic Epidemiology. Computer program package available from the Department of Epidemiology and Biostatistics. Release 2.2 edn (, Case Western University, Cleveland, 1994).
31. Kruglyak, L. & Lander, E. Complete multipoint sib-pair analysis of qualitative and quantitative traits. *Am J Hum Genet* 57, 439-454 (1995).
32. Cockcroft, D.W. & Gault, M.H. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron* 16, 31-41 (1976).
33. Terwilliger, J. A powerful likelihood method for the analysis of linkage disequilibrium between trait loci and one or more polymorphic marker loci. *Am J Hum Genet* 56, 777-787 (1995).
34. Spielman, R., McGinnis, R. & Ewens, W. Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin dependent diabetes mellitus (IDDM). *Am J Hum Genet* 52, 506-516 (1993).
35. Prader, A., Illing, R. & Heierli, E. Pseudovitamin D deficiency (vitamin D dependency). in *Inborn errors of calcium and bone metabolism* (eds. Bickel, H. & Stern, J.) 115-123 (University Park Press, Baltimore, 1976).

36. Glorieux, F.H., Arabian, A. & Delvin, E.E. Pseudo-vitamin D deficiency: absence of 25-hydroxyvitamin D 1 alpha- hydroxylase activity in human placenta decidual cells. *J Clin Endocrinol Metab* 80, 2255-2258 (1995).
37. Winkler, I., Schreiner, F. & Harmeyer, J. Absence of renal 25-hydroxycholecalciferol-1-hydroxylase activity in a pig strain with vitamin D-dependent rickets. *Calcif Tissue Int* 38, 87-94 (1986).
38. Feingold, I. Le déséquilibre de liaison. *Médecine/Sciences* 7, 161-168 (1991).
39. Hasstedt, S.J., Wu, L.L., Ash, K.O., Kuida, H. & Williams, R.R. Hypertension and sodium-lithium countertransport in Utah pedigrees: evidence for major-locus inheritance. *Am J Hum Genet* 43, 14-22 (1988).
40. Tiret, L. *et al.* Evidence, from combined segregation and linkage analysis, that a variant of the angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene controls plasma ACE levels. *Am J Hum Genet* 51, 197-205 (1992).
41. Dizier, M.H. *et al.* Detection of a recessive major gene for high IgE levels acting independently of specific response to allergens. *Genet Epidemiol* 12, 93-105 (1995).
42. Wikwall, K. *et al.* Evidence for multiple 25-hydroxyvitamin D3 1 $\alpha$ -hydroxylases in the kidney. in *10th workshop on vitamin D* 144 (, Strasbourg, France, 1997).
43. Parks, J.H., Coe, F.L. & Strauss, A.L. Calcium nephrolithiasis and medullary sponge kidney in women. *N Engl J Med* 306, 1088-1091 (1982).
44. Zerwekh, J.E. *et al.* Evidence for normal vitamin D receptor messenger ribonucleic acid and genotype in absorptive hypercalciuria. *J Clin Endocrinol Metab* 80, 2960-2965 (1995).
45. Hoopes Jr, R.R., Reid, R., Thakker, R.V., Bushinsky, D.A. & Scheinman, S.J. Genetic analysis of the hypercalciuric rat, a model for human idiopathic hypercalciuria [Abstract]. *J Am Soc Nephrol* 7, 1598 (1996).

## 8.2 Le récepteur de la vitamine D

Hypothèse : Une variation génétique au ou près du locus du récepteur de la vitamine D est liée à la néphrolithiasique calcique et/ou aux phénotypes intermédiaires associés.

Rationnelle : Comment expliquer que certains patients avec hypercalciurie absorptive ne présentent pas d'élévation de vitamine D<sup>78</sup>. Les résultats obtenus chez le rat lithiasique hypercalciurique<sup>86</sup> et chez les patients avec calculs rénaux<sup>112</sup> suggèrent que des mécanismes autres que la régulation anormale de la vitamine D sont responsables de l'hypercalciurie puisqu'une augmentation intestinale de l'absorption de calcium s'effectue même lorsque les niveaux sériques de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> sont normaux. Ceci suggère une régulation anormale du récepteur de la vitamine D dans les cellules intestinales<sup>113</sup>, soit par une sensibilité accrue du récepteur ou soit par un contenu plus élevé. L'amplification de la réponse du récepteur expliquerait l'hypercalciurie lorsque les niveaux de vitamine D sont normaux.

Conclusions : Cette étude, telle que publiée dans le « Journal of the American Society of Nephrology » (10 : p1007-1013 (1999)), a démontré une liaison à la néphrolithiasique avec un marqueur près du récepteur de la vitamine D (D12S339, P=0.01), aussi bien qu'avec des marqueurs adjacents (D12S1663: P=0.03 et D12S368: P=0.01). Par contre, ces résultats n'ont pas été confirmés par le criblage du génome (c.f. section 9.6). L'analyse de la calciurie suggère une liaison positive avec quelques marqueurs. Au meilleur de notre connaissance, cette étude est la première à établir une liaison d'un locus génétique à la formation d'urolithiasiques calciques.

**Suggestive Evidence for a Susceptibility Gene Near The Vitamin D Receptor Locus In Idiopathic Calcium Stone Formation**

**Authors:** Patrick Scott, Denis Ouimet, Luc Valiquette, Gérald Guay, Yanick Proulx, Marie-Lucie Trouvé, Bernard Gagnon, Alain Bonnardeaux.

Article publié dans la revue "Journal of the American Society of Nephrology", volume 10, numéro5, pages 1007-1013 (1999).

**ABSTRACT**

Calcium is the principal crystalline constituent in up to 80% of kidney stones. Epidemiological studies have suggested that genetic predisposition plays a major role in the etiology of this condition. We have evaluated by a candidate-gene approach whether the vitamin D receptor (VDR) locus on chromosome 12q12-14 is implicated in idiopathic hypercalciuria and calcium nephrolithiasis in a cohort of 47 French Canadian pedigrees. These comprised 54 sibships with a total of 303 pairs of siblings concordant for  $\geq 1$  stone episodes. We provide evidence for linkage to nephrolithiasis with microsatellite marker D12S339 (near the VDR locus,  $P=0.01$ ) as well as with flanking markers (D12S1663:  $P=0.03$  and D12S368:  $P=0.01$ ). Inclusion of unaffected sibs in the analyses also supported evidence for linkage. Quantitative trait linkage analysis of urinary calcium excretion yielded linkage to some but not all markers. To our knowledge, this is the first study to suggest linkage for idiopathic calcium stone formation.

## INTRODUCTION

Calcium stone passage is a frequent event that can have important consequences for patients and health care systems. Large epidemiological studies have shown familial clustering of idiopathic calcium nephrolithiasis passage<sup>1-4</sup>. A positive family history is the single most important risk factor, after controlling for known dietary factors<sup>5</sup>. Thus, idiopathic calcium stone formation is thought to require the interaction of genetic and/or environmental factors<sup>6</sup>. The trait is suspected to be polygenic<sup>2</sup>, and related in part to the excretion of excessive amounts of calcium in the urine, or idiopathic hypercalciuria. Hypercalciuria is present in up to 40% of stone-formers<sup>7</sup>, and less than 10% in the general population<sup>8</sup>.

Several lines of evidence suggest that allelic variation at the vitamin D receptor (VDR) locus could be linked to hypercalciuria and hence, to the formation of calcium stones. First, hypercalciuria is frequently associated with increased intestinal absorption of calcium<sup>7</sup>. The only known hormonal stimulus for intestinal absorption of calcium is via the 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub> and its receptor. Second, a previous study has suggested that activated lymphocytes from patients with hypercalciuria have increased VDR number<sup>9</sup>. Third, hypercalciuric calcium stone-formers have reduced vertebral mineral density<sup>10-12</sup>, and genetic variation at the VDR locus has been associated with bone mineral density in some<sup>13-16</sup>, but not all studies<sup>17-21</sup>. Finally, VDR genotypes have been associated with intestinal absorption of calcium in women<sup>22,23</sup>.

Here we present the results of a sib-pair linkage study performed in large sibships of French Canadian descent in which we tested for potential linkage of the VDR locus to idiopathic calcium stone formation and relevant quantitative traits. The French Canadian population, due to its demographic history, is relatively homogeneous, and

represents an interesting population to map complex traits, as the oligogenic pool contributing to a given trait is likely to be smaller.



## SUBJECTS AND METHODS

### *Pedigrees*

All families were recruited from several specialized renal stone clinics and a lithotripsy unit in Montreal and Quebec City. The study was approved by institutional research ethics boards and informed consent was obtained from each subject. Affected and unaffected siblings and parents, or intervening relatives when the parents were deceased, were interviewed as previously described<sup>24</sup>. Families were ascertained through a single proband with at least one calcium stone episode verified by: crystallographic or biochemical analysis when available, or intravenous pyelogram (radiodense stone). Overall, crystallographic analysis was available for 57% of probands (27/47), biochemical analysis for 26% (12/47) and radiodense stone for 17% (7/47). Available hospital records (abdominal ultrasounds and x-rays) were reviewed to confirm unaffected status for healthy relatives. Individuals with a history of urinary tract infection or with any secondary condition that might predispose to kidney stones (i.e. inflammatory bowel disease, hyperparathyroidism) were attributed an undetermined affection status. After carefully reviewing hospital records, and verification for potential paternity and mishandling problems, 47 pedigrees comprising 569 founder and non-founder subjects, totaling 54 sibships and 303 pairs of siblings concordant for  $\geq 1$  stone episode, were included in the study (table 1). Both parents were available in 12 sibships, one parent in 24 sibships and no parent in 18 sibships. Affected males passed, on average,  $4.9 \pm 11.7$  stones whereas affected females passed  $4.0 \pm 10.0$  stones. Age of onset for males was  $34.2 \pm 11.8$  year and for females  $31.5 \pm 12.5$ .

### *Intermediate Phenotypes*

Age, sex, weight, height and sitting blood pressure were obtained in each relative participating in the study. The phenotyping protocol<sup>24</sup> entailed a single 24-hour urinary collection and a supervised calcium loading test. Standard biochemical analysis of urine and serum samples was performed by an autoanalyzer.

### *Radiation Hybrid (RH) Mapping*

A sequence tag (STS) of the coding region of the VDR gene<sup>25</sup> was enzymatically amplified in triplicate on a low-resolution RH panel (GeneBridge 4 panel, Research Genetics, Huntsville, ALA) according to standard methods. This allowed to map the VDR gene relative to the human genome RH map<sup>26</sup> using the Whitehead Institute/MIT server (URL: <http://www-genome.wi.mit.edu>). We then amplified flanking, highly polymorphic markers on a high-resolution RH panel (TNG3 panel, Research Genetics, Huntsville, ALA) and mapped markers relative to the VDR locus. We used the RHMAP program to order STSs relative to each other<sup>27</sup>.

#### Single Strand Conformation Polymorphisms (SSCP) and DNA Sequencing

The entire VDR coding region DNA (4.6 Kb) was enzymatically amplified in 10 overlapping segments (see Table 2) from peripheral monocyte cDNA of 15 unrelated subjects with a history of calcium stone formation. RNA was first extracted from peripheral monocytes of heparinized whole blood samples using the TRIzol LS Reagent protocol (GibcoBRL, Gaithersburg, MD), and reverse-transcribed with the M-MLTV reverse transcriptase (GibcoBRL, Gaithersburg, MD). The detection of DNA variants was performed by single stranded conformational polymorphism of enzyme-restricted fragments (size approximately 150 bp) under 3 different conditions as described<sup>28</sup>. Direct DNA sequencing was performed on double-stranded gel-purified variant PCR products (silicagel procedure, QIAGEN, Valencia, CA) using a standard sequencing Kit (New England Biolabs, Beverly, MA).

### *Genotyping*

Highly polymorphic markers from Généthon <sup>29</sup> were selected to encompass the VDR locus. Genotypes were determined following <sup>32</sup>P-dATP or Cy5 end-labeled PCR amplification of genomic DNA extracted from peripheral leukocytes <sup>30</sup> and submitted to denaturing gel electrophoresis (ALF*express* DNA SEQUENCER, Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden).

Individuals were also genotyped with two restriction fragment length polymorphisms (RFLP) of the VDR gene located at cDNA nucleotide positions 117 of exon 2 and 3302 of exon 9. Primer sequences (5' to 3') for amplification of exon 2 were: VDR2a AGCTGGCCCTGGCACTGACTCTGCTCT and VDR2b ATGGAAACACCTTGCTTCTTCTCCCTC <sup>31</sup>; and for exon 9: VDRS3229 TGTATTGGTCCAGCTTGCTCT and VDRR3482: CAGGGTTTCTCCATGTTGGT. Amplified products from exon 2 and exon 9 were respectively digested with the restriction enzymes *FokI* (New England Biolabs, Beverly, MA) and *Tru9I* (Boehringer Mannheim, Laval, Canada) overnight at 37°C and electrophoresed in a 2% agarose gel containing ethidium bromide. The undigested allele was termed allele 1 and the digested allele 2. To increase polymorphic content, the genotypes for these two RFLPs were combined for each individual. The most likely haplotype was determined using the SIMWALK2 program <sup>32</sup>.

### *Linkage Analysis*

Genetic distances between the markers were computed using the CRIMAP and MULTIMAP programs <sup>33,34</sup> from our data. Genetic linkage analysis was performed using the affected sib-pair method. Allele frequencies were estimated from founders of the pedigrees <sup>35</sup>. Linkage analyses were performed using affected siblings with at least one verified episode of stone passage. Statistical analysis between the disease and the panel of markers in the VDR region was performed with the SIBPAIR program of the ANALYZE package <sup>35</sup>. This program performs a sib-pair analysis on all sib-pairs in the data set. When there are multiple sibs in a

sibship, it weighs the pairs according to the sibship size<sup>36</sup>. When the parents are untyped at the marker locus, the program computes the likelihood of each possible genotype, and calculates the number of alleles shared identical-by-descent (I.B.D.) in a sib-pair as the average over all possible parental genotype combinations, weighted by their conditional probabilities given the known data.

The Sib-Pair Linkage Analysis Program (SIBPAL) was also used to detect linkage between the putative trait loci and microsatellite markers in the VDR region<sup>37</sup>. For dichotomous traits, a test is performed to determine if the mean I.B.D. is greater than 50% for full-sibs (mean I.B.D. for half-sibs was also included in the test). This information is then used to regress the squared sib-pair trait difference over mean I.B.D.<sup>38</sup>. The SIBPAL program was also used for quantitative trait mapping. The aim was to identify whether a genetic locus at or near the VDR gene contributes to the variation of several biochemical parameters relevant to calcium nephrolithiasis. Parental data and complete sibship data were used.

## RESULTS

### *Intermediate Phenotypes*

The 24-hour urine excretion of calcium and oxalate as well as fasting and net delta calcium/creatinine ratios (delta Ca/cr: difference between post-calcium load ratio and fasting ratio) are shown in table 3. These results have been updated using newly ascertained kindreds <sup>24</sup>. Affected siblings in this group of families excreted significantly more calcium in their urine than unaffected ones. Gender-specific comparisons revealed that affected female sibs excreted significantly more calcium per 24-h ( $0.086 \pm 0.051$  vs  $0.063 \pm 0.037$  mmol/kg per 24h,  $p=0.008$ ) and had higher fasting ( $0.47 \pm 0.40$  vs  $0.35 \pm 0.21$  mmol/mmol,  $p=0.01$ ) and net delta ( $0.77 \pm 0.76$  vs  $0.47 \pm 0.32$  mmol/mmol,  $p=0.002$ ) urine calcium/creatinine ratios. Affected male sibs excreted significantly more calcium per 24-h ( $0.084 \pm 0.043$  vs  $0.067 \pm 0.026$  mmol/kg per 24h,  $p=0.04$ ). However, no significant difference was observed for fasting and delta calcium/creatinine ratios.

### RH Mapping

A sequence tag of the VDR gene was assigned to chromosome 12q12-14 confirming previously published data <sup>39</sup>. We next mapped a highly polymorphic marker from Généthon (D12S339) close to the tag as well as 2 flanking markers (D12S1663 and D12S368). We established a radiation hybrid map that contains 4 STS. The order of loci was the following: D12S1663-VDR-D12S339-D12S368 with a lod score of 2.3 over the next best order that would place VDR between D12S339 and D12S368.

### Linkage Analysis

A total of five microsatellite markers spanning the candidate region (12q12-14) and two combined RFLPs (*FokI-Tru9I*) located in the coding region of the VDR gene were used for linkage analysis. Map position and sex-averaged genetic distances between markers are described in table 4. Locus order and distances are in accordance with those of Généthon <sup>29</sup>. Results of linkage analyses between these markers and nephrolithiasis are also summarized in table 4. Affected sib-pair

analysis provided some evidence for linkage of markers D12S1663, D12S339, and D12S368 to calcium stone passage. Inclusion of unaffected individuals in the analyses also showed evidence for linkage to markers D12S1663, *FokI-Tru9I*, D12S339 and D12S368. This excess in allele sharing over a large region (11.2cM) containing 4 highly polymorphic markers suggests the presence of a susceptibility gene between the D12S1663 and D12S368 markers in this dataset.

Since incorrect assumptions about marker allele frequencies can substantially affect the significance of linkage results, we determined the effect of systematically perturbing allele frequencies at all marker loci. We used allele frequencies: 1) estimated by Généthon, 2) based on all individuals from our database, 3) equal frequencies, 4) inverted frequencies between 2 to 3 pairs of alleles, and 5) doubling of frequencies for the 2 most common alleles. P-value ranges for linkage (SIBPAIR program only) to stone passage were: 1) D12S1663 [0.009-0.03], 2) D12S339 [0.005-0.01] and 3) D12S368 [0.002-0.02]. P-value ranges for affecteds and unaffecteds were: 1) D12S1663 [0.03-0.05], 2) D12S339 [0.03-0.05] and 3) D12S368 [0.01-0.02], but was constant at 0.0004 for *FokI-Tru9I*. Thus, the results are robust to allele frequency misspecification.

#### Quantitative Trait Locus Mapping

Given the presence of suggestive linkage to this region, we then performed linkage analysis on traits relevant to calcium oxalate stone formation. Results of the linear regressions between the sib-pair squared differences and the proportion of genes I.B.D. at the marker loci are summarized in table 5. Suggestive linkage was found between marker D12S368 and 24-h urine calcium excretion and between marker D12S339 and calcium absorption ( $\Delta$  Ca/cr). The effect of incorrect assumptions of marker allele frequencies was assessed as above. P-values for QTL linkage analyses ranged from 0.004 to 0.007 for 24-h calciuria and marker D12S368, and from 0.001 to 0.003 for  $\Delta$  Ca/cr and marker D12S339. Since linkage to flanking markers was not present, these results are inconclusive at the moment and we cannot confirm that this locus would be linked to 24h calciuria or intestinal calcium absorption.

### SSCP analysis and exonic polymorphisms of the vitamin D receptor sequence

SSCP analysis and DNA sequencing were performed on 15 affected unrelated probands in an attempt to identify functional polymorphisms of the coding region of the VDR gene that could explain the trait. Nine single-base pair polymorphisms were detected, and located in the untranslated region except for T<sup>117</sup>→C and T<sup>1171</sup>→C which were conservative substitutions located in the coding region (table 6). One polymorphism resulted in a T to C transition, which abolished the first putative start codon. This polymorphism has been previously described<sup>16,40,41</sup>.

## DISCUSSION

We have evaluated whether the VDR locus on chromosome 12q12-14 is implicated in idiopathic calcium nephrolithiasis in a cohort of large French Canadian pedigrees with idiopathic hypercalciuric calcium stone formation. The results suggest the presence of a susceptibility locus, since there was significant allele-sharing excess with 4 markers in a region spanning 11.2 cM. Moreover, P-values were robust to misspecification of allele frequencies. This is expected to reduce the probability of obtaining spurious results.

Although there is a possibility that the predisposing gene might be the VDR gene itself, confirmation of this hypothesis is not possible given the study design and results. Quantitative trait analysis of urinary calcium excretion values provided inconclusive evidence for linkage in our population, since some but not all markers showed linkage. A careful search for polymorphisms has shown conservative substitutions within the coding region. The role of these polymorphisms, as well as that of a frequent transition leading to the loss of the first putative initiation codon<sup>40</sup>, on VDR structure and function and on the pathogenesis of hypercalciuria, are unknown. A case-control study in hypercalciuric nephrolithiasis subjects has revealed the absence of association between hypercalciuria or stone formation with VDR genotypes in a Caucasian American population<sup>42</sup>. This might suggest that a putative susceptibility locus on chromosome 12q12-14 is not the VDR gene itself. A gene relevant to nephrolithiasis in this region, the 1,α-hydroxylase gene, which maps between markers D12S90 and D12S83 by radiation hybrid mapping, has been excluded in a previous study<sup>24</sup>. Further analysis of the genes located in this region does not reveal obvious candidates.

Interestingly, preliminary results of genetic linkage studies in crosses of an experimental rat model of genetic hypercalciuria and calcium stone formation have provided evidence for the presence of a quantitative trait locus at the telomere of rat chromosome 7q<sup>43</sup>. This region comprises a synteny group that includes genes



encoding the vitamin D receptor and the SP1 transcription factor<sup>44</sup>, phenylalanine hydroxylase<sup>45,46</sup> and the retinoic acid receptor- $\gamma$ <sup>47</sup>. The genetically hypercalciuric rat model shows several features present in human hypercalciuric stone-formers and might be a relevant model. These include: 1) increased intestinal calcium absorption<sup>48</sup>; 2) a defect in renal calcium reabsorption<sup>49</sup>; and 3) an increased number of vitamin D<sub>3</sub> receptors in the gut<sup>50</sup>.

To our knowledge, this is the first study to suggest linkage for idiopathic calcium stone formation. However, the statistical significance of our results is still relatively modest, considering that many regions with nominal P-values of 0.05 are expected to occur by chance if one would perform a genome-wide scan<sup>51</sup>. In contrast to simple Mendelian traits, the identification of susceptibility loci by linkage analysis for most complex traits has proven difficult. One explanation is that the power of linkage analysis is influenced by the relative contribution of a susceptibility gene to the disease. It has been argued that linkage analysis using sib-pairs has limited power for loci with weak effects, i.e.  $\lambda_s < 1.5$ <sup>52</sup> ( $\lambda_s$ : a ratio of the risk for sibs compared with population prevalence<sup>53</sup>). This is well exemplified by two recent reports on type 1 diabetes (IDDM)<sup>54,55</sup>. Despite very large sample sizes, only the well-established linkage to the HLA region ( $\lambda_s=3.2$ ) has been confirmed by both studies, but not a dozen or so previously reported hits<sup>54</sup>. This suggests that even for loci with a moderate effect ( $\lambda_s$  between 1.5 and 2.0), highly significant evidence for linkage will be difficult to obtain given a practical number of pedigrees. Therefore, independent confirmation of our results at the VDR locus will be important to support its main conclusion. Further studies should also focus on using more powerful intrafamilial association methods<sup>56</sup>.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

This study was supported by the kidney Foundation and the Medical Research Council of Canada. A.B. is a scholar of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec. We would like to thank Kenneth Morgan, PhD, for helpful discussions. Some of the results of this paper were obtained by using the program S.A.G.E., which is supported by a U.S. Public Health Service Resource Grant (1 P41 RR03655) from the National Center for Research Resources.

**Table 1** Number of calcium stone-forming families and sibships.

No. of Affected Siblings per Sibship	No. of Sibships
2	23
3	14
4	4
5	6
6	5
7	1
11	1
<b>Total No. of Sibships (families)</b>	<b>54 (47)</b>

**Table 2** Primers for SSCP analysis of the cDNA sequence of the vitamin D receptor gene and the respective restriction enzymes used for generating smaller fragments (~150bp).

Sense primer <sup>a</sup>	Reverse primer	Restriction enzyme
29: ccagaagccttgggtctgaa	554: agtggggctcgtaggtcttat	BstI/StyI
491: gaggagcagcagcgcatt	970: ggacatgtcgtccatggtgaa	EarI/SexAI
910: aagtgccattgaggtcat	1405: tcctagtccaggagatctcatt	MboII/SmaI
1338: ctgagtgcagcatgaagctaa	1902: gggatgttggggcactgaa	HphI/StuI
1829: tctcctgccttactccagata	2324: agaagatgcggctcactgctt	StyI/BamHI
2235: ctctcggatcaccgagagta	2764: atctgaagaagcctctgtgat	HindfI/BglI
2706: tgtgcgggaccggtacagaaa	3251: gaagagcaagctggaccaata	StyI/KpnI
3191: tctagggagagacccttgttt	3683: cctgtcctggtccacttctaa	MspI/MspI
3615: gatcgtgccgttactctcaa	4118: ttccttggaggagtggccta	Sau3AI/StuI
4048: cttcggggaactcctgaaata	4581: cagcagtactgcaaacaag	BanI/Asp700

a: The number gives the 5'-nucleotide position according to the published cDNA sequence of the VDR gene on the respective strand<sup>25</sup>.

**Table 3** Clinical characteristics of siblings in 47 pedigrees with calcium and/or radioopaque stones.

Status	Unaffected	Affected	P-values
*Calciuria (mmol/Kg/d)	0.065±0.033 n=91	0.085±0.047 n=139	0.0005
*Oxaluria (mmol/Kg/d)	4.84±1.42 n=90	5.05±1.72 n=137	0.33
Fasting Ca/cr (mmol/mmol)	0.36±0.23 n=159	0.43±0.33 n=205	0.01
Delta Ca/cr (mmol/mmol)	0.48±0.35 n=128	0.60±0.65 n=174	0.05

All values mean±SD; Affected individuals with at least one verified stone passage.  
Delta Ca/cr: difference between post-calcium load ratio and fasting ratio.

\* 24-hour urine collections with creatinine excretion within 20% of predicted value (Cockcroft-Gault estimation <sup>57</sup>).

Table 4 Sib-pair analysis on nuclear families.

Marker locus	P.I.C.	Theta (cM)	No. Pairs	SIBPAL			SIBPAIR			
				Mean I.B.D.	P- Values <sup>a</sup>	P- Values <sup>a</sup>	Mean I.B.D.	P- Values <sup>b</sup>	Mean I.B.D.	P- Values <sup>b</sup>
D12S87	0.77	6.2	303	0.51	0.17	0.28	0.51	0.29	0.51	0.25
D12S1663	0.68	3.1	289	0.53	0.02	0.05	0.55	0.03	0.53	0.05
<i>FokI-Tru91</i>	0.70	2.5	254	0.53	0.12	0.00002	0.54	0.10	0.58	0.0004
D12S339	0.88	5.6	294	0.55	0.000007	0.05	0.55	0.01	0.53	0.05
D12S368	0.78	6.4	302	0.54	0.0001	0.02	0.56	0.01	0.54	0.01
D12S90	0.74		299	0.52	0.19	0.42	0.52	0.19	0.51	0.38

a. P-values for the mean test and the linear regression analysis, respectively.

b. P-values for the likelihood based test for affected sib-pairs only and for affecteds and unaffecteds, respectively.

P.I.C.: Polymorphism Information Content; I.B.D.: Identity by Descent.

**Table 5** Quantitative trait linkage analysis of the VDR region with phenotypic traits relevant to calcium nephrolithiasis\*.

	UCa/kg per day	UOx/kg per day	UCa/cr(fast)	Delta Ca/cr
D12S87	0.94	0.40	0.24	0.58
D12S1663	0.33	0.50	0.75	0.94
<i>FokI-Tru9I</i>	0.26	0.91	0.69	0.99
D12S339	0.96	0.25	0.10	0.002
D12S368	0.006	0.42	0.96	0.96
D12S90	0.62	0.55	0.61	0.54

\*P-values corrected for multiple testing. Trait values untransformed.

**Table 6** Polymorphisms in the coding region of the vitamin D receptor gene.

Polymorphism	Position	Frequency	RFLP
T-C	117 <sup>a</sup>	0.55/0.45	Fok I
T-C	1171 <sup>a</sup>	0.55/0.45	Sau 3A
C-G	1850	0.70/0.30	BssSI
+/- A	2190	0.50/0.50	None
A-G	2728	0.75/0.25	None
+/- A	3260	0.55/0.45	None
A-C	3302	0.55/0.45	Tru 9I
A-T	3540	0.55/0.45	Nla III
+/- C	3727	0.55/0.45	None

a: Polymorphisms of the translated region



## References

1. McGeown, M. Heredity in renal stone disease. *Clin Sci* **19**, 465-471 (1960).
2. Resnick, M., Pridgen, D. & Goodman, H. Genetic predisposition to formation of calcium oxalate renal calculi. *N Engl J Med* **278**, 1313-1318 (1968).
3. Ljunghall, S. Family history of renal stones in a population study of stone formers and healthy subjects. *Br J Urol* **51**, 249-252 (1979).
4. Robertson, W. *et al.* Studies on the prevalence and epidemiology of urinary stone disease in men in Leeds. *Br J Urol* **55**, 595-598 (1983).
5. Curhan, G.C., Willett, W.C., Rimm, E.B. & Stampfer, M.J. Family history and risk of kidney stones. *J Am Soc Nephrol* **8**, 1568-1573 (1997).
6. Curhan, G.C., Willett, W.C., Rimm, E.B. & Stampfer, M.J. A prospective study of dietary calcium and other nutrients and the risk of symptomatic kidney stones. *N Engl J Med* **328**, 833-838 (1993).
7. Levy, F., Adams-Huet, M. & Pak, C. Ambulatory evaluation of nephrolithiasis: an update of a 1980 protocol. *Am J Med* **98**, 50-59 (1995).
8. Robertson, W.G. & Morgan, D.B. The distribution of urinary calcium excretions in normal persons and stone-formers. *Clin Chim Acta* **37**, 503-508 (1972).
9. Zerwekh, J.E., Yu, X.P., Breslau, N.A., Manolagas, S. & Pak, C.Y. Vitamin D receptor quantitation in human blood mononuclear cells in health and disease. *Mol Cell Endocrinol* **96**, 1-6 (1993).
10. Alhava, E., Juuti, M. & Karjalainen, P. Bone mineral density in patients with urolithiasis. *Scand J Urol Nephrol* **10**, 154-156 (1976).
11. Sutton, R. & Walker, V. Bone resorption and hypercalciuria in calcium stone formers. *Metabolism* **35**, 485-488 (1986).
12. Bataille, P. *et al.* Diet, vitamin D and vertebral mineral density in hypercalciuric calcium stone formers. *Kidney Int* **39**, 1193-1205 (1991).
13. Morrison, N.A. *et al.* Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature* **367**, 284-287 (1994).
14. Spector, T.D. *et al.* Influence of vitamin D receptor genotype on bone mineral density in postmenopausal women: a twin study in Britain. *Br Med J* **310**, 1357-1360 (1995).

15. Salamone, L.M. *et al.* The association between vitamin D receptor gene polymorphisms and bone mineral density at the spine, hip and whole-body in premenopausal women. *Osteoporos Int* **6**, 63-68 (1996).
16. Harris, S.S., Eccleshall, T.R., Gross, C., Dawson-Hughes, B. & Feldman, D. The vitamin D receptor start codon polymorphism (FokI) and bone mineral density in premenopausal American black and white women. *J Bone Miner Res* **12**, 1043-1048 (1997).
17. Hustmyer, F.G., Peacock, M., Hui, S., Johnston, C.C. & Christian, J. Bone mineral density in relation to polymorphism at the vitamin D receptor gene locus. *J Clin Invest* **94**, 2130-2134 (1994).
18. Peacock, M. Vitamin D receptor gene alleles and osteoporosis: a contrasting view. *J Bone Miner Res* **10**, 1294-1297 (1995).
19. Garnero, P., Borel, O., Sornay-Rendu, E. & Delmas, P.D. Vitamin D receptor gene polymorphisms do not predict bone turnover and bone mass in healthy premenopausal women. *J Bone Miner Res* **10**, 1283-1288 (1995).
20. Garnero, P., Borel, O., Sornay-Rendu, E., Arlot, M.E. & Delmas, P.D. Vitamin D receptor gene polymorphisms are not related to bone turnover, rate of bone loss, and bone mass in postmenopausal women: the OFELY Study. *J Bone Miner Res* **11**, 827-834 (1996).
21. Zmuda, J.M., Cauley, J.A., Danielson, M.E., Wolf, R.L. & Ferrell, R.E. Vitamin D receptor gene polymorphisms, bone turnover, and rates of bone loss in older African-American women. *J Bone Miner Res* **12**, 1446-1452 (1997).
22. Dawson-Hughes, B., Harris, S.S. & Finneran, S. Calcium absorption on high and low calcium intakes in relation to vitamin D receptor genotype. *J Clin Endocrinol Metab* **80**, 3657-3661 (1995).
23. Wishart, J.M. *et al.* Relations between calcium intake, calcitriol, polymorphisms of the vitamin D receptor gene, and calcium absorption in premenopausal women. *Am J Clin Nutr* **65**, 798-802 (1997).
24. Scott, P. *et al.* The  $1\alpha$ -hydroxylase locus is not linked to calcium stone formation or calciuric phenotypes in French-Canadian families. *J Am Soc Nephrol* **9**, 425-432 (1998).

25. Baker, A.R. *et al.* Cloning and expression of full-length cDNA encoding human vitamin D receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**, 3294-3298 (1988).
26. Schuler, G.D. *et al.* A gene map of the human genome. *Science* **274**, 540-546 (1996).
27. Boehnke, M., Lange, K. & Cox, D.R. Statistical methods for multipoint radiation hybrid mapping. *Am J Hum Genet* **49**, 1174-1188 (1991).
28. Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K. & Sekiya, T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 2766-2770 (1989).
29. Gyapai, G. *et al.* The 1993-1994 Généthon human genetic map. *Nat Genet* **7**, 246-339 (1994).
30. Miller, S., Dykes, D. & Polesky, H. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl Acids Res* **16**, 1215 (1988).
31. Hughes, M.R. *et al.* Point mutations in the human vitamin D receptor gene associated with hypocalcemic rickets. *Science* **242**, 1702-1705 (1988).
32. Sobel, E. & Lange, K. Descent graphs in pedigree analysis: applications to haplotyping, location scores, and marker-sharing statistics. *Am J Hum Genet* **58**, 1323-1337 (1996).
33. Green, P. Construction and comparison of chromosome 21 radiation hybrid and linkage maps using CRI-MAP. *Cytogenet Cell Genet* **59**, 122-124 (1992).
34. Matisse, T.C., Perlin, M. & Chakravarti, A. Automated construction of genetic linkage maps using an expert system (MultiMap): a human genome linkage map. *Nat Genet* **6**, 384-390 (1994).
35. Terwilliger, J.D. The available possibilities to analyze data of polygenic disease statistically. in *IVth Nordic Genome Initiative* (, Helsinki, 1994).
36. Hodge, S. The information contained in multiple sibling pairs. *Genet Epidemiol* **1**, 109-122 (1984).
37. S.A.G.E. Statistical analysis for Genetic Epidemiology. Computer program package available from the Department of Epidemiology and Biostatistics. Release 2.2 edn (, Case Western University, Cleveland, 1994).
38. Haseman, J. & Elston, R. The investigation of linkage between a quantitative trait and a marker locus. *Behav Genet* **2**, 3-19 (1972).

39. Labuda, M. *et al.* Two hereditary defects related to vitamin D metabolism map to the same region of chromosome 12q13-14. *J Bone Min Res* **7**, 1447-1453 (1992).
40. Saijo, T. *et al.* A unique mutation in the vitamin D receptor gene in three Japanese patients with vitamin D-dependent rickets type II: utility of single-strand conformation polymorphism analysis for heterozygous carrier detection. *Am J Hum Genet* **49**, 668-673 (1991).
41. Gross, C. *et al.* The presence of a polymorphism at the translation initiation site of the vitamin D receptor gene is associated with low bone mineral density in postmenopausal Mexican-American women. *J Bone Miner Res* **11**, 1850-1055 (1996).
42. Zerwekh, J.E. *et al.* Evidence for normal vitamin D receptor messenger ribonucleic acid and genotype in absorptive hypercalciuria. *J Clin Endocrinol Metab* **80**, 2960-2965 (1995).
43. Hoopes Jr, R. *et al.* Mapping quantitative trait loci for hypercalciuria in the genetic stone-forming rat [Abstract]. *J Am Soc Nephrol* **8**, 563 (1997).
44. Szpirer, J. *et al.* The Sp1 transcription factor gene (SP1) and the 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor gene (VDR) are colocalized on human chromosome arm 12q and rat chromosome 7. *Genomics* **11**, 168-173 (1991).
45. Lidsky, A.S. *et al.* Regional mapping of the phenylalanine hydroxylase gene and the phenylketonuria locus in the human genome. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**, 6221-6225 (1985).
46. Fulchignoni-Lataud, M.C., Weiss, M.C., Szpirer, C. & Levan, G. Assignment of the rat genes coding for phenylalanine hydroxylase (PAH), tyrosine aminotransferase (TAT), and pyruvate kinase (PKL) to chromosomes 7, 19, 2, respectively. *Cytogenet Cell Genet* **53**, 172-174 (1990).
47. Mattei, M.G. *et al.* Chromosomal assignment of retinoic acid receptor (RAR) genes in the human, mouse, and rat genomes. *Genomics* **10**, 1061-1069 (1991).
48. Bushinsky, D.A., Kim, M., Sessler, N.E., Nakagawa, Y. & Coe, F.L. Increased urinary saturation and kidney calcium content in genetic hypercalciuric rats. *Kidney Int* **45**, 58-65 (1994).
49. Tsuruoka, S., Bushinsky, D.A. & Schwartz, G.J. Defective renal calcium reabsorption in genetic hypercalciuric rats. *Kidney Int* **51**, 1540-1547 (1997).

50. Li, X.Q., Tembe, V., Horwitz, G.M., Bushinsky, D.A. & Favus, M.J. Increased intestinal vitamin D receptor in genetic hypercalciuric rats. A cause of intestinal calcium hyperabsorption. *J Clin Invest* **91**, 661-667 (1993).
51. Lander, E. & Kruglyak, L. Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nat Genet* **11**, 241-247 (1995).
52. Risch, N. & Merikangas, K. The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* **273**, 1516-1517 (1996).
53. Risch, N. Linkage strategies for genetically complex traits. I. Multilocus models. *Am J Hum Genet* **46**, 222-228 (1990).
54. Mein, C.A. *et al.* A search for type 1 diabetes susceptibility genes in families from the United Kingdom. *Nat Genet* **19**, 297-300 (1998).
55. Concannon, P. *et al.* A second-generation screen of the human genome for susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus. *Nat Genet* **19**, 292-296 (1998).
56. Spielman, R., McGinnis, R. & Ewens, W. Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin dependent diabetes mellitus (IDDM). *Am J Hum Genet* **52**, 506-516 (1993).
57. Cockcroft, D.W. & Gault, M.H. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron* **16**, 31-41 (1976).

### 8.3 Le récepteur sensible au calcium

Hypothèse : Une variation génétique au ou près du locus du récepteur sensible au calcium est liée à la néphrolithiasique calcique et/ou à l'excrétion urinaire de calcium.

Rationnelle : Le récepteur sensible au calcium régule la sécrétion de l'hormone parathyroïdienne en réponse à des changements des concentrations de calcium extracellulaire<sup>114</sup>. Les mutations de ce récepteur qui entraînent un gain de fonction mènent à l'hypercalciurie familiale avec hypocalcémie<sup>115</sup>. Il est possible qu'une variation génétique entraînant un faible gain de fonction du récepteur engendre une élévation de l'excrétion urinaire de calcium par l'intermédiaire d'une fuite rénale.

Conclusion : Les résultats de cette étude, telle que publiée dans « *Kidney International* » (58 : p38-42 (2000)), suggèrent que les variations génétiques du récepteur sensible au calcium ne sont pas liées à l'hypercalciurie idiopathique de même qu'à la formation de lithiase calcique dans des familles québécoises.

**Evaluation of the Calcium Sensing Receptor Gene in Idiopathic Hypercalciuria and Calcium Nephrolithiasis**

**Authors:** Martin Petrucci, Patrick Scott, Denis Ouimet, Marie-Lucie Trouvé, Yanick Proulx, Luc Valiquette, Gérald Guay, Alain Bonnardeaux

Article publié dans la revue "Kidney International", volume 58, numéro 1, pages 38-42 (2000).

**ABSTRACT**

**BACKGROUND:** Calcium urolithiasis is in part genetically determined and associated with idiopathic hypercalciuria. **METHODS:** We have used a candidate gene approach to determine whether the calcium sensing receptor (CaR) gene is linked to idiopathic hypercalciuria and calcium urolithiasis in a cohort of French Canadian sibships with multiple affected members (64 sibships from 55 pedigrees yielding 359 affected sibling pairs with  $\geq 1$  stone episode). **RESULTS:** Using non-parametric linkage analysis with various intragenic and flanking markers, we show that the CaR can be excluded as a major gene for hypercalciuric stone formation. We have excluded the CaR (lodscores  $< -2$ ) at  $\lambda_s$  values of 1.5, 1.68 and 2.6 for sib pairs concordant for at least 1 stone passage, at least 2 stone passages and at least 1 stone passage and calciuria above the 75<sup>th</sup> percentile, respectively. Quantitative trait linkage analyses do not suggest that the CaR gene is linked to biochemical markers of idiopathic hypercalciuria. **CONCLUSIONS:** This study shows that genetic variants of the CaR gene are not associated with idiopathic hypercalciuria and calcium nephrolithiasis in this population of French Canadians.



## INTRODUCTION

The passage of a kidney stone (nephrolithiasis) is a common event that will affect 5 to 15% of the North American population. In the United States, complications related to nephrolithiasis represent 1% of all hospitalizations and have an important economic impact <sup>1</sup>. The most common type of nephrolithiasis is composed of calcium, either as an oxalate or phosphate salt, or a combination. Familial aggregation studies suggest that genetic factors underlie stone formation <sup>2-6</sup>. A positive family history is a strong risk factor <sup>6</sup> and the passage or formation of calcium stones is probably a polygenic trait <sup>3</sup> associated with increased urine calcium excretion (idiopathic hypercalciuria, IH) in up to 40% of stone formers. The genetic basis of IH is largely unknown.

The calcium-sensing receptor (CaR) is a candidate gene for IH. This G protein coupled receptor is expressed in parathyroid glands and kidneys and is a key regulator of parathyroid hormone (PTH) secretion and renal tubular calcium reabsorption according to extracellular calcium concentration <sup>7</sup>. In the parathyroid gland, the CaR induces inhibition of parathyroid hormone secretion upon binding of calcium. In the kidney, the CaR is highly expressed in multiple nephron segments including medullar and cortical thick ascending limbs, proximal and distal convoluted tubule and inner medullary collecting duct <sup>8</sup>, where it regulates renal tubular calcium reabsorption. In addition, the CaR is involved in urine concentration and dilution as it inhibits the action of vasopressin to balance the need for excreting calcium and conserving water <sup>9</sup>. Genetic variation at the CaR locus is linked to urine calcium excretion in rare monogenic traits including familial benign hypercalcemia, neonatal severe hyperparathyroidism and in an autosomal dominant form of hypocalcemia <sup>10-13</sup>.

We present the results of a sib pair linkage analysis of the CaR locus in a large group of French Canadian sibships. We tested this locus for linkage to calcium stone formation and quantitative phenotypes relevant to calcium metabolism.

## MATERIAL AND METHODS

### Pedigrees and Phenotyping

All families in the study were of French Canadian descent and recruited from several specialized stone clinics and lithotripsy units as described<sup>14</sup>. All subjects gave informed consent and were interviewed by a member of the study. Urine sampling consisted in a single 24-hour urine collection under a free diet, as well as a calcium-loading test. Standard biochemical analyses on urine and serum samples were performed, as described<sup>14</sup>. Each affected proband had at least one calcium stone episode verified by crystallographic (pure calcium oxalate or combined calcium oxalate-calcium phosphate) or biochemical analysis when available. Overall, crystallographic analysis was available for 56% of probands (31/55), biochemical analysis for 25% (14/55). In 10 of the 55 patients (18%) no stone analysis was available so calcium stone episodes were verified by intravenous pyelogram (radiodense stone). Available hospital records (abdominal ultrasounds and x-rays) were reviewed to confirm unaffected status for healthy relatives. Individuals with a history of urinary tract infection or with any secondary condition that might predispose to kidney stones (i.e. inflammatory bowel disease, hyperparathyroidism) were attributed an undetermined affection status.

The cohort consisted in 55 pedigrees (64 sibships) comprising 359 pairs of affected siblings with at least one stone episode (table 1). We defined “more severe” (at least 2 stone passages) and semi quantitative (at least 1 stone passage with calciuria above the 75<sup>th</sup> percentile, trait “T75”) affection statuses, yielding 196 and 52 pairs of affected siblings, respectively (table 1). For the second affection status (at least 2 stone passages) subjects with only 1 stone episode were assigned an undetermined affection status. We used “more severe” phenotypes to enhance the putative genetic susceptibility in affected pairs of siblings. For the trait T75 every affected sib in a sib pair had at least 1 stone episode and a 24-h calciuria above 0.102 mmol/Kg/d (urine collections with 24-h creatinine excretion within 20% of that predicted by the Cockcroft-Gault formula<sup>15</sup>). When 24-h collections were inadequately performed

we used fasting urine calcium/creatinine ratios (T75 = value above 0.513 mmol/mmol). Table 2 shows clinical characteristics of affected and unaffected siblings for all three traits.

### **Molecular and Statistical Genetics**

We physically mapped the CaR gene and three flanking highly polymorphic markers from Genethon (D3S1278, D3S3515 and D3S1551) by radiation hybrid mapping using a commercially available panel (GeneBridge 4 panel, Research Genetics, Huntsville, ALA) and PCR methods. The RHMAP program was used to order all sequence tag sites <sup>16</sup>.

Genotyping was performed on genomic DNA extracted from peripheral leukocytes by a salting out procedure <sup>17</sup>. Amplifications of 3 multiallelic markers spanning the CaR gene locus and 2 intragenic markers of the CaR gene were performed by PCR/electrophoresis methods. The intragenic markers consisted in 2 biallelic polymorphisms, A986S and G990R <sup>18</sup>, amplified in a single fragment using primers CaR3343S (5'-CAGCCCAGATGCAAGCAGAA-3') and CaR3500R (5'-TGGTGTCGGGTCAGCGTAT-3'). We used single-strand conformation polymorphism (SSCP) to resolve genotypes. The construction of genetic maps was carried out with the CRIMAP and MULTIMAP programs <sup>19,20</sup>.

Genetic and quantitative trait linkage analyses on intermediate phenotypes relevant to calcium homeostasis were performed with the MAPMAKER/SIBS program version 2.1 <sup>21</sup> with the "all pairs" option weighted by sibship size. The aim was to determine whether common genetic variations at the CaR locus specify particular quantitative phenotypes.

## RESULTS

### *Mapping*

A sequence tag of the CaR gene was assigned to chromosome 3q13.3-q21, confirming previous results<sup>22</sup>. The D3S3515 marker was closest to the CaR gene. The distance between both sequence tag sites was 0.105 rays (approximately 3.15 cM) with a lodscore > 17. The genetic map constructed spanned an 11.8 cM region with the following order: D3S1278-D3S3515-(A986S-G990R)-D3S1551 at distances of 5.4, 3.5 and 2.9 cM, respectively. The support for this order (lodscore) was 2.99 log above the next best order.

### Linkage Analysis

Multipoint sib pair linkage analyses did not show evidence for linkage between the CaR gene and calcium stone passage (at least 1 stone passage and at least 2 stone passages) in the total group. Furthermore, affected pairs of siblings concordant for calciuria above the 75<sup>th</sup> percentile (traits T75) did not show evidence for linkage. The option “estimate” of MAPMAKERS/SIBS was used to determine allele sharing in affected sib pairs. The proportion of affected sib pairs sharing 0, 1 and 2 alleles at the CaR loci was identical to theoretical values under the null hypothesis (0.25, 0.50 and 0.25) for all three traits studied (data not shown). The “exclude” option of MAPMAKERS/SIBS was used to determine the sibling relative risks ( $\lambda_s$ ) for which we have excluded (lodscore < - 2.0) the CaR gene in our population (graph 1). The  $\lambda_s$  ratios were 1.50, 1.68 and 2.6, respectively for the aforementioned affection statuses. This suggests that the CaR gene is neither linked to urine calcium excretion nor to calcium stone passage in our hypercalciuric sibships. Finally the option “infomap” was used to calculate the information content mapping. The information contents of the loci were above 0.85 for all three traits.

### *Quantitative trait locus mapping*

To determine whether genetic variation at the CaR locus might modulate intermediate phenotypes related to calcium metabolism, we performed quantitative trait linkage (QTL) analyses on serum calcium, PTH and  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , fasting and post-loading calciuria (before and after the ingestion of 1g of elemental calcium) and 24-h urine calcium excretion. Table 3 shows the results of QTL analyses in our families. No significant linkage was detected for any of the quantitative traits considered.

## DISCUSSION

We have used a candidate gene approach to determine whether the CaR gene on chromosome 3q is linked to urinary calcium excretion phenotypes and/or calcium stone formation in a group of French Canadian pedigrees. We analyzed the genetic data with the affected sib pair method, as it is well suited to situations where inheritance is complex or unknown. The results suggest that genetic variation at or near the CaR locus is not associated with hypercalciuric urolithiasis, using the entire group of stone-forming sibs, or a subgroup with more severe idiopathic hypercalciuria. In addition, the CaR locus is not associated with intermediate phenotypes of calcium homeostasis including serum calcium, urine calcium excretion, PTH and  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  levels.

These results provide evidence that the CaR locus can be excluded as a major gene for nephrolithiasis at  $\lambda$ s ratios (defined as the ratio of the prevalence in siblings of affected individuals and the population prevalence<sup>23</sup>) of 1.50 and 1.68, respectively for  $\geq 1$  and  $\geq 2$  stone episodes, and 2.60 for stone-forming sib pairs concordant for hypercalciuria. Such results apply to the families studied here, and do not completely rule out the possibility that genetic variations of the CaR gene have major effects on kidney stone formation, or on intestinal and/or renal calcium handling in other populations. Also, we cannot exclude that rare mutations of the CaR gene are associated with stone formation<sup>13</sup>. However, hypothetical variations of this gene predisposing to kidney stone formation must be uncommon in our stone-forming population.

In the present study, we have also found that urinary calcium excretion is increased in stone forming versus non-stone forming sibs. Affected sibs have increased 24-hour and fasting urine calcium excretion, as well as increased urine calcium following a calcium load. This is the first study to statistically show that hypercalciuria segregates with stone formation using family-based controls. Previous studies analyzing *in vivo* and *in vitro* biochemical markers in stone formers have

used a case-control design subject to bias from unrecognized stratification of populations.

Although there has been progress in identifying monogenic disorders associated with hypercalciuria<sup>24-26</sup>, as well as delineating the “environmental” factors associated with stone formation<sup>27</sup>, the genetic basis of IH is still obscure. We have previously excluded CYP1 $\alpha$  (1  $\alpha$  hydroxylase) as a major gene for calcium stone formation<sup>14</sup> but have recently suggested that a gene at or near the vitamin D receptor on chromosome 12 might be linked to this trait<sup>28</sup>. As the list of relevant candidate genes decreases, further studies should involve a more comprehensive “genome wide” approach.



**ACKNOWLEDGEMENTS**

This study was supported by the Kidney Foundation and the Medical Research Council of Canada. A.B. is a scholar of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

**Table 1.** Number of calcium stone-forming families and sibships

No. of Affected Siblings per Sibship	At least 1 stone passage No. of Sibships	At least 2 stone passages No. of Sibships	Trait T75 <sup>a</sup> No. of Sibships
2	28	18	8
3	13	17	6
4	6	4	1
5	9	3	2
6	6	-	-
7	1	-	-
11	1	1	-
Total No. of Sibships (families)	64 (55)	43 (41)	17 (17)

<sup>a</sup> Affected siblings for the trait T75 have at least 1 stone passage and calciuria above the 75<sup>th</sup> percentile in our database.

**Table 2.** Clinical characteristics of siblings in pedigrees with calcium and/or radioopaque nephrolithiasis

Status	Unaffected	At least 1 stone passage		At least 2 stone passages		Trait T75 <sup>a</sup>	
		Affected	P-values	Affected	P-values	Affected	P-values
Serum Calcium (mmol/L)	2.33 ± 0.10 245	2.31 ± 0.15 282	0.13	2.31 ± 0.13 187	0.28	2.34 ± 0.10 80	0.41
Serum PTH (pmol/L)	3.12 ± 1.62 229	3.15 ± 1.48 263	0.83	3.24 ± 1.62 172	0.46	2.86 ± 1.304 74	0.21
Calciuria <sup>b</sup> (mmol/Kg/d)	0.067 ± 0.034 109	0.089 ± 0.046 169	0.00002	0.091 ± 0.043 114	8.75E-06	0.135 ± 0.033 58	1.60E-25
Fasting Ca/cr (mmol/mmol)	0.38 ± 0.250 181	0.434 ± 0.323 245	0.05	0.440 ± 0.333 164	0.06	0.621 ± 0.263 77	2.13E-11
Delta Ca/cr (mmol/mmol)	0.500 ± 0.359 128	0.596 ± 0.631 196	0.12	0.631 ± 0.698 128	0.06	0.674 ± 0.369 56	0.003

All values mean ± SD (and number of individuals indicated below)

Delta Ca/Cr : difference between post-calcium load ratio and fasting ratio.

<sup>a</sup> Affected siblings for the trait T75 have at least 1 stone passage and calciuria above the 75<sup>th</sup> percentile in our database.

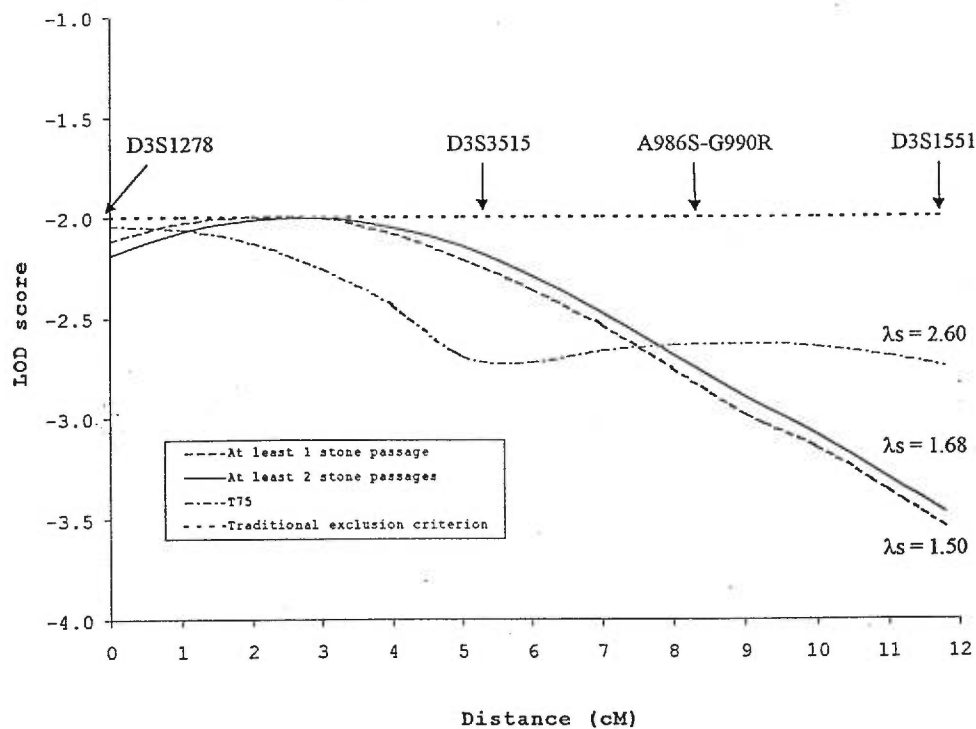
<sup>b</sup> 24-hour urine collections with variation in measured creatinine content within 20% of predicted (Cockcroft-Gault estimation<sup>15</sup>).

**Table 3.** Quantitative trait linkage analysis of the CaR locus with phenotypic traits relevant to calcium nephrolithiasis

QTL	P-values <sup>a</sup>
Serum Ca	0.133
PTH	0.632
1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	0.995
UCa/cr (fasting)	0.836
Delta Ca/cr	0.142
UCa/kg/d	0.637

<sup>a</sup> P values for the traditional Haseman-Elston analysis.

**Figure 1:** Exclusion mapping of the CaR loci. Lod scores obtained with the “exclude” option of MAPMAKER/SIBS at specific  $\lambda_s$  values for which maximum lod score does not exceed  $-2.0$  over the interval.



**REFERENCES**

1. Clark, J.Y., Thompson, I.M. & Optenberg, S.A. Economic impact of urolithiasis in the United States. *J Urol* **154**, 2020-2024 (1995).
2. McGeown, M. Heredity in renal stone disease. *Clin Sci* **19**, 465-471 (1960).
3. Resnick, M., Pridgen, D. & Goodman, H. Genetic predisposition to formation of calcium oxalate renal calculi. *N Engl J Med* **278**, 1313-1318 (1968).
4. Ljunghall, S. Family history of renal stones in a population study of stone formers and healthy subjects. *Br J Urol* **51**, 249-252 (1979).
5. Robertson, W. et al. Studies on the prevalence and epidemiology of urinary stone disease in men in Leeds. *Br J Urol* **55**, 595-598 (1983).
6. Curhan, G.C., Willett, W.C., Rimm, E.B. & Stampfer, M.J. Family history and risk of kidney stones. *J Am Soc Nephrol* **8**, 1568-1573 (1997).
7. Brown, E.M. Extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  sensing, regulation of parathyroid cell function, and role of  $\text{Ca}^{2+}$  and other ions as extracellular (first) messengers. *Physiol Rev* **71**, 371-411 (1991).
8. Riccardi, D. et al. Cloning and functional expression of a rat kidney extracellular calcium/polyvalent cation-sensing receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 131-135 (1995).
9. Sands, J.M. et al. Apical extracellular calcium/polyvalent cation-sensing receptor regulates vasopressin-elicited water permeability in rat kidney inner medullary collecting duct. *J Clin Invest* **99**, 1399-1405 (1997).
10. Pollak, M.R. et al. Familial hypocalciuric hypercalcemia and neonatal severe hyperparathyroidism. Effects of mutant gene dosage on phenotype. *J Clin Invest* **93**, 1108-1112 (1994).
11. Pearce, S.H. et al. Calcium-sensing receptor mutations in familial benign hypercalcemia and neonatal hyperparathyroidism. *J Clin Invest* **96**, 2683-2692 (1995).
12. Pollak, M.R. et al. Autosomal dominant hypocalcaemia caused by a  $\text{Ca}^{2+}$ -sensing receptor gene mutation. *Nat Genet* **8**, 303-307 (1994).
13. Pearce, S.H. et al. A familial syndrome of hypocalcemia with hypercalciuria due to mutations in the calcium-sensing receptor. *New England Journal of Medicine* **335**, 1115-1122 (1996).

14. Scott, P. et al. The  $1\alpha$ -hydroxylase locus is not linked to calcium stone formation or calciuric phenotypes in French-Canadian families. *J Am Soc Nephrol* **9**, 425-432 (1998).
15. Cockcroft, D.W. & Gault, M.H. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron* **16**, 31-41 (1976).
16. Boehnke, M., Lange, K. & Cox, D.R. Statistical methods for multipoint radiation hybrid mapping. *Am J Hum Genet* **49**, 1174-1188 (1991).
17. Miller, S., Dykes, D. & Polesky, H. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl Acids Res* **16**, 1215 (1988).
18. Rubin, L.A. et al. Calcium sensing receptor gene: analysis of polymorphism frequency. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* **227**, 122-5 (1997).
19. Green, P. Construction and comparison of chromosome 21 radiation hybrid and linkage maps using CRI-MAP. *Cytogenet Cell Genet* **59**, 122-124 (1992).
20. Matisse, T.C., Perlin, M. & Chakravarti, A. Automated construction of genetic linkage maps using an expert system (MultiMap): a human genome linkage map. *Nat Genet* **6**, 384-390 (1994).
21. Kruglyak, L. & Lander, E. Complete multipoint sib-pair analysis of qualitative and quantitative traits. *Am J Hum Genet* **57**, 439-454 (1995).
22. Janicic, N. et al. Mapping of the calcium-sensing receptor gene (CASR) to human chromosome 3q13.3-21 by fluorescence in situ hybridization, and localization to rat chromosome 11 and mouse chromosome 16. *Mamm Genome* **6**, 798-801 (1995).
23. Risch, N. Linkage strategies for genetically complex traits. I. Multilocus models. *Am J Hum Genet* **46**, 222-228 (1990).
24. Lloyd, S. et al. A common molecular basis for three inherited kidney stone diseases. *Nature* **379**, 445-449 (1996).
25. Karet, F.E. et al. Mutations in the chloride-bicarbonate exchanger gene AE1 cause autosomal dominant but not autosomal recessive distal renal tubular acidosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 6337-6342 (1998).
26. Karet, F.E. et al. Mutations in the gene encoding B1 subunit of H<sup>+</sup>-ATPase cause renal tubular acidosis with sensorineural deafness. *Nat Genet* **21**, 84-90 (1999).

27. Curhan, G.C., Willett, W.C., Rimm, E.B. & Stampfer, M.J. A prospective study of dietary calcium and other nutrients and the risk of symptomatic kidney stones. *N Engl J Med* **328**, 833-838 (1993).
28. Scott, P. et al. Suggestive evidence for a susceptibility gene near the vitamin D receptor locus in idiopathic calcium stone formation. *J Am Soc Nephrol* **10**, 1007-1013 (1999).



## 9 Discussion

### 9.1 Sommaire des résultats

Les caractéristiques pathophysiologiques de la néphrolithiase calcique pointent vers plusieurs anomalies qui peuvent être d'importance pour la susceptibilité de ce trait. L'augmentation de la saturation de l'oxalate de calcium causée par l'hypercalciurie est sans doute l'observation la plus constante<sup>7</sup>.

Dans cette thèse, la liaison génétique a été analysée à des loci candidats suspectés être à l'origine de l'hypercalciurie et, potentiellement, de la lithiase calcique. Ces gènes incluent ceux qui codent pour la  $1\alpha$ -hydroxylase rénale, le récepteur de la vitamine D et le récepteur sensible au calcium. Les analyses de liaison génétique ont été effectuées à partir d'une population relativement homogène de descendance canadienne-française et à partir de marqueurs polymorphes. La cartographie physique, d'après les panels d'hybrides d'irradiation, a permis la localisation de marqueurs près des gènes d'intérêts. De plus, des marqueurs bi-alléliques ont été identifiés dans la séquence codante des gènes. Les données ont été analysées à partir de méthodes basées sur le partage d'allèles parce qu'elles ne dépendent pas de la spécification d'un modèle de ségrégation, imprécis pour les traits complexes. Le phénotype lithiasique a été défini par le passage d'une lithiase calcique déterminé par l'analyse cristallographique et/ou les évidences radiologiques. L'excrétion urinaire de calcium a été mesurée chez la majorité des participants et le trait hypercalciurique a été défini comme l'excrétion urinaire de calcium égale ou supérieure à 0.1 mmol/kg par jour. Les analyses génétiques ont mis en évidence la liaison du trait lithiasique seulement avec le locus du récepteur de la vitamine D.

## 9.2 Vers le gène de la lithiase calcique : Rôle du récepteur de la vitamine D

La liaison au locus du récepteur de la vitamine D demande à être approfondie. Les évidences les plus probantes de l'implication du récepteur dans l'étiologie de l'hypercalciurie proviennent de l'étude du rat lithiasique hypercalciurique<sup>86</sup> chez lequel une augmentation du nombre de récepteurs dans l'intestin lorsque comparé à des contrôles normocalciuriques<sup>92</sup>. L'amplification de la réponse à la vitamine D qui en résulte pourrait expliquer l'augmentation de l'absorption de calcium. Bien qu'ils n'aient pas encore été confirmés, des résultats préliminaires suggèrent une évidence de liaison avec la calciurie au locus du récepteur de la vitamine D chez le rat<sup>116</sup>. Chez l'humain, cependant, les concentrations du récepteur de la vitamine D ainsi que la réponse à la vitamine D sont normaux dans les fibroblastes de patients hypercalciuriques<sup>117</sup>. De plus, l'association entre un polymorphisme neutre du VDR et l'hypercalciurie absorptive n'a pu être démontré<sup>118</sup>. Parce qu'elles permettraient l'établissement d'un lien fonctionnel avec l'hypercalciurie absorptive, de telles études devraient être réalisées avec des polymorphismes qui affectent la structure de la protéine. De plus, ces variations permettraient l'analyse de liaison génétique avec un allèle mutant et non un marqueur anonyme adjacent. Un tel variant pour le VDR existe (FokI)<sup>119</sup>. La transition T → C entraîne l'abolition du premier codon putatif d'initiation et la production d'une protéine avec 3 acides aminés en moins. La recherche de polymorphismes de la région codante du VDR dans notre population a permis l'identification de nombreux variants, incluant ce dernier. Le rôle de ce polymorphisme dans notre population est inconnu, bien qu'il ait été associé avec une faible densité minérale osseuse chez des femmes ménopausées d'origine mexicaine-américaine<sup>120</sup>. Étonnamment, des études fonctionnelles ont démontré que l'isoforme tronqué du VDR interagit de façon plus efficace avec TFIIB et possède une activité transcriptionnelle plus élevée que l'isoforme pleine longueur<sup>121,122</sup>. De plus, une altération de l'activité transcriptionnelle du VDR a été observée chez le rat hypercalciurique, laquelle résulte en une augmentation des niveaux d'ARNm des calbindines 9k et 28k<sup>94</sup>. Selon ce modèle, les fluctuations même minimales de la

vitamine D résulteraient en une augmentation de l'activité transcriptionnelle du VDR ayant pour conséquence l'apparition de l'hypercalciurie et la néphrolithiase.

En principe, la liaison peut être due à un gène à proximité du récepteur de la vitamine D. Hypothétiquement, tous les gènes candidats de la région pourraient être étudiés pour la liaison à la lithiase calcique. La cartographie du véritable locus de susceptibilité pourrait être réalisée avec des méthodes plus puissantes comme le test de transmission du déséquilibre de liaison<sup>106</sup>.

Les analyses de liaison aux locus de la  $1\alpha$ -hydroxylase et du récepteur sensible au calcium se sont avérées négatives. Les résultats négatifs sont significatifs seulement lorsque la puissance de détection de la liaison est élevée, la puissance étant définie par la probabilité de détection d'un gène de susceptibilité à partir d'un marqueur lié. Le locus de  $1\alpha$ -hydroxylase a été exclu avec un  $\lambda_s$  de 2 alors que le locus du RSC a été exclu avec un  $\lambda_s$  de 1.5. Ces résultats suggèrent donc que les variants de ces gènes menant à la néphrolithiase calcique doivent être rares dans notre population et/ou ont un effet minime sur la susceptibilité au trait lithiasique.

### 9.3 Puissance de l'étude

Pour les traits complexes, les discussions sur la puissance se résument à l'approximation de la taille de l'échantillon nécessaire à la détection d'une liaison génétique. La puissance de l'échantillonnage des paires de germains a été examinée par Risch<sup>123</sup>. Il a été démontré que la puissance est dépendante du  $\lambda_s$ <sup>123</sup>, définie par le ratio du risque d'un frère ou d'une sœur du proposant sur la prévalence de la population générale<sup>29</sup>.

Les calculs théoriques de Risch<sup>123</sup> indiquent que pour identifier un locus avec un  $\lambda_s$  de 2 avec une puissance de détection de 80 %, il faut 200 paires de germains. Par contre, ces estimations assument une fréquence de recombinaison ( $\theta$ ) de 0 et un marqueur complètement informatif<sup>123,124</sup>. La non-conformité à ces conditions entraîne une diminution de la puissance de détection. Par exemple, pour un  $\lambda_s = 2$  et 300 paires de germains, la puissance diminue de plus de la moitié lorsque la distance est de 10cM ( $\theta = 0.10$ ), passant de 0.95 à 0.40 %. Il est cependant possible de diminuer l'effet de la distance et l'effet de la perte d'information en effectuant des analyses multipoints<sup>125</sup> et en utilisant des marqueurs hautement polymorphes (indice d'hétérozygotie > 0.75)<sup>124</sup>. Pour l'étude des gènes candidats, la perte de puissance est minime puisque nous avons utilisé plusieurs marqueurs polymorphes (indice d'hétérozygotie moyenne de 0.76) et effectué des analyses multipoints, donc couvrant entièrement la région candidate.

#### 9.4 Étude du trait lithiasique: problèmes et solutions

En général, la cartographie des traits complexes est possible lorsqu'il y a (1) de nombreux marqueurs polymorphes bien espacés, (2) un grand nombre de familles, (3) peu d'hétérogénéité génétique et (4) des méthodes statistiques performantes. Les points 1 et 4 ne présentent pas de limitations sérieuses puisque le Projet du génome humain, donnant accès à une abondance de marqueurs polymorphes et de cartes génétiques<sup>99</sup> et le développement de méthodes multipoints<sup>126</sup>, permettent l'extraction d'une plus grande quantité d'information génétique (presque 100 %). La collecte des familles est l'étape la plus difficile et est celle qui ralentit généralement les progrès<sup>127</sup>. À la soumission de l'article portant sur le RSC, un total de 359 paires de germains concordantes pour le trait lithiasique avait été recruté (point 2). La probabilité de trouver une liaison génétique dépend aussi de l'hétérogénéité de l'échantillon. Le gène qui contribue à la susceptibilité chez un sous-groupe de patients peut ne pas être détecté par l'examen de l'ensemble de l'échantillon. En ce qui concerne la lithiase calcique, l'hétérogénéité est probable. D'abord, la présence chez un patient, de plus d'un état hyperexcrétoire de solutés lithogènes<sup>6,7</sup>. Lorsqu'il est similaire, il peut varier d'intensité. De plus, il s'avère que quelques patients n'ont aucune anomalie métabolique identifiable selon les standards diagnostiques actuels. Des défauts dans la production d'inhibiteurs peuvent expliquer la présence de lithiases chez ces patients<sup>11,12</sup>. Le suivi clinique à long terme nous indique que certains patients classifiés hypercalciuriques au bilan initial ne le sont plus quelques années plus tard<sup>74</sup>. Il est reconnu que l'excrétion urinaire du calcium n'est pas constante et varie avec l'âge. La calciurie diminue chez les hommes vers l'âge de 60 alors qu'elle diminue chez les femmes vers l'âge de 50 ans<sup>69,70</sup>. On ne peut également exclure de la question les anomalies anatomiques rénales, non décelables en radiologie, et qui favorisent la stase et/ou la rétention des cristaux nouvellement formés. Finalement, le trait lithiasique, tout comme le trait hypercalciurique, ne résultent probablement pas des variations génétiques d'un seul gène, mais plutôt de l'interaction de multiples gènes et de facteurs environnementaux<sup>68</sup>.

#### 9.4.1 Stratification basée sur les données cliniques

Lorsque l'hétérogénéité étiologique est causée par l'hétérogénéité génétique, la stratification peut mener à une augmentation de la puissance de détection de la liaison<sup>128</sup>. L'examen d'entités cliniques sous-jacentes ou l'étude d'une population isolée constitue des exemples de stratification. Il est cependant nécessaire de procéder avec précaution puisque tester plusieurs hypothèses nécessite une correction<sup>129</sup> alors que la réduction de la taille de l'échantillon diminue la puissance<sup>123,124</sup>.

La stratification basée sur les données cliniques a été utilisée avec succès pour la cartographie des gènes de la maladie d'Alzheimer à déclaration précoce<sup>130</sup>, le cancer du sein et de l'ovaire<sup>131,132</sup> et l'hypertension<sup>133</sup>. Pour ces études, la stratification fut basée sur l'âge d'apparition de la maladie et/ou la sévérité du trait. Par exemple, Jeunemaitre et coll. (1992)<sup>133</sup> ont défini le statut d'affection de l'hypertension de la façon suivante : déclaration avant 60 ans et nécessitant un traitement chronique. Comme il le sera démontré plus loin, une approche similaire pour la définition du phénotype a été employée pour le criblage du génome (section 9.6).

Les études épidémiologiques tendent à démontrer que la lithiase rénale est un trait récurrent. Environ 50 % des patients feront l'expérience de plus d'un épisode lithiasique<sup>3,30</sup>. La récurrence est plus fréquente chez les individus avec une histoire familiale positive ou d'apparition précoce<sup>5</sup>, mais aussi chez les individus ayant une histoire de lithiases bilatérales<sup>134</sup>. Un autre aspect important de la lithiase est la présence de l'hypercalciurie. L'homogénéité, et par conséquent le gain de puissance, peut être forcée par la stratification basée sur la sévérité du trait lithiasique et la présence concomitante de l'hypercalciurie.

#### 9.4.2 Étude de populations isolées

Une autre façon de diminuer l'hétérogénéité consiste à sélectionner des individus ayant une origine ethnique commune. Vraisemblablement, les variations génétiques menant au désordre sont moindres dans ces populations et proviennent plus souvent du même haplotype ancestral. Un tel mode d'échantillonnage forme la base de l'analyse du déséquilibre de liaison dans les populations ancestrales (e.g. population finlandaise)<sup>135,136</sup>. Les populations isolées dont l'origine est plus récente ont également démontré leurs utilités<sup>137</sup>, bien que le déséquilibre de liaison se retrouve sur une plus grande distance. Les groupes d'immigrants français ont contribué à l'établissement de telles populations en terre d'Amérique. La population québécoise, suivant l'établissement des premières colonies, est demeurée relativement isolée, principalement à cause de considérations géographiques et linguistiques<sup>179</sup>. De plus, l'observation de familles avec de multiples enfants, idéale pour les analyses de liaison, n'est pas rare. Il est cependant nécessaire de réaliser que l'étude des populations homogènes pose le risque que les variations génétiques identifiées dans ces groupes peuvent ne pas être retrouvées dans une population métissée.

## 9.5 Autres gènes candidats

La pathophysiologie de la lithiase calcique pointe vers d'autres facteurs potentiellement impliqués dans la susceptibilité de ce trait. Il est possible qu'un polymorphisme dans l'un de ces gènes affecte la néphrolithiase et/ou l'excrétion urinaire du calcium.

### 9.5.1 Métabolisme du calcium

Le transport du calcium, tant au niveau de l'intestin que le long du néphron, résulte de l'action de multiples facteurs protéiques<sup>138-140</sup>. L'absorption du calcium par les cellules est un processus trans-cellulaire à deux étapes dans lesquelles le calcium entre la cellule à travers la membrane apicale et est sécrété à la membrane basolatérale. L'entrée du calcium dans la cellule se fait par l'entremise de canaux calciques<sup>141</sup>. La sortie du calcium est modulée par la  $\text{Ca}^{2+}(\text{Mg}^{2+})\text{-ATPase}$ <sup>142-144</sup> et par l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ <sup>145,146</sup>. Le transit du calcium entre les deux membranes s'accomplit par l'entremise des protéines liant le calcium, la calbindine 9k et 28k<sup>147,148</sup>.

L'étude de ces gènes n'est possible qu'à partir du moment où ils aient été assignés à un chromosome. L'identification récente d'un canal calcique devrait permettre l'identification du gène codant pour lequel l'expression a été retrouvée dans le rein et dans l'intestin<sup>149</sup>. Deux gènes codant pour la  $\text{Ca-ATPase}$  ont été localisés au chromosome 1q25-32 et 12q21-23<sup>150</sup> alors que le cDNA de l'échangeur  $\text{Na/Ca}$  a été cloné<sup>146</sup>. La démonstration d'une augmentation de l'activité de la  $\text{Ca}(\text{Mg})\text{-ATPase}$  chez des patients hypercalciuriques font de ce dernier un candidat intéressant<sup>151</sup>. Le cDNA pour les calbindines a été cloné<sup>152,153</sup> et les gènes respectivement assignés au chromosome Xp22.2-tel pour la calbindine 9k<sup>154</sup> et au chromosome 8q21.3-q22.1 pour la calbindine 28k<sup>155</sup>.



### 9.5.2 Inhibiteurs de la cristallisation

L'évaluation métabolique des patients, même exhaustive, ne révèle pas toujours la présence des facteurs de risque habituels dans environ 15% des lithiasiques oxalo-calciques<sup>6,7,156</sup>. De plus, la relation entre les anomalies d'excrétions et la calculose est embrouillée par l'existence de nombreux sujets hypercalciuriques exempts de lithiase et par la proportion élevée de patients (environ 2/3) qui produisent des cristaux dans leurs urines contre seulement un sujet sain sur cinq<sup>157</sup>. La présence d'une anomalie des inhibiteurs urinaires apparaît comme une hypothèse attrayante pour la lithiase calcique, en particulier celle dite idiopathique. Cette affirmation est objectivée par la proportion importante de sujets lithiasiques qui présente une altération qualitative ou quantitative de l'inhibition cristalline, tel que démontré par les travaux portant sur la néphrocalcine<sup>14,158</sup>, l'uromoduline<sup>159,160</sup> et la protéine riche en acide uronique<sup>162</sup>. La présence de l'uropontine et de la prothrombine a été démontrée dans les lithiases d'oxalate de calcium<sup>161,163</sup>. L'implication à la susceptibilité de la lithiase calcique de trois de ces gènes, la néphrocalcine, l'uromoduline et l'ostéopontine, a été réalisé par notre laboratoire (Cailhier et al., soumis à *Kidney Int*, Annexe 2).

La néphrocalcine (14kDa), une glycoprotéine riche en acide  $\gamma$ -carboxy-glutamique, est synthétisée dans le tubule proximal et l'anse ascendante de Henlé. Elle semble être capable d'inhiber tous les processus de cristallisation de l'oxalate de calcium<sup>158</sup>. La néphrocalcine urinaire de certains patients lithiasiques est anormale dans l'urine en ce qu'elle manque les résidus d'acide glutamique<sup>14,158</sup>, nécessaire à la liaison du calcium<sup>164</sup>. Cette anomalie structurale de la néphrocalcine pourrait expliquer la perte d'inhibition contre la germination observée chez des patients lithiasiques<sup>165</sup>.

L'uromoduline (84kDa) est la protéine la plus abondante de l'urine humaine<sup>17</sup>. Cette protéine est synthétisée et sécrétée par les cellules épithéliales de l'anse ascendante de Henlé et la partie proximale du tubule contourné distal. L'activité la plus

importante de l'uromoduline est d'inhiber l'agrégation des cristaux d'oxalate de calcium<sup>12</sup>. Certains patients avec récurrence du trait lithiasique excrètent une forme anormale de la protéine, laquelle polymérise à des conditions de pH et de force ionique sous lesquels la forme normale demeure à l'état de monomère<sup>166,167</sup>. Cette diminution d'activité semble être directement reliée à une augmentation de la viscosité de l'uromoduline causée par l'auto-agrégation<sup>167</sup>. L'importance du lien entre cette anomalie et les traitements qui provoquent une diminution du contenu en acide sialique de l'uromoduline<sup>168</sup> reste à déterminer.

L'uropontine (32kDa), riche en acide aspartique présumé important pour la liaison du calcium, est abondante dans la matrice de lithiases d'oxalate de calcium<sup>161,169</sup>. L'uropontine et l'ostéopontine semblent être codées par le même gène mais peuvent différer l'une de l'autre par leurs modifications post-transcriptionnelles (glycosylation et phosphorylation)<sup>170</sup>. L'uropontine peut inhiber la germination et la croissance des cristaux d'oxalate de calcium<sup>171</sup> alors que son rôle dans la calculose oxalo-calcique demeure inconnu.

Tel que mentionné précédemment, l'analyse de liaison génétique à ces trois locus, la néphrocalcine, l'uromoduline et l'ostéopontine, a été examinée dans une cohorte de 64 fratries canadiennes-françaises comprenant 356 paires de germains avec au moins un épisode lithiasique (tableau 1, annexe 2). Les analyses de liaison non-paramétriques ont été réalisées à partir du programme MAPMAKER/SIBS avec l'option "all pairs"<sup>126</sup>. Trois statuts d'affection ont été analysés, le passage d'au moins une lithiase (1), le passage d'au moins une lithiase concomitant avec une excrétion urinaire de calcium sous le 25<sup>th</sup> (0.054mmol/kg par jour) (2) et sous le 50<sup>th</sup> (0.076mmol/kg par jour) (3) afin d'exclure la présence de l'hypercalciurie. Puisqu'il y a formation de lithiases même en absence d'augmentation de la saturation, il est postulé que la réduction de l'inhibition de la cristallisation explique la calculose chez ces patients. Le lod score pour les trois gènes était moins de 0.3 et ce, pour les 3 statuts d'affection (données non présentées). Il a été conclu que les locus codant pour

ces trois inhibiteurs de la cristallisation ne sont pas impliqués dans la formation de lithiase calcique dans notre population. Pour cette étude, il a été admis que la diminution de l'activité d'inhibition était présente chez les individus lithiasiques normocalciuriques. Cependant, elle n'exclue pas la possibilité que le défaut d'inhibition soit présent plutôt chez les individus lithiasiques hypercalciuriques. Dans cette éventualité, le groupe contrôle devrait être constitué de patients hypercalciuriques non-lithiasiques.

## 9.6 Criblage du génome

Contrairement à l'approche des gènes candidats qui s'intéresse à un endroit particulier du génome, l'approche criblage du génome teste tous les chromosomes. Cette approche possède l'avantage de ne nécessiter aucune connaissance sur la fonction des gènes recherchés. Cette approche permet aussi une estimation du nombre de locus de susceptibilité. La cartographie des traits complexes tels que le diabète de type I<sup>172</sup>, la sclérose en plaques<sup>173</sup>, le glaucome à angle ouvert<sup>174</sup> et la schizophrénie<sup>175</sup> démontre la faisabilité de cette approche.

Un premier criblage du génome a été complété utilisant un total de 96 individus représentant 67 paires de germains. Parce qu'ils augmentent la puissance de détection d'une liaison<sup>123</sup>, les parents de second degré ont été inclus dans les analyses. Le génotype de 378 marqueurs, avec une résolution moyenne de 9 cM, a été déterminé. Le statut d'affection a été déterminé à partir d'une grille de pointage (tableau 8). Pour être considéré atteint, un individu doit avoir un total de 4 points, ce qui exclue la possibilité d'incorporer des individus non-lithiasiques.

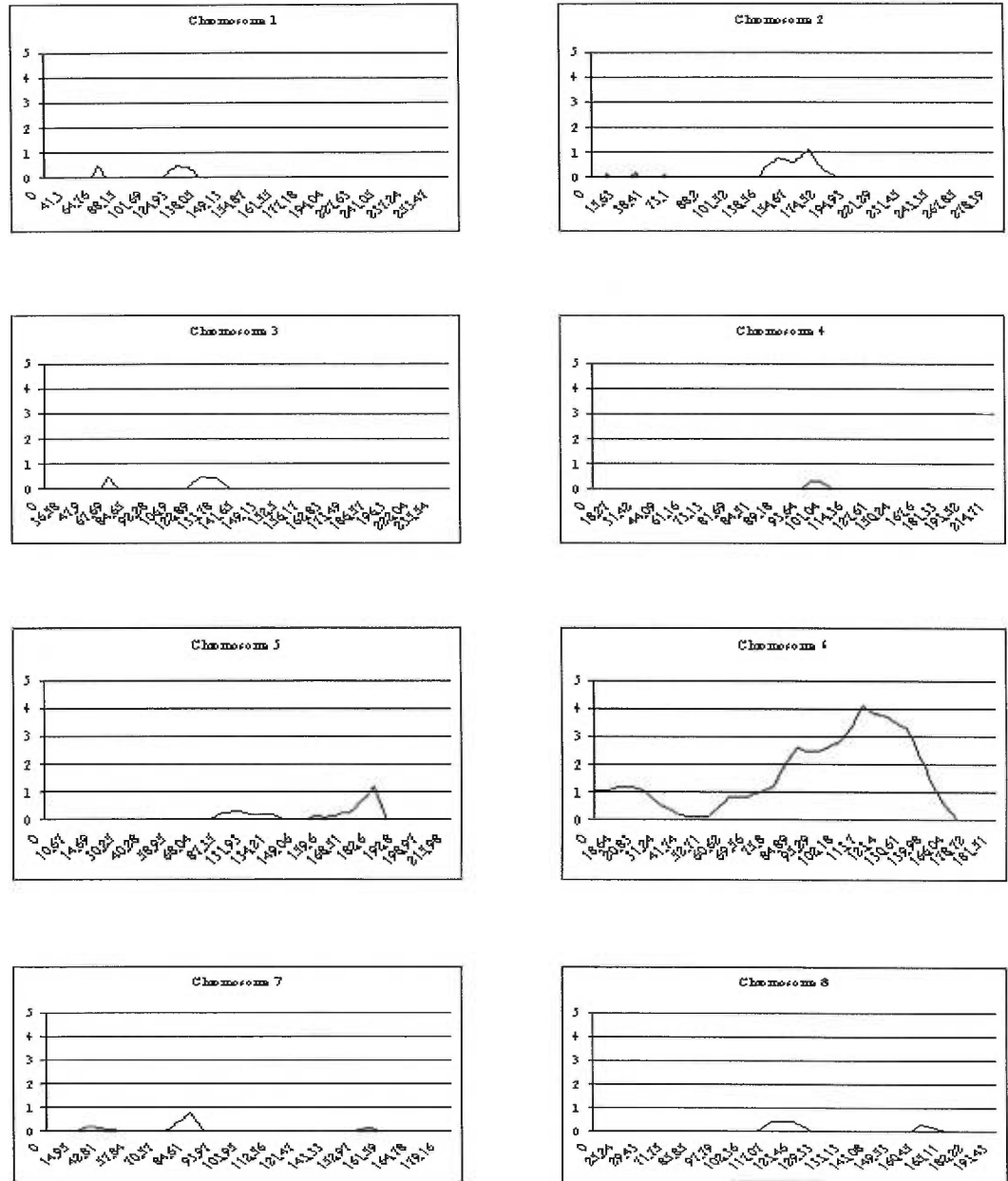
**Tableau 8. Critères diagnostiques pour le criblage du génome**

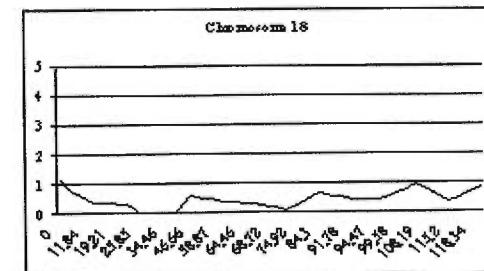
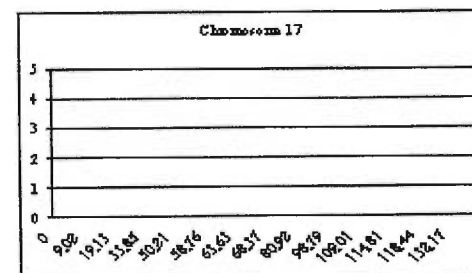
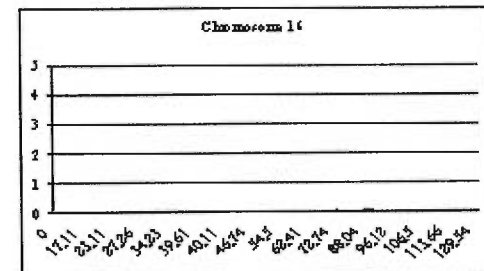
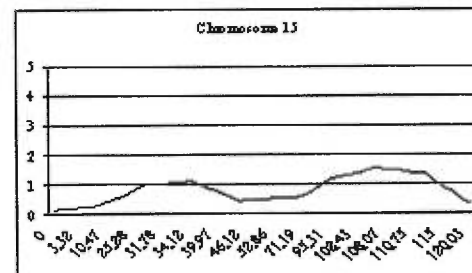
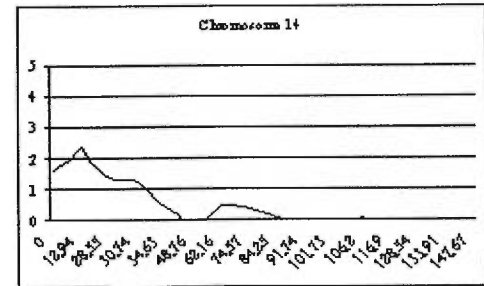
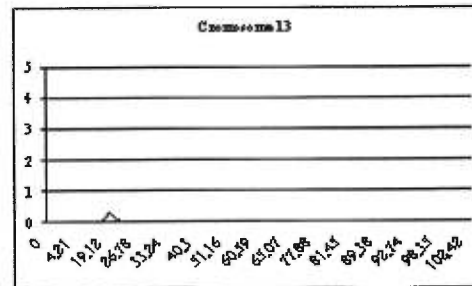
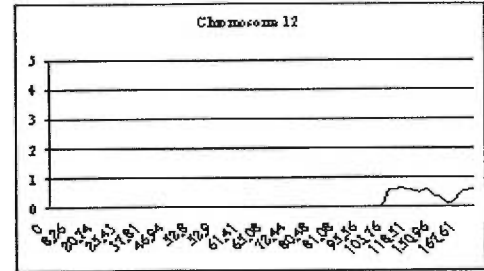
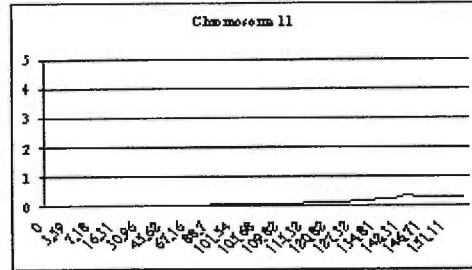
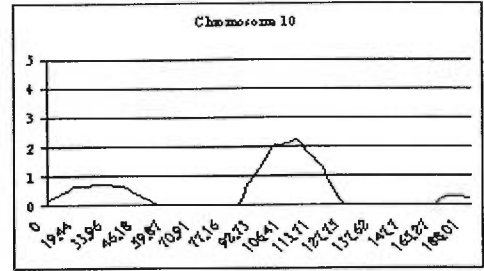
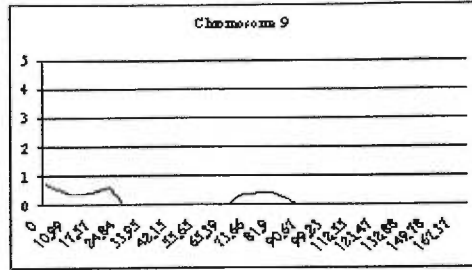
	1 point	2 points
Nombres d'épisode	1	≥ 2
Âge au 1 <sup>er</sup> épisode	≤ 35 ans	≤ 25 ans
Calciurie des 24h	50 <sup>ième</sup> (0.069mmol/kg/j)	75 <sup>ième</sup> (0.098mmol/kg/j)

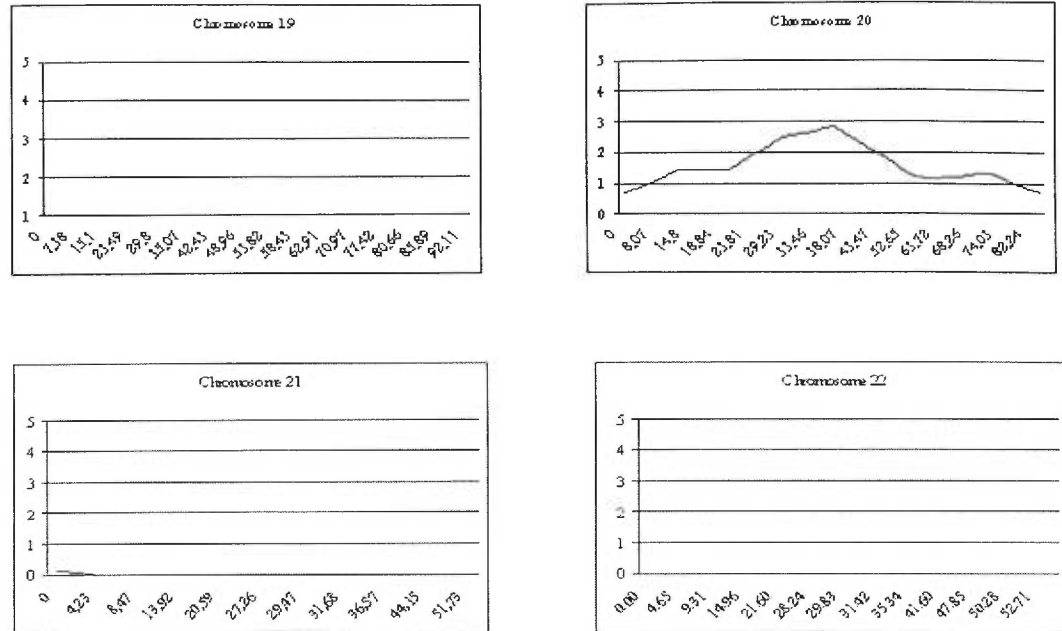
Pour cette étude, l'analyse des paires d'individus atteints a été effectuée par le calcul de la statistique NPL (all) du programme GENEHUNTER<sup>176</sup>. Cette analyse permet l'utilisation de toutes les paires d'individus atteints d'une même famille sans assumer un modèle génétique et corrige pour la taille de la fratrie. Les résultats rapportés proviennent de l'analyse multipoint des chromosomes entiers. Tous les graphes

représentent la mesure de la statistique NPL (all) sur la distance relative en cM (figure 6).

Figure 6. Criblage du génome







Ces résultats représentent le premier criblage du génome à être complété visant l'identification des gènes de susceptibilité de la lithiase calcique. Les résultats prometteurs (NPL > 2) proviennent des chromosomes 6 (NPL = 4.1), 10 (NPL = 2.2), 14 (NPL = 2.4) et 20 (NPL = 2.8). L'hypercalciurie absorptive a été précédemment liée à une région de 4.3Mb sur le chromosome 1 (1q23.3-q24)<sup>177</sup>. Les résultats introduits précédemment ne suggèrent pas la présence de ce locus dans notre échantillon de patients lithiasiques. Des divergences dans la définition du phénotype et des populations étudiées peuvent expliquer l'apparente contradiction des résultats. La seconde étape du criblage consiste à confirmer ces résultats afin de distinguer les faux positifs des vrais. Le criblage du génome en deux étapes<sup>178</sup> stipule qu'en plus des marqueurs du premier passage, un second groupe de marqueurs localisés dans les régions candidates (e.g. NPL > 1, 8 régions au total), sera employé. Comme pour toutes les études génétiques, il sera nécessaire de répliquer ces résultats dans des échantillons indépendants avant de conclure définitivement. Les résultats de ces études devraient permettre l'identification des gènes de susceptibilité à la lithiase calcique et/ou à l'hypercalciurie.

## 10 Conclusions

Dans cette étude, nous avons effectué des analyses de liaison génétique avec des gènes candidats de la lithiase calcique et de l'hypercalciurie idiopathique. Des évidences de liaison ont été observées avec le trait lithiasique et la calciurie au locus du récepteur de la vitamine D. Des études supplémentaires sont nécessaires avant de conclure de façon définitive, particulièrement à la lumière des résultats préliminaires du criblage du génome, négatifs pour cette région.

Nous avons exclu les locus de la  $1\alpha$ -hydroxylase et du récepteur sensible au calcium dans notre échantillon de familles lithiasiques hypercalciuriques d'origine canadienne-française. Ces résultats ne supportent pas un rôle majeur pour ces locus à la susceptibilité de la néphrolithiase calcique et l'hypercalciurie dans notre population.

Les résultats préliminaires du criblage du génome suggèrent plusieurs régions chromosomiques potentiellement intéressantes. Il est cependant nécessaire de confirmer ces résultats par l'étude d'un second groupe indépendant d'individus. Ces études devraient permettre l'identification des gènes de susceptibilité à la lithiase calcique et de l'hypercalciurie, nécessaire à une meilleure compréhension des évènements pathogéniques de ces désordres. Ce n'est qu'à ce moment que nous pourrons envisager la caractérisation du rôle étiologique présumé des facteurs environnementaux de même que les interactions gène-gène et gène-environnement.



## 11 Références

1. Coe, F., Parks, J. & Asplin, J. The pathogenesis and treatment of kidney stones. *New England J Medecine* **327**, 1141-1152 (1992).
2. Clark, J.Y., Thompson, I.M. & Optenberg, S.A. Economic impact of urolithiasis in the United States. *J Urol* **154**, 2020-2024 (1995).
3. Ljunghall, S. & Hedstrand, H. Epidemiology of renal stones in a middle-aged male population. *Acta Med Scand* **197**, 439-445 (1975).
4. Coe, F. & Parks, J. Clinical approach. in *Nephrolithiasis: Pathogenesis and treatment* (eds. Coe, F. & Parks, J.) 1-37 (Year Book Medical Publishers, Chicago, 1988).
5. Ljunghall, S., Lithell, H. & Skarfors, E. Prevalence of renal stones in 60-year-old men. A 10-year follow-up study of a health survey. *Br J Urol* **60**, 10-13 (1987).
6. Pak, C. *et al.* Ambulatory evaluation of nephrolithiasis. Classification, clinical presentation and diagnostic criteria. *Am J Med* **69**, 19-30 (1980).
7. Levy, F., Adams-Huet, M. & Pak, C. Ambulatory evaluation of nephrolithiasis: an update of a 1980 protocol. *Am J Med* **98**, 50-59 (1995).
8. Robert, M. & Averous, M. Fundamental bases of urinary oxalo-calcic lithogenesis. *J Urol (Paris)* **100**, 40-42 (1994).
9. Mandel, N. Mechanism of stone formation. *Semin Nephrol* **16**, 364-374 (1996).
10. Lieske, J.C., Hammes, M.S. & Toback, F.G. Role of calcium oxalate monohydrate crystal interactions with renal epithelial cells in the pathogenesis of nephrolithiasis: a review. *Scanning Microsc* **10**, 519-533 (1996).
11. Kaiser, E.T. & Bock, S.C. Protein inhibitors of crystal growth. *Journal of Urology* **141**, 750-2 (1989).
12. Worcester, E.M. Urinary calcium oxalate crystal growth inhibitors. *J Am Soc Nephrol* **5**, S46-53 (1994).
13. Worcester, E.M. Inhibitors of stone formation. *Semin Nephrol* **16**, 474-486 (1996).

14. Nakagawa, Y. *et al.* Urine glycoprotein crystal growth inhibitors. Evidence for a molecular abnormality in calcium oxalate nephrolithiasis. *J Clin Invest* **76**, 1455-1462 (1985).
15. Shiraga, H. *et al.* Inhibition of calcium oxalate crystal growth in vitro by uropontin: another member of the aspartic acid-rich protein superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 426-430 (1992).
16. Atmani, F. *et al.* Molecular characteristics of uronic-acid-rich protein, a strong inhibitor of calcium oxalate crystallization in vitro. *Biochemical & Biophysical Research Communications* **191**, 1158-65 (1993).
17. Hess, B. Tamm-Horsfall glycoprotein and calcium nephrolithiasis. *Miner Electrolyte Metab* **20**, 393-398 (1994).
18. Trinchieri, A. Epidemiology of urolithiasis. *Arch Ital Urol Androl* **68**, 203-249 (1996).
19. Hodgkinson, A. & Marshall, R. Changes in the composition of urinary tract stones. *Invest Urol* **13**, 131-135 (1975).
20. Trinchieri, A. *et al.* Increase in the prevalence of symptomatic upper urinary tract stones during the last ten years. *Eur Urol* **37**, 23-25 (2000).
21. Robertson, W., Peacock, M., Marshall, R., Speed, R. & Nordin, B. Seasonal variations in the composition of urine in relation to calcium stone-formation. *Clin Sci Mol Med* **49**, 597-602 (1975).
22. Curhan, G.C., Willett, W.C., Rimm, E.B. & Stampfer, M.J. A prospective study of dietary calcium and other nutrients and the risk of symptomatic kidney stones. *N Engl J Med* **328**, 833-838 (1993).
23. Breslau, N., Brinkley, L., Hill, K. & Pak, C. Relationship of animal protein-rich diet to kidney stone formation and calcium metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* **66**, 140-146 (1988).
24. McGeown, M. Heredity in renal stone disease. *Clin Sci* **19**, 465-471 (1960).
25. Resnick, M., Pridgen, D. & Goodman, H. Genetic predisposition to formation of calcium oxalate renal calculi. *N Engl J Med* **278**, 1313-1318 (1968).
26. Ljunghall, S. Family history of renal stones in a population study of stone formers and healthy subjects. *Br J Urol* **51**, 249-252 (1979).
27. Trinchieri, A., Mandressi, A., Luongo, P., Coppi, F. & Pisani, E. Familial aggregation of renal calcium stone disease. *J Urol* **139**, 478-481 (1988).

28. Curhan, G.C., Willett, W.C., Rimm, E.B. & Stampfer, M.J. Family history and risk of kidney stones. *J Am Soc Nephrol* **8**, 1568-1573 (1997).
29. Risch, N. Linkage strategies for genetically complex traits. I. Multilocus models. *Am J Hum Genet* **46**, 222-228 (1990a).
30. Robertson, W. *et al.* Studies on the prevalence and epidemiology of urinary stone disease in men in Leeds. *Br J Urol* **55**, 595-598 (1983).
31. Allen, G., Harvald, B. & Shields, J. Measures of twin concordance. *Acta Genet* **17**, 475-481 (1967).
32. Marya, R.K., Dadoo, R.C. & Sharma, N.K. Genetic predisposition to renal stone disease in the first-degree relatives of stone-formers. *Urol Int* **36**, 245-247 (1981).
33. Danpure, C.J. & Purdue, P.E. Primary Hyperoxaluria. in *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, Vol. II (eds. Scriver, C., Beaudet, A., Sly, W. & Valle, D.) 2385-2424 (McGraw-Hill, New York, 1995).
34. Buckalew, V.M., Jr. Nephrolithiasis in renal tubular acidosis. *Journal of Urology* **141**, 731-737 (1989).
35. Lloyd, S. *et al.* A common molecular basis for three inherited kidney stone diseases. *Nature* **379**, 445-449 (1996).
36. Scheinman, S.J. *et al.* Mapping the gene causing X-linked recessive nephrolithiasis to Xp11.22 by linkage studies. *J Clin Invest* **91**, 2351-2357 (1993).
37. Hurwitz, S. Homeostatic control of plasma calcium concentration. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **31**, 41-100 (1996).
38. Jones, G., Strugnell, S.A. & DeLuca, H.F. Current understanding of the molecular actions of vitamin D. *Physiol Rev* **78**, 1193-1231 (1998).
39. Kumar, R. Calcium transport in epithelial cells of the intestine and kidney. *J Cell Biochem* **57**, 392-398 (1995).
40. Saarem, K., Bergseth, S., Oftebro, H. & Pedersen, J. Subcellular localization of vitamin D<sub>3</sub> 25-hydroxylase in human liver. *J Biol Chem* **259**, 10936-10940 (1984).
41. Takeyama, K. *et al.* 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub> 1 $\alpha$ -hydroxylase and vitamin D synthesis. *Science* **277**, 1827-1830 (1997).

42. Malloy, P.J. *et al.* Hereditary vitamin D resistant rickets caused by a novel mutation in the vitamin D receptor that results in decreased affinity for hormone and cellular hyporesponsiveness. *J Clin Invest* **99**, 297-304 (1997).
43. Monkawa, T. *et al.* Molecular cloning of cDNA and genomic DNA for human 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> 1 alpha-hydroxylase. *Biochem Biophys Res Commun* **239**, 527-533 (1997).
44. Wikwall, K. *et al.* Evidence for multiple 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> 1 $\alpha$ -hydroxylases in the kidney. in *10th workshop on vitamin D* 144 (, Strasbourg, France, 1997).
45. Brenza, H.L. *et al.* Parathyroid hormone activation of the 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>-1alpha- hydroxylase gene promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 1387-1391 (1998).
46. Haussler, M.R. *et al.* The vitamin D hormone and its nuclear receptor: molecular actions and disease states. *J Endocrinol* **154**, S57-73 (1997).
47. Hsieh, J.C. *et al.* Human vitamin D receptor is selectively phosphorylated by protein kinase C on serine 51, a residue crucial to its trans-activation function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 9315-9319 (1991).
48. Ozono, K., Sone , T. & Pike, J. The genomic mechanism of action of 1,25-dihydroxyvitamine D<sub>3</sub>. *J Bone Miner Res* **6**, 1021-1027 (1991).
49. Demay, M.B., Gerardi, J.M., DeLuca, H.F. & Kronenberg, H.M. DNA sequences in the rat osteocalcin gene that bind the 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptor and confer responsiveness to 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 369-373 (1990).
50. Noda, M. *et al.* Identification of a DNA sequence responsible for binding of the 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptor and 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> enhancement of mouse secreted phosphoprotein 1 (SPP-1 or osteopontin) gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 9995-9999 (1990).
51. Okazaki, T., Igarashi, T. & Kronenberg, H.M. 5'-flanking region of the parathyroid hormone gene mediates negative regulation by 1,25-(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub>. *J Biol Chem* **263**, 2203-2208 (1988).

52. Zierold, C., Darwish, H.M. & DeLuca, H.F. Two vitamin D response elements function in the rat 1,25-dihydroxyvitamin D 24-hydroxylase promoter. *J Biol Chem* **270**, 1675-1678 (1995).
53. Christakos, S., Gill, R., Lee, S. & Li, H. Molecular aspects of the calbindins. *J Nutr* **122**, 678-682 (1992).
54. Schneider, H., Feyen, J.H., Seuwen, K. & Movva, N.R. Cloning and functional expression of a human parathyroid hormone receptor. *Eur J Pharmacol* **246**, 149-155 (1993).
55. Abou-Samra, A.B. *et al.* Structure, function, and expression of the receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide. *Adv Nephrol Necker Hosp* **23**, 247-264 (1994).
56. Brown, E.M., Pollak, M. & Hebert, S.C. Molecular mechanisms underlying the sensing of extracellular Ca<sup>2+</sup> by parathyroid and kidney cells. *Eur J Endocrinol* **132**, 523-531 (1995).
57. Brown, E.M., Pollak, M. & Hebert, S.C. The extracellular calcium-sensing receptor: its role in health and disease. *Annu Rev Med* **49**, 15-29 (1998).
58. Spiegel, A.M. Defects in G protein-coupled signal transduction in human disease. *Annu Rev Physiol* **58**, 143-170 (1996).
59. Brown, E. *et al.* High extracellular Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> stimulate accumulation of inositol phosphates in bovine parathyroid cells. *FEBS Lett* **218**, 113-118 (1987).
60. Riccardi, D. *et al.* Localization of the extracellular Ca(2+)-sensing receptor and PTH/PTHrP receptor in rat kidney. *Am J Physiol* **271**, F951-6 (1996).
61. Sands, J.M. *et al.* Apical extracellular calcium/polyvalent cation-sensing receptor regulates vasopressin-elicited water permeability in rat kidney inner medullary collecting duct. *J Clin Invest* **99**, 1399-1405 (1997).
62. Lemann, J. Idiopathic hypercalciuria. in *Nephrolithiasis* (eds. Coe, F., Brenner, B. & Stein, J.) 86-115 (Churchill Livingstone, New York, 1980).
63. Coe, F. & Bushinsky, D. Pathophysiology of hypercalciuria. *Am J Physiol* **247**, F1-F13 (1984).
64. Robertson, W.G. & Morgan, D.B. The distribution of urinary calcium excretions in normal persons and stone-formers. *Clin Chim Acta* **37**, 503-508 (1972).
65. Coe, F., Parks, J. & Moore, E. Familial idiopathic hypercalciuria. *N Engl J Med* **300**, 337-340 (1979).

66. Mehes, K. & Szelid, Z. Autosomal dominant inheritance of hypercalciuria. *Eur J Pediatr* **133**, 239-242 (1980).
67. Pak, C., Mc Guire, J. & Peterson, R. Familial absorptive hypercalciuria in a large kindred. *J Urol* **126**, 717-719 (1981).
68. Goodman, H., Holmes, R. & Assimos, D. Genetic factors in calcium oxalate stone disease. *J Uro* **153**, 301-307 (1995).
69. Davis, R.H., Morgan, D.B. & Rivlin, R.S. The excretion of calcium in the urine and its relation to calcium intake, sex and age. *Clin Sci* **39**, 1-12 (1970).
70. Morgan, B. & Robertson, W.G. The urinary excretion of calcium. An analysis of the distribution of values in relation to sex, age and calcium deprivation. *Clin Orthop* **101**, 254-267 (1974).
71. Hodgkinson, A. & Pyrah, L. The urinary excretion of calcium and inorganic phosphate in 344 patients with calcium stone of renal origin. *Br J Surg* **46**, 10-18 (1958).
72. Pak, C. Physiological basis for absorptive and renal hypercalciurias. *Am J Physiol* **237**, F415-F423 (1979).
73. Pak, C., Kaplan, R., Bone, H., Townsend, J. & Waters, O. A simple test for the diagnosis of absorptive, resorptive and renal hypercalciurias. *New Engl J Med* **292**, 497-500 (1975).
74. Aladjem, M., Barr, J., Lahat, E. & Bistrizter, T. Renal and absorptive hypercalciuria: a metabolic disturbance with varying and interchanging modes of expression. *Pediatrics* **97**, 216-219 (1996).
75. Pak, C., Ohata, M., Lawrence, E. & Snyder, W. The hypercalciurias: Causes, parathyroid functions, and diagnostic criteria. *J Clin Invest* **54**, 387-400 (1974).
76. Breslau, N.A. Pathogenesis and management of hypercalciuric nephrolithiasis. *Miner Electrolyte Metab* **20**, 328-339 (1994).
77. Kumar, R. Vitamin D metabolism and mechanisms of calcium transport. *J Am Soc Nephrol* **1**, 30-42 (1990).
78. Kaplan, R., Haussler, M., Deftos, L., Bone, H. & Pak, C. The role of  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D in the mediation of intestinal hyperabsorption of calcium in primary hyperparathyroidism and absorptive hypercalcemia. *J Clin Invest* **59**, 756-760 (1977).

79. Shen, F. *et al.* Increased serum 1,25-dihydroxyvitamin D in idiopathic hypercalciuria. *J Lab Clin Med* **90**, 955-962 (1977).
80. Gray, R., Wilz, D., Caldas, A. & Lemann, J.J. The importance of phosphate in regulating plasma 1,25-(OH)<sub>2</sub>-vitamin D levels in humans: studies in healthy subjects in calcium-stone formers and in patients with primary hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* **45**, 299-306 (1977).
81. Coe, F. *et al.* Effects of low-calcium diet on urine calcium excretion, parathyroid function and serum 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> levels in patients with idiopathic hypercalciuria and in normal subjects. *Am J Med* **72**, 25-32 (1982).
82. Adams, N., Gray, R., Lemann, J.J. & Cheung, H. Effects of calcitriol administration on calcium metabolism healthy men. *Kidney Int* **21**, 90-97 (1982).
83. Broadus, A.E., Erickson, S.B., Gertner, J.M., Cooper, K. & Dobbins, J.W. An experimental human model of 1,25-dihydroxyvitamin D-mediated hypercalciuria. *J Clin Endocrinol Metab* **59**, 202-206 (1984).
84. Maierhofer, W.J., Lemann, J., Jr., Gray, R.W. & Cheung, H.S. Dietary calcium and serum 1,25-(OH)<sub>2</sub>-vitamin D concentrations as determinants of calcium balance in healthy men. *Kidney Int* **26**, 752-759 (1984).
85. Strom, M., Sandgren, M., Brown, T. & DeLuca, H. 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> up-regulates the 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptor in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 9770-9773 (1989).
86. Bushinsky, D.A. & Favus, M.J. Mechanism of hypercalciuria in genetic hypercalciuric rats. Inherited defect in intestinal calcium transport. *J Clin Invest* **82**, 1585-1591 (1988).
87. Bushinsky, D.A., Kim, M., Sessler, N.E., Nakagawa, Y. & Coe, F.L. Increased urinary saturation and kidney calcium content in genetic hypercalciuric rats. *Kidney Int* **45**, 58-65 (1994).
88. Bushinsky, D.A., Grynepas, M.D., Nilsson, E.L., Nakagawa, Y. & Coe, F.L. Stone formation in genetic hypercalciuric rats. *Kidney Int* **48**, 1705-1713 (1995).
89. Favus, M.J. Hypercalciuria: lessons from studies of genetic hypercalciuric rats. *J Am Soc Nephrol* **5**, S54-58 (1994).
90. Tsuruoka, S., Bushinsky, D.A. & Schwartz, G.J. Defective renal calcium reabsorption in genetic hypercalciuric rats. *Kidney Int* **51**, 1540-1547 (1997).

91. Bushinsky, D.A., Neumann, K.J., Asplin, J. & Krieger, N.S. Alendronate decreases urine calcium and supersaturation in genetic hypercalciuric rats. *Kidney Int* **55**, 234-243 (1999).
92. Li, X.Q., Tembe, V., Horwitz, G.M., Bushinsky, D.A. & Favus, M.J. Increased intestinal vitamin D receptor in genetic hypercalciuric rats. A cause of intestinal calcium hyperabsorption. *J Clin Invest* **91**, 661-667 (1993).
93. Krieger, N.S., Stathopoulos, V.M. & Bushinsky, D.A. Increased sensitivity to 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in bone from genetic hypercalciuric rats. *Am J Physiol* **271**, C130-5 (1996).
94. Yao, J., Kathpalia, P., Bushinsky, D.A. & Favus, M.J. Hyperresponsiveness of vitamin D receptor gene expression to 1, 25- dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. A new characteristic of genetic hypercalciuric stone-forming rats. *J Clin Invest* **101**, 2223-2232 (1998).
95. Risch, N. Assessing the role of HLA-linked and unlinked determinants of disease. *Am J Hum Genet* **40**, 1-14 (1987).
96. Thomson, G. HLA disease associations: models for the study of complex human genetic disorders. *Crit Rev Clin Lab Sci* **32**, 183-219 (1995).
97. Lander, E. & Schork, N. Genetic dissection of complex traits. *Science* **265**, 2037-2048 (1994).
98. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/> . .
99. Hudson, T.J. Joe Doupe Young Investigators Award. The Human Genome Project: tools for the identification of disease genes. *Clin Invest Med* **21**, 267-276 (1998).
100. Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M. & Davis, R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* **32**, 314-331 (1980).
101. Kruglyak, L. The use of a genetic map of biallelic markers in linkage studies. *Nat Genet* **17**, 21-24 (1997).
102. Collins, F.S., Guyer, M.S. & Charkravarti, A. Variations on a theme: cataloging human DNA sequence variation. *Science* **278**, 1580-1581 (1997).
103. Wang, D.G. *et al.* Large-scale identification, mapping, and genotyping of single- nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science* **280**, 1077-1082 (1998).



104. Thomson, G., Robinson, W.P., Kuhner, M.K., Joe, S. & Klitz, W. HLA and insulin gene associations with IDDM. *Genet Epidemiol* **6**, 155-160 (1989).
105. Thomson, G. Mapping disease genes: family based association studies. *Am J Hum Genet* **57**, 487-498 (1995).
106. Spielman, R., McGinnis, R. & Ewens, W. Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin dependent diabetes mellitus (IDDM). *Am J Hum Genet* **52**, 506-516 (1993).
107. Falk, C.T. & Rubinstein, P. Haplotype relative risks: an easy reliable way to construct a proper control sample for risk calculations. *Ann Hum Genet* **51**, 227-233 (1987).
108. Morton, N.E. Sequential tests for the detection of linkage. *Am J Hum Genet* **7**, 277-318 (1955).
109. Haseman, J. & Elston, R. The investigation of linkage between a quantitative trait and a marker locus. *Behav Genet* **2**, 3-19 (1972).
110. Suarez, B., Rice, J. & Reich, T. The generalized sib pair IBD distribution: its use in the detection of linkage. *Ann Hum Genet* **42**, 87-94 (1978).
111. Blackwelder, W.C. & Elston, R.C. A comparison of sib-pair linkage tests for disease susceptibility loci. *Genet Epidemiol* **2**, 85-97 (1985).
112. Lemann, J., Jr., Worcester, E.M. & Gray, R.W. Hypercalciuria and stones. *Am J Kidney Dis* **17**, 386-391 (1991).
113. Favus, M.J., Mangelsdorf, D.J., Tembe, V., Coe, B.J. & Haussler, M.R. Evidence for in vivo upregulation of the intestinal vitamin D receptor during dietary calcium restriction in the rat. *J Clin Invest* **82**, 218-224 (1988).
114. Chattopadhyay, N., Mithal, A. & Brown, E.M. The calcium-sensing receptor: a window into the physiology and pathophysiology of mineral ion metabolism. *Endocr Rev* **17**, 289-307 (1996).
115. Pearce, S.H. *et al.* A familial syndrome of hypocalcemia with hypercalciuria due to mutations in the calcium-sensing receptor. *New England Journal of Medicine* **335**, 1115-1122 (1996).
116. Hoopes Jr, R. *et al.* Mapping quantitative trait loci for hypercalciuria in the genetic stone-forming rat [Abstract]. *J Am Soc Nephrol* **8**, 563 (1997).

117. Zerwekh, J.E. *et al.* Normal vitamin D receptor concentration and responsiveness to 1, 25- dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in skin fibroblasts from patients with absorptive hypercalciuria. *Miner Electrolyte Metab* **24**, 307-313 (1998).
118. Zerwekh, J.E. *et al.* Evidence for normal vitamin D receptor messenger ribonucleic acid and genotype in absorptive hypercalciuria. *J Clin Endocrinol Metab* **80**, 2960-2965 (1995).
119. Saijo, T. *et al.* A unique mutation in the vitamin D receptor gene in three Japanese patients with vitamin D-dependent rickets type II: utility of single- strand conformation polymorphism analysis for heterozygous carrier detection. *Am J Hum Genet* **49**, 668-673 (1991).
120. Gross, C. *et al.* The presence of a polymorphism at the translation initiation site of the vitamin D receptor gene is associated with low bone mineral density in postmenopausal Mexican-American women. *J Bone Miner Res* **11**, 1850-1055 (1996).
121. Arai, H. *et al.* A vitamin D receptor gene polymorphism in the translation initiation codon: effect on protein activity and relation to bone mineral density in Japanese women. *J Bone Miner Res* **12**, 915-921 (1997).
122. Jurutka, P.W. *et al.* The polymorphic N terminus in human vitamin D receptor isoforms influences transcriptional activity by modulating interaction with transcription factor IIB. *Mol Endocrinol* **14**, 401-420 (2000).
123. Risch, N. Linkage strategies for genetically complex traits. II. The power of the affected relative pairs. *Am J Hum Genet* **46**, 229-241 (1990b).
124. Risch, N. Linkage strategies for genetically complex traits. III. The effect of marker polymorphism on analysis of affected relative pairs. *Am J Hum Genet* **46**, 242-253 (1990c).
125. Hauser, E.R., Boehnke, M., Guo, S.W. & Risch, N. Affected-sib-pair interval mapping and exclusion for complex genetic traits: sampling considerations. *Genet Epidemiol* **13**, 117-137 (1996).
126. Kruglyak, L. & Lander, E. Complete multipoint sib-pair analysis of qualitative and quantitative traits. *Am J Hum Genet* **57**, 439-454 (1995).
127. Kahn, P. Gene hunters close in on elusive prey. *Nature* **271**, 1352-1354 (1996).

128. Leal, S.M. & Ott, J. Effects of stratification in the analysis of affected-sib-pair data: benefits and costs. *Am J Hum Genet* **66**, 567-575 (2000).
129. Risch, N. A note on multiple testing procedures in linkage analysis. *Am J Hum Genet* **48**, 1058-0164 (1991).
130. Van Broeckhoven, C. *et al.* Mapping of a gene predisposing to early-onset Alzheimer's disease to chromosome 14q24.3. *Nat Genet* **2**, 335-339 (1992).
131. Spurr, N.K. *et al.* Linkage analysis of early-onset breast and ovarian cancer families, with markers on the long arm of chromosome 17. *Am J Hum Genet* **52**, 777-785 (1993).
132. Miki, Y. *et al.* A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* **266**, 66-71 (1994).
133. Jeunemaitre, X. *et al.* Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. *Cell* **71**, 169-180 (1992).
134. Vitale, C., Marangella, M., Cosseddu, D., Tricerri, A. & Linari, F. Clinical and biochemical patterns of presentation in monolateral and bilateral calcium nephrolithiasis. *Clin Nephrol* **47**, 23-27 (1997).
135. Hastbacka, J. *et al.* Linkage disequilibrium mapping in isolated founder populations: diastrophic dysplasia in Finland. *Nat Genet* **2**, 204-211 (1992).
136. de la Chapelle, A. & Wright, F.A. Linkage disequilibrium mapping in isolated populations: the example of Finland revisited. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 12416-12423 (1998).
137. Labuda, M. *et al.* Linkage disequilibrium analysis in young populations: pseudo-vitamin-D-Deficiency rickets and the founder effect in French Canadians. *Am J Hum Gen* **59**, 633-643 (1996).
138. Bronner, F. Renal calcium transport: mechanisms and regulation--an overview. *Am J Physiol* **257**, F707-11 (1989).
139. Johnson, J.A. & Kumar, R. Renal and intestinal calcium transport: roles of vitamin D and vitamin D-dependent calcium binding proteins. *Semin Nephrol* **14**, 119-128 (1994).
140. Friedman, P.A. & Gesek, F.A. Cellular calcium transport in renal epithelia: measurement, mechanisms, and regulation. *Physiol Rev* **75**, 429-471 (1995).
141. Yu, A.S. Calcium channels. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **3**, 497-503 (1994).

142. Borke, J., Minami, J., Verma, A.K. & al., e. Monoclonal antibodies to the human erythrocyte Ca + Mg adenosine triphosphate pump recognize an epitope in the basolateral membrane of human kidney distal tubule cells. *J Clin Invest* **80**, 1225- (1987).
143. Van Os, C.H. Transcellulaire calcium transport in intestinal and renal epithelial cells. *Biochim Biophys Acta* **79**, 19-31 (1987).
144. Stauffer, T.P., Guerini, D. & Carafoli, E. Tissue distribution of the four gene products of the plasma membrane Ca<sup>2+</sup> pump. A study using specific antibodies. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 12184-90 (1995).
145. Ramachandran, C. & Brunette, M.G. The renal Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange system is located exclusively in the distal tubule. *Biochem J* **257**, 259- (1989).
146. White, K.E., Gesek, F.A. & Friedman, P.A. Structural and functional analysis of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange in distal convoluted tubule cells. *Am J Physiol* **271**, F560-570 (1996).
147. Borke, J.L., Caride, A., Verma, A.K., Penniston, J.T. & Kumar, R. Plasma membrane calcium pump and 28-kDa calcium binding protein in cells of rat kidney distal tubules. *Am J Physiol* **257**, F842-849 (1989).
148. Bindels, R.J.M., Timmermans, J.A.H., Hartog, A. & Van Os, C.H. Immunochemical characterization of paralbumin, calbindin-D9K and D28K in rat kidney. *Kidney Int* **37**, 454- (1990).
149. Hoenderop, J.G. *et al.* Molecular identification of the apical Ca<sup>2+</sup> channel in 1, 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-responsive epithelia. *J Biol Chem* **274**, 8375-8378 (1999).
150. Olson, S., Wang, M.G., Carafoli, E., Strehler, E.E. & McBride, O.W. Localization of two genes encoding plasma membrane Ca<sup>2+</sup>(+)-transporting ATPases to human chromosomes 1q25-32 and 12q21-23. *Genomics* **9**, 629-641 (1991).
151. Bianchi, G. *et al.* Abnormal red-cell calcium pump in patients with idiopathic hypercalciuria. *N Engl J Med* **319**, 897-901 (1988).
152. Jeung, E.B., Krisinger, J., Dann, J.L. & Leung, P.C. Molecular cloning of the full-length cDNA encoding the human calbindin- D9k. *FEBS Lett* **307**, 224-228 (1992).

153. Parmentier, M., Lawson, D.E. & Vassart, G. Human 27-kDa calbindin complementary DNA sequence. Evolutionary and functional implications. *Eur J Biochem* **170**, 207-215 (1987).
154. Howard, A., Legon, S., Spurr, N.K. & Walters, J.R. Molecular cloning and chromosomal assignment of human calbindin-D9k. *Biochem Biophys Res Commun* **185**, 663-669 (1992).
155. Parmentier, M. *et al.* The human calbindin 27-kDa gene: structural organization of the 5' and 3' regions, chromosomal assignment, and restriction fragment length polymorphism. *Genomics* **4**, 309-319 (1989).
156. Pak, C. The problem of idiopathic stone formers presenting with no metabolic disorders. Pathogenesis and management. *Contrib Nephrol* **58**, 164-171 (1987).
157. Bader, C.A., Chevalier, A., Hennequin, C., Jungers, P. & Daudon, M. Methodological aspects of spontaneous crystalluria studies in calcium stone formers. *Scanning Microsc* **8**, 215-31; discussion 231-2 (1994).
158. Nakagawa, Y., Ahmed, M., Hall, S.L., Deganello, S. & Coe, F.L. Isolation from human calcium oxalate renal stones of nephrocalcin, a glycoprotein inhibitor of calcium oxalate crystal growth. Evidence that nephrocalcin from patients with calcium oxalate nephrolithiasis is deficient in gamma-carboxyglutamic acid. *J Clin Invest* **79**, 1782-1787 (1987).
159. Hess, B., Jaggi, M., Zipperle, L. & al., e. Reduced carbohydrate content of Tamm-Horsfall glycoprotein (THP) from severely recurrent stone formers (RCSF). *J Am Soc Nephrol* **6**, 949 (1995).
160. Romero, M.C., Nocera, S. & Nesse, A.B. Decreased Tamm-Horsfall protein in lithiasic patients. *Clin Biochem* **30**, 63-67 (1997).
161. McKee, M.D., Nanci, A. & Khan, S.R. Ultrastructural immunodetection of osteopontin and osteocalcin as major matrix components of renal calculi. *J Bone Miner Res* **10**, 1913-1929 (1995).
162. Atmani, F., Lacour, B., Jungers, P., Drueke, T. & Daudon, M. Reduced inhibitory activity of uronic-acid-rich protein in urine of stone formers. *Urological Research* **22**, 257-260 (1994).

163. Stapleton, A.M. *et al.* Further evidence linking urolithiasis and blood coagulation: urinary prothrombin fragment 1 is present in stone matrix. *Kidney Int* **49**, 880-8 (1996).
164. Mustafi, D. & Nakagawa, Y. Characterization of Ca(2+)-binding sites in the kidney stone inhibitor glycoprotein nephrocalcin using vanadyl ions: different metal binding properties in strong and weak inhibitor proteins revealed by EPR and ENDOR. *Biochemistry* **35**, 14703-14709 (1996).
165. Asplin, J., DeGanello, S., Nakagawa, Y.N. & Coe, F.L. Evidence that nephrocalcin and urine inhibit nucleation of calcium oxalate monohydrate crystals. *Am J Physiol* **261**, F824-F830 (1991).
166. Hess, B., Nakagawa, Y., Parks, J.H. & Coe, F.L. Molecular abnormality of Tamm-Horsfall glycoprotein in calcium oxalate nephrolithiasis. *Am J Physiol* **260**, F569-578 (1991).
167. Hess, B., Zipperle, L. & Jaeger, P. Citrate and calcium effects on Tamm-Horsfall glycoprotein as a modifier of calcium oxalate crystal aggregation. *Am J Physiol* **265**, F784-91 (1993).
168. Hallson, P.C., Choong, S.K., Kasidas, G.P. & Samuelli, C.T. Effects of Tamm-Horsfall protein with normal and reduced sialic acid content upon the crystallization of calcium phosphate and calcium oxalate in human urine. *Br J Urol* **80**, 533-538 (1997).
169. Sorensen, S., Justesen, S.J. & Johnsen, A.H. Identification of a macromolecular crystal growth inhibitor in human urine as osteopontin. *Urol Res* **23**, 327-334 (1995).
170. Hoyer, J.R. Uropontin in urinary calcium stone formation. *Miner Electrolyte Metab* **20**, 385-392 (1994).
171. Asplin, J.R., Arsenault, D., Parks, J.H., Coe, F.L. & Hoyer, J.R. Contribution of human uropontin to inhibition of calcium oxalate crystallization. *Kidney Int* **53**, 194-199 (1998).
172. Davies, J.L. *et al.* A genome-wide search for human type 1 diabetes susceptibility genes. *Nature* **371**, 130-136 (1994).
173. Ebers, G.C. *et al.* A full genome search in multiple sclerosis. *Nat Genet* **13**, 472-476 (1996).

174. Wiggs, J.L. *et al.* Genome-wide scan for adult onset primary open angle glaucoma. *Hum Mol Genet* **9**, 1109-1117 (2000).
175. Brzustowicz, L.M., Hodgkinson, K.A., Chow, E.W., Honer, W.G. & Bassett, A.S. Location of a major susceptibility locus for familial schizophrenia on chromosome 1q21-q22. *Science* **288**, 678-682 (2000).
176. Kruglyak, L., Daly, M., Reeve-Daly, M. & Lander, M. Parametric and nonparametric linkage analysis: a unified multipoint approach. *Am J Hum Genet* **58**, 1347-1363 (1996).
177. Reed, B.Y., Heller, H.J., Gitomer, W.L. & Pak, C.Y. Mapping a gene defect in absorptive hypercalciuria to chromosome 1q23.3-q24. *J Clin Endocrinol Metab* **84**, 3907-3913 (1999).
178. Elston, R.C., Guo, X. & Williams, L.V. Two-stage global search designs for linkage analysis using pairs of affected relatives. *Genet Epidemiol* **13**, 535-558 (1996).
179. Origines françaises de la population canadienne, 1608-1759, planche 45 et Le repeuplement de la Vallée du St-Laurent, planche 46, *In Atlas historique du Canada, Vol I, Des origines à 1800*. Les presses de l'Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada, 1987.

## 12 Appendices

### 12.1 Appendice 1 : Questionnaire, évaluation des participants

#### QUESTIONNAIRE PERSONNEL - ETUDE DES LITHIASES URINAIRES

Nom: \_\_\_\_\_ Adresse: \_\_\_\_\_

Prénom: \_\_\_\_\_

Sexe: M  F

Tél.: ( ) \_\_\_\_\_

Date de naissance: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Nom du père: \_\_\_\_\_

Nom de la mère: \_\_\_\_\_

1) NOM DU PROPOSANT: \_\_\_\_\_

2) PRENEZ-VOUS DES MEDICAMENTS (NOM ET POSOLOGIE)

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

3) PRÉNEZ-VOUS UN DES MEDICAMENTS SUIVANTS

	OUI	NON
1) Vitamine D, C ou tout autre supplément vitaminique	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2) Suppléments de calcium	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3) Antiacides comme Maalox, Diovol	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4) Diurétiques ou "pilules pour l'eau"	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5) Médicaments pour les ulcères d'estomac: Zantac, Tagamet	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Si oui, durant les collectes urinaires	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

4) ANTECEDENTS PERSONNELS

a) Opération(s):

Age/année	Type d'opération	Médecin	Hôpital
-----------	------------------	---------	---------

_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____

b) Médicaux (Hypertension, diabète, cholestérol...):

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

5) EXAMEN

Date de visite: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Poids: \_\_\_\_\_

Taille: \_\_\_\_\_



6) AVEZ-VOUS DEJA FAIT DES PIERRES AUX REINS: Oui  Non

Si oui, Nombre total d'épisodes \_\_\_\_\_ Rein(s) intéressé(s): gauche \_\_\_\_\_ droit \_\_\_\_\_ ou les 2 \_\_\_\_\_

Date du 1er épisode: \_\_\_\_\_ Age au 1er épisode \_\_\_\_\_

Analyse cristallographique du (des) calcul(s) \_\_\_\_\_

7) DESCRIPTION DE CHAQUE EPISODE DE PIERRE

Age/année/hôpital	Douleurs Dos/Ventre	Urine Sang (Oui)	Infection urinaire (Oui)	Résolution		Evolution		
				Spontanée	Expulsion	Cystoscopie	Opération lithotomie	lithotritie
1e _____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2e _____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3e _____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4e _____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5e _____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
6e _____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7e _____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

8) FACTEURS ASSOCIES

	OUI	NON
Anomalie ou malformation rénale	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Goutte	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Immobilisation prolongée	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Maladie inflammatoire de l'intestin (Crohn, colite ulcéreuse)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Sarcoidose:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Hyperparathyroïdie	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

## 12.2 Appendice 2 : Rôle des inhibiteurs de la cristallisation

### **Exclusion Mapping of Three Crystallization Inhibitor Genes in Calcium Urolithiasis**

**Authors:** Jean-François Cailhier, Martin Petrucci, Patrick Scott, Marie-Lucie Trouvé, Denis Ouimet, Alain Bonnardeaux.

Article soumis à la revue "Kidney International", Mai 2000.

## ABSTRACT

We used a candidate gene approach to determine whether 3 genes coding for putative crystallization inhibitors are linked to stone formation in a cohort of 64 French-Canadian sibships with multiple recurrent calcium stone formers. This comprised 356 pairs of siblings with at least one stone episode. Physical and meiotic mapping of the genes coding for osteopontin and uromodulin (Tamm-Horsfall protein) as well as the osteocalcin-related gene (ORG or putative nephrocalcin) was performed and microsatellite and biallelic markers identified. We used non-parametric linkage analyses on the entire affected sib-pair cohort as well as in affected pairs without apparent hypercalciuric risk factors for calcium stone formation, i.e. concordant for urine calcium excretion below the 25<sup>th</sup> and 50<sup>th</sup> percentiles, respectively. LOD scores were less than 0.3 for all 3 loci using the aforementioned affection statuses. Further analyses allowed to exclude uromodulin at  $\lambda$ s values of 3.9 and 2.5, osteopontin at  $\lambda$ s values of 2.7 and 1.6, and ORG at  $\lambda$ s values of 5.5 and 3.7, respectively for affected sib-pairs concordant for urine calcium excretion below the 25<sup>th</sup> and 50<sup>th</sup> percentiles. We conclude that loci encoding these 3 crystallization inhibitors are unlikely to have major gene effects on calcium stone formation in our population.

## INTRODUCTION

The urine of normal subjects is naturally supersaturated with respect to calcium oxalate, yet only a small proportion will form and pass a stone. A fundamental reason is that the urine is inhibitory to calcium oxalate crystal formation. An important part of this inhibitory activity lies in non-dialyzable urinary protein macromolecules rich in acidic amino acid residues (reviewed in (1)) such as uromodulin (Tamm-Horsfall protein, THP) (2), osteopontin (3, 4) and nephrocalcin (5), that impart variable effects on the nucleation, aggregation and growth of crystals. Such proteins might also favor a shift in the preferred crystalline form of calcium oxalate from monohydrate to dihydrate, the latter crystal having less affinity to attach to epithelial cell surfaces (6). Non-protein molecules such as citrate and magnesium also contribute to the inhibitory activity.

It has long been suspected that impaired crystallization inhibitory activity in human urine predisposes to common calcium urolithiasis. Low excretion of urinary citrate, a non-protein inhibitor of both crystallization (reviewed in (7)) and adhesion of crystals to renal epithelial cells (8), contributes to stone formation in primary renal tubular acidosis. In recurrent stone formers with no apparent biochemical abnormality conducive to stone formation, some (9-12), but not all studies, (13, 14) have reported lower *in vitro* inhibitory activity of either nucleation, aggregation or growth of calcium oxalate crystals. Also, some studies have shown that stone-formers had less crystallization inhibitors in their urine compared to normal subjects (15, 16), and specific biochemical anomalies of inhibitors have been described for nephrocalcin (17-19), osteopontin (20) as well as THP (21-26). Genes coding for

these proteins have been cloned, including nephrocalcin, encoded by the osteocalcin-related gene or ORG (27).

To determine whether genetic variation of the osteopontin, uromodulin and the osteocalcin-related genes cause simple and/or recurrent stone formation, we genetic linkage analyses in French-Canadian sibships with and without hypercalciuria.

## MATERIAL AND METHODS

### **Sibships and Phenotypes**

French Canadian pedigrees were recruited from several specialized stone clinics and lithotripsy units in the province of Quebec as described previously (28, 29). All subjects gave informed consent and were personally interviewed. In addition, medical records were retrieved from appropriate institutions. Probands were included in the study if at least one stone episode could be confirmed by crystallographic (31/55 families) or biochemical (15/55 families) analysis of a calculus, or by the presence of a radio-dense stone (9/55 families) verified by an imaging modality. Urine sampling consisted of a single 24-hour urine collection under a free diet, as well as a calcium loading test (30). Urines with 24-h creatinine excretion outside a 20% limit of that predicted by the Cockcroft-Gault formula (31) were excluded. Standard biochemical analyses on urine and serum samples were performed, as previously described (28).

We used 3 binary phenotypes for the study: 1) passage of a urolithiasis, irrespective of urine calcium excretion; and 2) stone passage with urinary calcium excretion below either the 25<sup>th</sup> (T25) or the 50<sup>th</sup> (T50) percentiles of the siblings sampled. Corresponding 24-h urine calcium excretion values were 0.054 and 0.076 mmol/Kg/d for the T25 and T50 traits, respectively. When 24-h urine collections were incomplete, we used the fasting urine calcium/creatinine ratio values of 0.242 and 0.365 mmol/mmol, respectively for traits T25 and T50. Table 1 describes the sibships available for each trait, and table 2 shows the clinical characteristics of affected and unaffected siblings. Comparisons between different phenotype categories (table 2) in unpaired siblings were performed with Student's t-test.

### **Molecular and Statistical Genetics**

We physically mapped uromodulin, the osteocalcin-related gene (ORG) and the osteopontin (OPN) gene by radiation hybrid mapping using a commercially available panel (GeneBridge 4 panel, Research Genetics, Huntsville, ALA) and PCR methods.

With the help of the Whitehead Institute/MIT server (<http://www.genome.wi.mit.edu>), we were able to map the three genes and select 3 flanking highly polymorphic markers. Siblings were then genotyped by standard PCR/electrophoresis methods on genomic DNA extracted from peripheral leukocytes. We used the CRIMAP and MULTIMAP programs (32, 33) to construct a genetic map for each locus. Genetic linkage analysis was performed with the MAPMAKER/SIBS program version 2.1 (34) with the “all pairs” option weighted by sibship size. The exclude option was used to determine the relative risks ( $\lambda_s$ ) at which we have excluded (lodscore  $< -2.0$ ) each gene in our sibships.

## RESULTS

### Mapping

Sequence tags of the THP, ORG and OPN genes were assigned to chromosomes 16p12.2, 1q21.2-q21.3 and 4q21.1-q21.21, respectively, in accordance with previously published data (35-37). The genetic distances between multiallelic markers for ORG were 7.3 cM and 14.0 cM. For OPN, distances between D4S2922, D4S1534 and D4S423 were 9.9 cM and 7.4 cM. For the uromodulin, distances of 6.5 cM and 9.8 cM were obtained between and D16S3103, D16S3041 and D16S420 (figure 1).

### Linkage analyses

Sib-pair linkage analyses showed no evidence for linkage between the THP, ORG and OPN genes and stone passage in the entire cohort of stone-forming sibs (at least one stone episode). Furthermore, sib-pairs concordant for at least one stone passage and urine calcium excretion below the 25<sup>th</sup> (T25) and 50<sup>th</sup> (T50) percentiles did not show evidence for linkage. The “exclude” option of MAPMAKERS/SIBS was used to determine the relative risks ( $\lambda_s$ ) at which we have excluded (lodscore < -2.0) the different genes in our population. For THP (figure 2), the  $\lambda_s$  ratio was 1.53 for 356 pairs of siblings concordant for at least 1 episode (irrespective of the presence of hypercalciuria and age of onset). When affected pairs concordant for below average urine calcium excretion (T25 or T50) were considered,  $\lambda_s$  ratios were 3.9 and 2.55 (24 and 74 pairs of affected siblings, respectively). For ORG (figure 3), the  $\lambda_s$  ratio was 2.2 for 333 sib-pairs concordant for at least 1 episode. The ratios were 5.5 and 3.65 for the T25 and T50 traits (24 and 72 pairs of affected siblings), respectively. For OPN (figure 4), the  $\lambda_s$  ratio was 1.52 for sib-pairs concordant for at least 1 episode (353 pairs of affected siblings), and 2.7 and 1.57 (24 and 77 sib-pairs, respectively) for traits T25 and T50. This suggests that genes coding for the Tamm-Horsfall protein, nephrocalcin and osteopontin are not linked to calcium stone passage in our pedigrees.



## DISCUSSION

We have used a candidate gene approach for 3 putative crystallization inhibitors to determine whether genetic variation is likely to contribute to urolithiasis. Using the entire group of affected sibs as well as subgroups with below average urine calcium excretion, we have demonstrated that these genes are unlikely to contribute to stone formation in our population. This suggests that if genetic variation at loci coding for crystallization inhibitors is implicated in stone formation, it is unlikely to be caused by these 3 genes. Such results do not completely rule out the possibility that genetic variations of these loci have major effects on kidney stone formation in certain cases or in other populations. However, hypothetical variations of these genes predisposing to kidney stone formation must be uncommon in our stone-forming population.

There are additional crystallization inhibitors such as prothrombin fragment 1 (38) and uronic acid-rich protein (bikunin) (39) that have not been investigated in the present study. Although we have restricted analyses to candidate genes for which phenotype data suggested potential implication (17-26), studies of other crystallization inhibitors would be justifiable. In addition to crystallization inhibition, other processes unrelated to hypercalciuria may be implicated in stone formation, such as renal epithelial cell-crystal interaction (40, 41), perturbation of crystal removal from the lumen by renal cells (42) or inorganic crystallization inhibitors (7). However, valid candidate genes remain to be defined for these processes.

One of the candidate genes that we have studied, the osteocalcin-related gene, is located on chromosome 1, near a susceptibility locus recently identified in 3 families with absorptive hypercalciuria (43). Our results do not suggest that this locus is linked to stone formation using the entire database. However, genetic analysis on hypercalciuric sibships will be required to confirm or infirm this hypothesis. Other susceptibility genes for hypercalciuric stone formation include *C1CN5*, as it was found that an attenuated form of Dent disease in one case resulted from a mutation in this gene (44). We have previously found modest evidence for a susceptibility gene near the vitamin D receptor locus, but did not find a quantitative trait locus in the region, which suggests that the linkage requires confirmation (29). Our previous

studies have excluded the calcium sensing receptor (45) and CYP1 $\alpha$  (28), the rate-limiting enzyme in the synthesis of 1,25 vitamin D3. Ultimately, genome-wide screens and candidate gene analyses will identify susceptibility loci involved in urolithiasis and idiopathic hypercalciuria.

**Table 1. Number of calcium stone-forming families and sibships**

No. of Affected Siblings per Sibship	At least 1 stone passage			Trait T25 <sup>a</sup>		Trait T50 <sup>b</sup>	
	No. of Sibships	No. of Sibships	No. of Sibships	No. of Sibships	No. of Sibships	No. of Sibships	No. of Sibships
2	27	12	17				
3	14	4	12				
4	6	-	4				
5	10	-	-				
6	5	-	-				
7	1	-	-				
11	1	-	-				
Total No. of Sibships (families)	64 (55)	16 (16)	33 (31)				

<sup>a</sup> Affected siblings for the trait T25 have at least 1 stone passage and calciuria below the 25<sup>th</sup> percentile in our database.

<sup>b</sup> Affected siblings for the trait T50 have at least 1 stone passage and calciuria below the 50<sup>th</sup> percentile in our database.

**Table 2. Clinical characteristics of siblings in pedigrees with calcium urolithiasis**

Status	At least 1 stone passage		Trait T25 <sup>a</sup>		Trait T50 <sup>b</sup>	
	Unaffected	Affected	Affected	P-values	Affected	P-values
Calciuria <sup>c</sup>	0.067 ± 0.034	0.088 ± 0.046	0.053 ± 0.020	0.001	0.064 ± 0.027	0.46
(mmol/Kg/d)	124	182	66		113	
Fasting Ca/Cr	0.77 ± 0.46	0.94 ± 0.80	0.63 ± 0.47	0.03	0.76 ± 0.81	0.88
(mmol/mmol)	167	228	74		136	
Post-load Ca/Cr	0.78 ± 0.46	0.94 ± 0.81	0.63 ± 0.46	0.03	0.77 ± 0.81	0.88
(mmol/mmol)	167	228	74		136	
Delta Ca/Cr	0.486 ± 0.362	0.590 ± 0.619	0.473 ± 0.458	0.82	0.515 ± 0.617	0.63
(mmol/mmol)	147	207	108		126	

All values mean ± SD

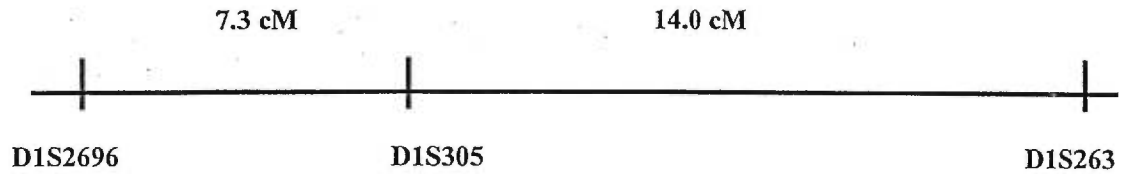
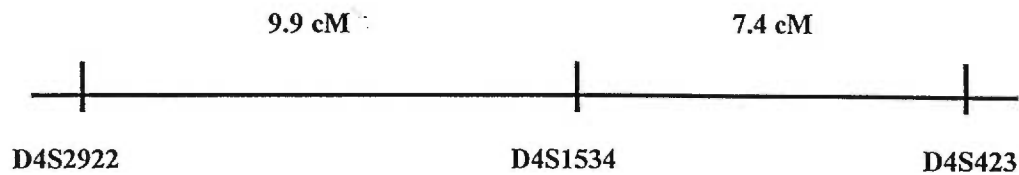
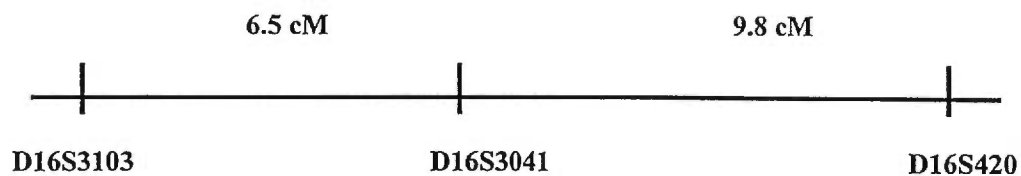
Delta Ca/Cr : difference between post- and pre-calcium load calcium/creatinine ratio.

<sup>a</sup> Affected siblings for the trait T25 have at least 1 stone passage and calciuria below the 25th percentile in our database.

<sup>b</sup> Affected siblings for the trait T50 have at least 1 stone passage and calciuria below the 50<sup>th</sup> percentile in our database.

<sup>c</sup> 24-hour urine collections with variation in measured creatinine content within 20% of predicted (Cockcroft-Gault estimation).

Figure 1. Markers and Genetic Distances

Chromosome 1: Osteocalcin-related gene (ORG)Chromosome 4: Osteopontin gene (OPN)Chromosome 16: Uromodulin (THP)

The closest marker to ORG was D1S305 with the flanking markers D1S2696 and D1S2635 spanning a 21.3 cM region with the order D1S2696-D1S305-D1S2635 supported by a lodscore of 13.9. The marker closest to OPN was D4S1534, flanked by D4S2922 and D4S423 in a region spanning a 17.3 cM region with the order D4S2922-D4S1534-D4S423 supported by a lodscore of 16.2. The D16S3041 marker was the closest to the THP gene with the flanking markers being D16S3103 and D16S420, spanning a 16.3 cM region with the order D16S3103-D16S3041-D16S420 being supported by a lodscore of 16.2.

Figure 2: Exclusion lodscore for Uromodulin (THP)

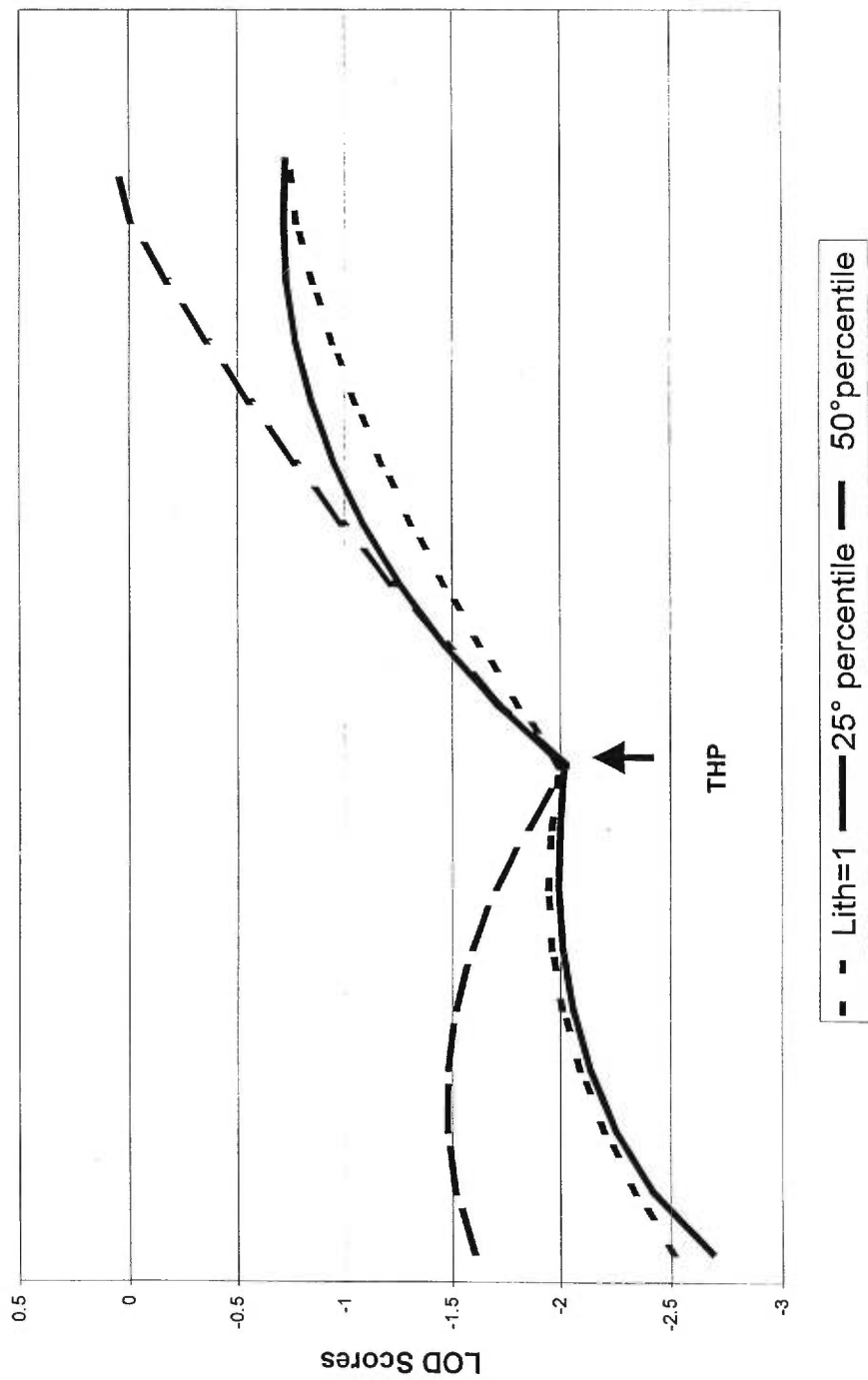
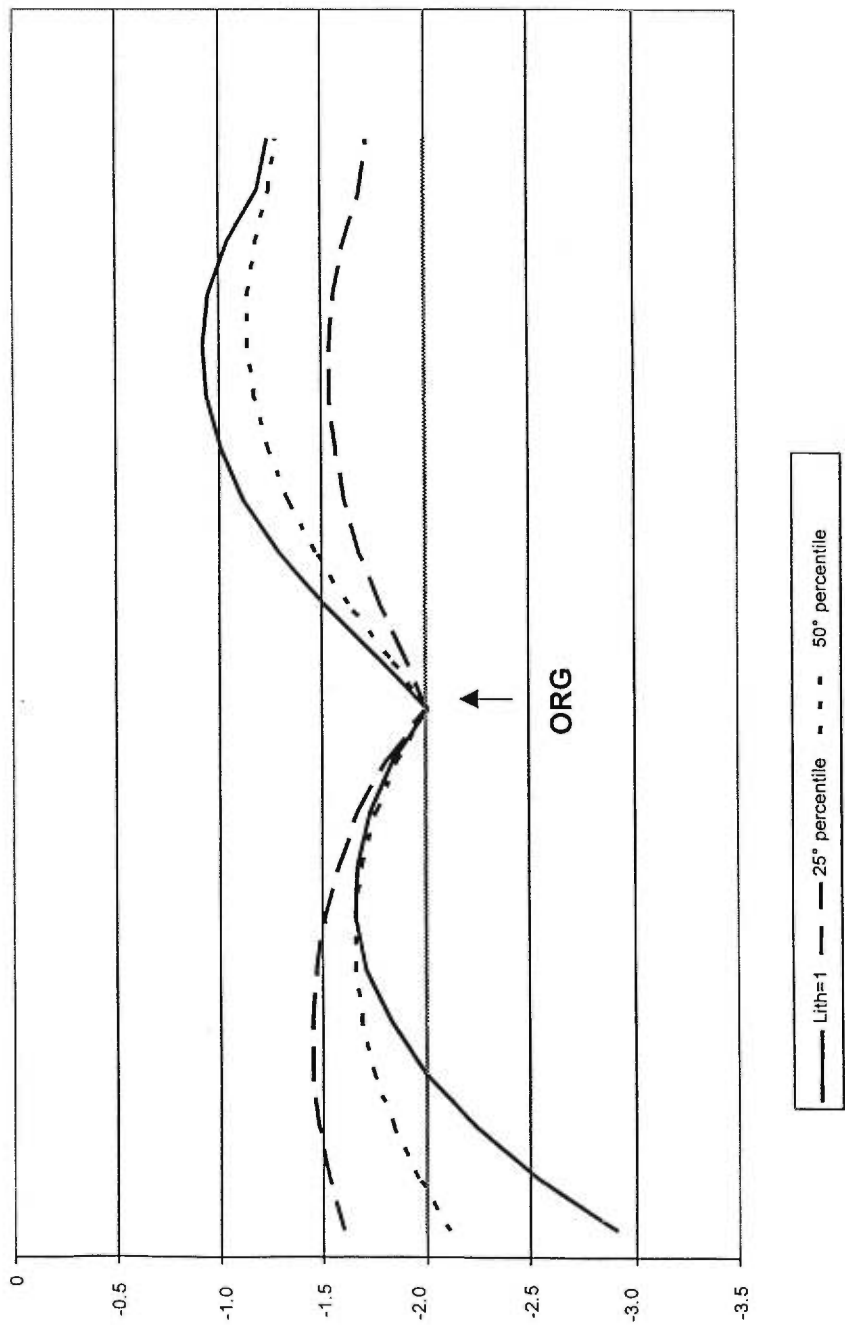
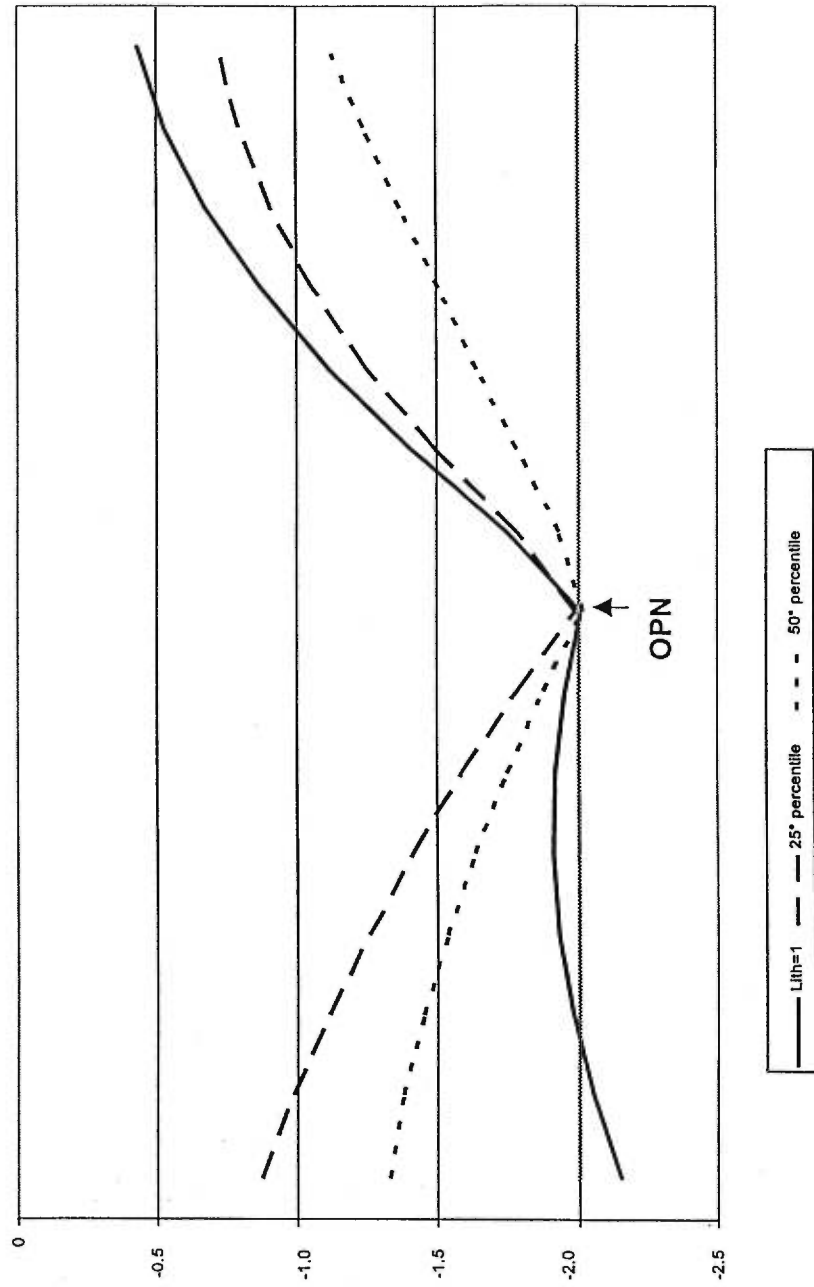


Figure 3: Exclusion lodscore for the Osteocalcin-Related Gene (ORG)



Lith=1 — 25th percentile - - 50th percentile

Figure 4: Exclusion lodscore for the Osteopontin Gene (OPN)





## REFERENCES

1. Worcester EM. Inhibitors of stone formation. *Semin Nephrol* 1996;16(5):474-86.
2. Hess B. Tamm-Horsfall glycoprotein and calcium nephrolithiasis. *Miner Electrolyte Metab* 1994;20(6):393-8.
3. Shiraga H, Min W, VanDusen WJ, Clayman MD, Miner D, Terrell CH, Sherbotie JR, Foreman JW, Przysiecki C, Neilson EG, et al. Inhibition of calcium oxalate crystal growth in vitro by uropontin: another member of the aspartic acid-rich protein superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89(1):426-30.
4. Asplin JR, Arsenault D, Parks JH, Coe FL, Hoyer JR. Contribution of human uropontin to inhibition of calcium oxalate crystallization. *Kidney Int* 1998;53(1):194-9.
5. Coe FL, Nakagawa Y, Asplin J, Parks JH. Role of nephrocalcin in inhibition of calcium oxalate crystallization and nephrolithiasis. *Miner Electrolyte Metab* 1994;20(6):378-84.
6. Wesson JA, Worcester EM, Wiessner JH, Mandel NS, Kleinman JG. Control of calcium oxalate crystal structure and cell adherence by urinary macromolecules. *Kidney Int* 1998;53(4):952-7.
7. Pak CY. Citrate and renal calculi: an update. *Miner Electrolyte Metab* 1994;20(6):371-7.
8. Lieske JC, Leonard R, Toback FG. Adhesion of calcium oxalate monohydrate crystals to renal epithelial cells is inhibited by specific anions. *Am J Physiol* 1995;268(4 Pt 2):F604-12.
9. Robertson W, Peacock M. Calcium oxalate crystalluria and inhibitors of crystallization in recurrent renal stone formers. *Clin Sci (Lond)* 1972;43:499-506.
10. Pak C, Holt K. Nucleation and growth of brushite and calcium oxalate in urine of stone formers. *Metabolism* 1976;25:665-673.
11. Kok DJ, Papapoulos SE, Bijvoet OL. Low inhibition of crystal agglomeration and citrate excretion in recurrent calcium oxalate stone formers. *Contrib Nephrol* 1987;58:73-7.
12. Tiselius HG, Bek-Jensen H, Fornander AM, Nilsson MA. Crystallization properties in urine from calcium oxalate stone formers. *J Urol* 1995;154(3):940-6.

13. Ryall R, Hibberd C, Mazzachi B, Marshall V. Inhibitory activity of whole urine: a comparison of urines from stone formers and healthy subjects. *Clin Chim Acta* 1986;154:59-67.
14. Porile J, Asplin J, Parks J, Nakagawa Y, Coe F. Normal calcium oxalate crystal growth inhibition in severe calcium oxalate nephrolithiasis. *J Am Soc Nephrol* 1996;7:602-607.
15. Nishio S, Hatanaka M, Takeda H, Iseda T, Iwata H, Yokoyama M. Analysis of urinary concentrations of calcium phosphate crystal-associated proteins: alpha2-HS-glycoprotein, prothrombin F1, and osteopontin. *J Am Soc Nephrol* 1999;10(Suppl 14):S394-6.
16. Yasui T, Fujita K, Sasaki S, Sato M, Sugimoto M, Hirota S, Kitamura Y, Nomura S, Kohri K. Expression of bone matrix proteins in urolithiasis model rats. *Urol Res* 1999;27(4):255-61.
17. Nakagawa Y, Abram V, Parks JH, Lau HS, Kawooya JK, Coe FL. Urine glycoprotein crystal growth inhibitors. Evidence for a molecular abnormality in calcium oxalate nephrolithiasis. *J Clin Invest* 1985;76(4):1455-62.
18. Nakagawa Y, Ahmed M, Hall SL, Deganello S, Coe FL. Isolation from human calcium oxalate renal stones of nephrocalcin, a glycoprotein inhibitor of calcium oxalate crystal growth. Evidence that nephrocalcin from patients with calcium oxalate nephrolithiasis is deficient in gamma-carboxyglutamic acid. *J Clin Invest* 1987;79(6):1782-7.
19. Hess B, Nakagawa Y, Coe FL. Inhibition of calcium oxalate monohydrate crystal aggregation by urine proteins. *Am J Physiol* 1989;257(1 Pt 2):F99-106.
20. Bautista D, Denstedt J, Chambers A, Harris J. Low-molecular-weight variants of osteopontin generated by serine proteinases in urine of patients with kidney stones. *J Cell Biochem* 1996;61:402-409.
21. Hess B, Nakagawa Y, Parks J, Coe F. Molecular abnormality in Tamm-Horsfall glycoprotein in calcium oxalate nephrolithiasis. *Am J Physiol* 1991;260:F569-F578.
22. Hess B, Zipperle L, Jaeger P. Citrate and calcium effects on Tamm-Horsfall glycoprotein as a modifier of calcium oxalate crystal aggregation. *Am J Physiol* 1993;265(6 Pt 2):F784-91.

23. Schnierle P, Hering F, Seiler H. Isoelectric focusing of Tamm-Horsfall glycoproteins: a simple tool for recognizing recurrent calcium oxalate renal stone formers. *Urol Res* 1996;24(2):79-82.
24. Jefferson A, Reynolds TM, Elves A, Wierzbicki AS. Patients with recurrent renal stones have a physico-chemically altered urinary Tamm-Horsfall glycoprotein profile. *Ann Clin Biochem* 1996;33(Pt 6):540-4.
25. Romero MC, Nocera S, Nesse AB. Decreased Tamm-Horsfall protein in lithiasic patients. *Clin Biochem* 1997;30(1):63-7.
26. Ganter K, Bongartz D, Hesse A. Tamm-Horsfall protein excretion and its relation to citrate in urine of stone-forming patients. *Urology* 1999;53(3):492-5.
27. Desbois C, Hogue DA, Karsenty G. The mouse osteocalcin gene cluster contains three genes with two separate spatial and temporal patterns of expression. *J Biol Chem* 1994;269(2):1183-90.
28. Scott P, Ouimet D, Proulx Y, Trouve ML, Guay G, Gagnon B, Valiquette L, Bonnardeaux A. The 1 alpha-hydroxylase locus is not linked to calcium stone formation or calciuric phenotypes in French-Canadian families. *J Am Soc Nephrol* 1998;9(3):425-32.
29. Scott P, Ouimet D, Valiquette L, Guay G, Proulx Y, Trouve ML, Gagnon B, Bonnardeaux A. Suggestive evidence for a susceptibility gene near the vitamin D receptor locus in idiopathic calcium stone formation. *J Am Soc Nephrol* 1999;10(5):1007-13.
30. Pak C, Kaplan R, Bone H, Townsend J, Waters O. A simple test for the diagnosis of absorptive, resorptive and renal hypercalciurias. *New Engl J Med* 1975;292:497-500.
31. Cockcroft DW, Gault MH. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron* 1976;16:31-41.
32. Green P. Construction and comparison of chromosome 21 radiation hybrid and linkage maps using CRI-MAP. *Cytogenet Cell Genet* 1992;59(2-3):122-4.
33. Matisse TC, Perlin M, Chakravarti A. Automated construction of genetic linkage maps using an expert system (MultiMap): a human genome linkage map. *Nat Genet* 1994;6(4):384-90.
34. Kruglyak L, Lander E. Complete multipoint sib-pair analysis of qualitative and quantitative traits. *Am J Hum Genet* 1995;57:439-454.

35. Pook MA, Jeremiah S, Scheinman SJ, Povey S, Thakker RV. Localization of the Tamm-Horsfall glycoprotein (uromodulin) gene to chromosome 16p12.3-16p13.11. *Ann Hum Genet* 1993;57(Pt 4):285-90.
36. Puchacz E, Lian JB, Stein GS, Wozney J, Huebner K, Croce C. Chromosomal localization of the human osteocalcin gene. *Endocrinology* 1989;124(5):2648-50.
37. Young MF, Kerr JM, Termine JD, Wewer UM, Wang MG, McBride OW, Fisher LW. cDNA cloning, mRNA distribution and heterogeneity, chromosomal location, and RFLP analysis of human osteopontin (OPN). *Genomics* 1990;7(4):491-502.
38. Stapleton AM, Dawson CJ, Grover PK, Hohmann A, Comacchio R, Boswarva V, Tang Y, Ryall RL. Further evidence linking urolithiasis and blood coagulation: urinary prothrombin fragment 1 is present in stone matrix. *Kidney Int* 1996;49(3):880-8.
39. Atmani F, Mizon J, Khan SR. Identification of uronic-acid-rich protein as urinary bikunin, the light chain of inter-alpha-inhibitor. *Eur J Biochem* 1996;236(3):984-90.
40. Lieske JC, Leonard R, Swift H, Toback FG. Adhesion of calcium oxalate monohydrate crystals to anionic sites on the surface of renal epithelial cells. *Am J Physiol* 1996;270(1 Pt 2):F192-9.
41. Lieske JC, Deganello S. Nucleation, adhesion, and internalization of calcium-containing urinary crystals by renal cells. *J Am Soc Nephrol* 1999;10(Suppl 14):S422-9.
42. Khan SR, Glenton PA. Deposition of calcium phosphate and calcium oxalate crystals in the kidneys. *J Urol* 1995;153(3 Pt 1):811-7.
43. Reed BY, Heller HJ, Gitomer WL, Pak CY. Mapping a gene defect in absorptive hypercalciuria to chromosome 1q23.3-q24. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84(11):3907-13.
44. Scheinman SJ, Cox JP, Lloyd SE, Pearce SH, Salenger PV, Hoopes RR, Bushinsky DA, Wrong O, Asplin JR, Langman CB, Norden AG, Thakker RV. Isolated hypercalciuria with mutation in *CLCN5*: relevance to idiopathic hypercalciuria. *Kidney Int* 2000;57(1):232-9.

45. Petrucci M, Scott P, Trouve M-L, Guay G, Valiquette L, Ouimet D, Bonnardeaux A. Evaluation of the Calcium Sensing Receptor Gene in Idiopathic Hypercalciuria and Calcium Nephrolithiasis. *Kidney Int* 2000;in press.