

2m11.2863.7

Université de Montréal

Étude du gène du récepteur au calcium dans l'hypercalciurie idiopathique et la  
néphrolithiase calcique

Par  
Martin Petrucci  
Département de Médecine  
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Maître ès sciences (M.Sc.)  
en sciences biomédicales

Décembre, 2000

© Martin Petrucci, 2000



W  
4  
U58  
2001  
v.072



Identification du jury

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Étude du gène du récepteur au calcium dans l'hypercalciurie idiopathique et la  
néphrolithiase calcique

présenté par:

Martin Petrucci

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dre Marielle Gascon-Barré	Présidente
Dr Alain Bonnardeaux	Directeur de recherche
Dr Lambert Busque	Membre du jury

Mémoire accepté le: .....

## Sommaire:

La formation de lithiases oxalo-calciques est une affection courante qui entraîne souvent des complications au niveau rénal. Ce trait est déterminé en partie par des facteurs génétiques et est fréquemment associé avec une excrétion urinaire élevée de calcium (hypercalciurie). Le récepteur au calcium (CaR), protéine de la famille des récepteurs couplés aux protéines G, joue un rôle majeur dans le métabolisme du calcium. Il régule la sécrétion de PTH et contrôle la réabsorption tubulaire rénale de calcium. Il est donc possible qu'un polymorphisme du CaR puisse mener à la formation d'une néphrolithiase calcique et/ou à l'hypercalciurie idiopathique.

Nous avons vérifié cette hypothèse à l'aide d'une approche de gène candidat dans un groupe de familles canadiennes-française comprenant plusieurs individus atteints de lithiase avec ou sans hypercalciurie (64 fratries provenant de 55 familles donnant 359 paires de germains atteints avec au moins 1 épisode lithiasique). À l'aide d'une analyse de liaison non-paramétrique avec des marqueurs intragéniques et des marqueurs flanquants, nous avons démontré que des variations génétiques au locus du CaR ne sont pas associées au développement de lithiases hypercalciuriques. Nous avons exclu le locus du gène du CaR (lodscore inférieur à  $-2$ ) à une valeur de  $\lambda_s$  de 1.5, 1.68 et 2.6 pour des paires de germains concordantes pour au moins un épisode lithiasique, au moins deux épisodes lithiasiques et au moins un épisode lithiasique et une calciurie au dessus du 75<sup>ème</sup> centile, respectivement. De plus, les analyses de liaison des traits quantitatifs ne suggèrent pas de liaison entre le locus du CaR et les marqueurs biochimiques de l'hypercalciurie idiopathique ou du métabolisme du calcium.

En conclusion, cette étude démontre que des variations génétiques au locus du gène du CaR ne sont pas associées avec l'hypercalciurie idiopathique et la formation de néphrolithiases calcique dans une population canadienne-française.

## Table des matières:

<b>Sommaire:</b> .....	<b>iii</b>
<b>Liste des tableaux:</b> .....	<b>vi</b>
<b>Liste des figures:</b> .....	<b>vii</b>
<b>Listes des sigles et abréviations:</b> .....	<b>viii</b>
<b>Introduction:</b> .....	<b>I</b>
1. Les lithiases rénales.....	1
1.1 Généralités sur les lithiases rénales.....	1
1.2 Étiologie de la lithiase calcique.....	4
1.2.1 Facteurs diététiques, métaboliques et climatiques.....	4
1.2.2 Facteurs génétiques.....	5
1.2.3 Transmission du trait lithiasique.....	7
2. Régulation de l'homéostasie du calcium.....	8
2.1 Mécanisme d'action de la PTH.....	9
2.2 Mécanisme d'action de la calcitonine.....	10
2.3 Mécanisme d'action de la vitamine D.....	11
3. L'hypercalciurie.....	12
3.1 Généralités sur l'hypercalciurie.....	12
3.2 Génétique de l'hypercalciurie.....	13
3.3 Classification de l'hypercalciurie.....	14
3.3.1 L'hypercalciurie absorbptive.....	14
3.3.2 L'hypercalciurie rénale.....	14
3.3.3 L'hypercalciurie résorptive.....	14
3.3.4 Les hypercalciuries non-classées.....	15
3.3.5 Test diagnostique des hypercalciuries.....	15
4. Le récepteur au calcium.....	17
4.1 Clonage moléculaire du récepteur au calcium.....	17
4.1.1 Récepteur au calcium de la parathyroïde bovine.....	17
4.1.2 Clonage chez les autres espèces.....	19
4.2 Couplage récepteur-effecteur.....	20
4.3 Distribution tissulaire.....	20
4.4 Régulation du récepteur au calcium.....	22
4.5 Le gène du récepteur au calcium.....	23
4.6 Maladies associées au récepteur au calcium.....	24
5. Méthodes d'analyse en épidémiologie génétique.....	25
5.1 Types d'approche.....	25
5.1.1 Étude des gènes candidats.....	25
5.1.2 Criblage du génome.....	25
5.2 Analyse de liaison génétique.....	25
5.2.1 Étude paramétrique.....	26
5.2.2 Étude non-paramétrique.....	27

<b>Corps du mémoire:</b> .....	<b>29</b>
6. Étude du gène du récepteur au calcium dans l'hypercalciurie idiopathique et la néphrolithiase calcique.....	29
6.1 Article: Evaluation of the Calcium Sensing Receptor Gene in Idiopathic Hypercalciuria and Calcium Nephrolithiasis.....	30
<b>Discussion:</b> .....	<b>46</b>
7. Synthèse des résultats.....	46
8. Étude du gène du CaR : Forces et faiblesses.....	48
8.1 Puissance de l'étude.....	48
8.2 Approche par gènes candidats.....	48
8.3 Étude d'une population isolée.....	49
9. Perspectives.....	50
<b>Bibliographie:</b> .....	<b>51</b>
<b>Appendices:</b> .....	<b>63</b>
Appendice I: Exclusion Mapping of Crystallization Inhibitor Genes in Calcium Urolithiasis	63
<b>Remerciements:</b> .....	<b>80</b>

**Liste des tableaux:**

Tableau 1: Fréquence des lithiases selon le type .....	3
Tableau 2: Inhibiteurs de la cristallisation .....	4
Tableau 3: Critères diagnostiques des hypercalciuries .....	16

**Liste des figures:**

Figure 1: Contrôle hormonal de l'homéostasie du calcium.....	9
Figure 2: Prédiction de la structure du BoPCaR.....	18

## Listes des sigles et abréviations:

$\lambda_s$  : Risque relatif chez un frère/soeur

1,25(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> : 1,25-dihydroxy-vitamine D<sub>3</sub>, Calcitriol

ACTH : Corticotropine

ADN : Acide déoxyribonucléique

ADNc : Acide déoxyribonucléique complémentaire

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messagé

BoPCaR : Récepteur au calcium de la parathyroïde bovine

Ca ou Ca<sup>2+</sup> : Ion calcique

Ca-ATPase : Pompe calcique hydrolysant l'adénosine triphosphate

Ca(Mg)-ATPase : Pompe à ions calcique et magnésium hydrolysant l'adénosine triphosphate

CaR : Récepteur au calcium

CYP1 $\alpha$  : 1 $\alpha$ -hydroxylase

CYP24 : 24-hydroxylase

HA : Hypercalciurie absorptive

HAD : Hypocalcémie autosomale dominante

HA-I : HA type I

HA-II : HA type II

HFB : Hypercalcémie familiale bénigne

HHF : Hypocalciurie hypercalcémique familiale

HLA : Complexe majeur d'histocompatibilité

HNC : Hypercalciurie non-classée

HNC-I : Fuite rénale de phosphate avec hypophosphatémie et hypercalciurie

HNC-II : Hypercalciurie à jeun associée à des taux sériques normaux de PTH, de calcium et de phosphate

HPTNS : Hyperthyroïdisme néonatale sévère

HR : Hypercalciurie rénale

HRé : Hypercalciurie résorptive

HuPCaR : Récepteur au calcium de la parathyroïde humaine

IBD : Identique par descendance

$K^+$  : Ion potassique

LEC : Liquide extracellulaire

$Mg^{2+}$  : Ion de magnésium

mGluRs : Récepteur métabotropique du glutamate

Na ou  $Na^+$  : Ion de sodium

PKC : Protéine kinase C

PLC : Phospholipase C

$PO_4$  : Ion phosphate

PTH : Hormone parathyroïdienne, parathormone

PTHr : Récepteur de la parathormone

RaKCaR : Récepteur au calcium de rein de rat

RT-PCR : Réverse transcriptase suivit d'une réaction de polymérase en chaine

RVD : Récepteur de la vitamine D

UCa : Calciurie

## **Introduction:**

### ***1. Les lithiases rénales***

#### **1.1 Généralités sur les lithiases rénales**

L'homme est depuis longtemps affecté par un désordre du système urinaire que l'on appelle la lithiase rénale. Le résultat de recherches archéologiques, sur une momie égyptienne âgée de plus de 7000 ans, a démontré la présence de néphrolithiases. Aujourd'hui ce désordre du système urinaire touche entre 5 et 10 % de la population nord-américaine et représente environ 1 % de toutes les hospitalisations<sup>1</sup>. On a estimé aux États-Unis, que les coûts rattachés au traitement de la lithiase rénale se sont élevés à environ 2 milliards de dollars pour l'année 1995<sup>2</sup>. Le passage d'une lithiase survient généralement entre l'âge de 20 et 50 ans, tant chez les hommes que chez les femmes<sup>3,4</sup>. Par contre, l'incidence avant l'âge de 70 ans chez les hommes est plus élevée que chez les femmes, soit une incidence de 12 et 5 % respectivement. Pour ce qui est du taux de récurrence, il est de 50 % pour une période de 10 ans suivant le premier épisode<sup>5</sup>.

Une lithiase rénale, aussi appelée calcul urinaire, est souvent asymptomatique. Sa présence sera découverte fortuitement lors de l'examen d'une infection urinaire ou lors d'un examen radiologique effectué pour d'autres raisons. La colique néphrétique correspond à l'engagement et à la descente de la lithiase dans les voies urinaires (uretère, vessie, urètre). Lors de sa migration dans les voies urinaires, le calcul urinaire peut s'arrêter à trois sites principaux où le diamètre rétrécit: à la jonction urétéro-pelvienne, au croisement de l'uretère et des vaisseaux iliaques et à la jonction urétéro-vésicale<sup>6</sup>. Il est aussi possible que le calcul s'arrête au croisement de l'uretère avec les vaisseaux pelviens et le ligament large ou à l'orifice de la vessie. Cependant, le site d'arrêt du calcul, le plus fréquent est la jonction urétéro-vésicale. La présence d'une lithiase dans les voies urinaires peut entraîner l'obstruction partielle ou complète, intermittente ou constante du flot de

l'urine. La douleur intense produite par le blocage est d'abord de type "colique", mais elle devient constante avec le temps. En ce qui concerne la localisation de la douleur, elle varie en fonction du site de blocage. Lorsque la lithiase est bloquée haute, la douleur sera davantage ressentie à l'hypochondre et au flanc. Par contre, lorsque le blocage est au niveau de la jonction urétéro-vésicale, la douleur est ressentie au bas de l'abdomen et irradie vers la région inguinale et les organes génitaux. Lorsque le calcul est arrêté dans la portion de l'uretère qui traverse la paroi de la vessie, les symptômes peuvent alors mimer ceux d'une cystite (ténésme, pollakiurie ou urgence mictionnelle). Finalement, cette douleur est fréquemment accompagnée d'hématurie microscopique ou macroscopique<sup>1</sup> et occasionnellement de nausées et de vomissements.

La formation d'une lithiase rénale se produit lorsque l'urine devient sursaturée en ions lithogènes, ce qui entraîne la formation de cristaux. Si les cristaux demeurent suffisamment petits, ils n'ont pas de conséquence clinique et sont excrétés tout à fait normalement dans l'urine. Cependant, si la taille des cristaux augmente et que ceux-ci forment des agrégats, il y a formation d'une lithiase. La formation d'une lithiase a comme conséquence clinique, l'obstruction des voies urinaires, l'hématurie et une prédisposition aux infections urinaires. Les calculs rénaux peuvent se former et croître à partir d'un noyau homogène ou hétérogène<sup>7</sup>. Durant la formation d'un noyau homogène, l'augmentation des ions libres mène à une sursaturation. Cette sursaturation permet la formation spontanée d'un amas qui grossit et forme une phase solide permanente. Pour le noyau hétérogène, la croissance des cristaux se produit sur une surface cristalline différente, mais complémentaire, ou sur une substance étrangère. *In vivo*, la formation de noyaux hétérogènes prédomine sur la formation de noyaux homogènes, car la présence d'une phase solide permet la croissance des cristaux à un niveau moins élevé que la sursaturation. Les calculs rénaux peuvent contenir différentes combinaisons de sels. Cependant, la majorité sont formés de calcium ou d'une combinaison de calcium et d'oxalate. Le tableau 1 montre la fréquence des néphrolithiases selon leur composition<sup>8,9</sup>.

**Tableau 1: Fréquence des lithiases selon le type**

Composition	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 lithiases commence par la germination de cristaux (cristallogénèse) et est suivie de l'agrégation et de la croissance des cristaux<sup>7</sup>. Les cristaux semblent adhérer aux cellules tubulaires ce qui permet une croissance supplémentaire<sup>10</sup>. Le phénomène de la cristallogénèse résulte d'un déséquilibre, au niveau du rein, entre les agents promoteurs et les agents inhibiteurs de la cristallogénèse. Parmi les agents promoteurs, on retrouve tous les sels lithogènes tel que: le calcium, le phosphate, l'oxalate, l'acide urique... Le groupe des inhibiteurs se divise en deux sous groupes soit les inhibiteurs organiques et les inhibiteurs inorganiques (tableau 2)<sup>11-13</sup>. Parmi les inhibiteurs, ceux qui furent les plus étudiés sont les inhibiteurs organiques<sup>12,14-17</sup>. D'ailleurs tous les inhibiteurs organiques démontrent, *in vitro*, la capacité d'inhiber une ou toutes les étapes de la cristallisation<sup>12</sup>.

**Tableau 2: Inhibiteurs de la cristallisation**

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

## 1.2 Étiologie de la lithiase calcique

### 1.2.1 Facteurs diététiques, métaboliques et climatiques

Jusqu'à ce jour, plusieurs études se sont penchées sur l'impact de l'environnement sur l'étiologie de la lithiase. Il a été démontré que les conditions socio-économiques et l'emplacement géographique des individus atteints sont en relation avec la composition de la lithiase et le site d'obstruction<sup>18</sup>. De plus, on remarque une progression de l'incidence et une fréquence plus élevée des lithiases composées d'oxalate et de phosphate de calcium dans les pays industrialisés tel que le Canada et les États-Unis<sup>19</sup>. Par contre, dans les pays en voie de développement et en Asie, on observe une plus grande incidence des calculs vésicaux composés d'oxalate de calcium et d'urate d'ammonium. Cette distinction s'explique en général par une différence au niveau de la diète des individus atteints<sup>20</sup>. Finalement, une étude sur l'incidence saisonnière d'épisode lithiasique a démontré que le taux de coliques néphrétiques par mois est supérieur durant l'été de 50 % comparativement à l'hiver<sup>21</sup>.

L'influence de la diète a d'ailleurs été étudiée chez des gens âgés entre 40 à 75 ans qui n'avaient pas d'histoire de lithiase urinaire<sup>22</sup>. Cette étude démontre une association entre la consommation de certains nutriments et le développement de lithiases. Dans cette étude, on y apprend qu'une diète riche en protéines animales est

directement associée au risque de former des néphrolithiases. Cette association s'explique probablement par une augmentation de la charge acide dans l'urine<sup>23</sup>. Cette surcharge acide entraîne une augmentation de l'excrétion du calcium et du phosphore et une diminution de l'excrétion du citrate. L'hypercalciurie qui en résulte s'explique par une diminution de la réabsorption tubulaire du calcium causée par l'acidose<sup>24</sup>. En ce qui concerne l'apport liquidien et de potassium, il semble qu'il soit inversement associé à la susceptibilité de développer une lithiase rénale<sup>22</sup>. Finalement, cette étude démontre que les gens ayant une diète riche en calcium (> 1326 mg) développent moins de calculs rénaux que les gens qui ont un faible apport en calcium (516 mg). Le mécanisme suggéré par les auteurs pour expliquer ce phénomène est une augmentation de la chélation de l'oxalate par le calcium dans l'intestin, ce qui diminue son absorption intestinale et son excrétion urinaire.

### 1.2.2 Facteurs génétiques

En plus des facteurs environnementaux, certains chercheurs ont tenté de démontrer le rôle des facteurs génétiques dans le développement de lithiases. Ainsi, on croit que les facteurs héréditaires jouent un rôle important dans la prédisposition à la lithiase rénale<sup>25-28</sup>. Pour ce qui est de Curhan *et al.*, ils ont évalué si l'augmentation du risque peut être attribuée aux facteurs génétiques, à l'exposition aux facteurs environnementaux, ou à une combinaison des deux<sup>29</sup>. Même en effectuant une correction pour les facteurs environnementaux, le risque relatif de formation d'une lithiase chez les hommes avec une histoire familiale positive comparativement à ceux sans histoire familiale est de 2,57 avec un intervalle de confiance de 95 % (2,19 à 3,02). Toutes ces études proposent qu'une histoire familiale positive augmente de façon significative le risque de la formation de néphrolithiases.

Une autre approche qui fut utilisée pour déterminer l'importance de l'hérédité dans le développement de lithiases rénales est le calcul du ratio de la proportion des germains du proposant manifestant le trait et de la prévalence du trait dans la population générale<sup>30</sup>. L'intérêt de ces études se situe dans le calcul du risque

associé aux germains du proposant ( $\lambda_s$ ). En général, plus le  $\lambda_s$  est élevé, plus la contribution des facteurs génétiques est importante. Cependant, plus la prévalence d'un trait est élevée, plus le  $\lambda_s$  diminue. Il est à noter, que généralement, les traits complexes, comme la lithiase rénale, ont une prévalence élevée. Les études ont démontré que le  $\lambda_s$  du trait lithiasique varie de 2,5 à 4<sup>25-27,31</sup>, ce qui représente une valeur plus importante que celle de l'hypertension essentielle et du diabète de type II ( $\lambda_s = 2$ ) mais, moins grande que le diabète de type I ( $\lambda_s = 15$ ).

Troisièmement, un autre type d'étude qui permet la différenciation des facteurs génétiques des facteurs environnementaux est l'étude des conjoints/conjointes. Dans ce type d'étude, lorsque les facteurs environnementaux sont la principale cause du développement d'un trait, la prévalence de celui-ci est semblable dans les deux groupes d'individus. C'est ce type d'approche qui fut utilisé pour démontrer que la fréquence d'épisode lithiasique dans les familles des individus atteints est plus élevée que la fréquence dans les familles des conjoints(es)<sup>28,32</sup>. Ces études démontrent bien qu'il existe une prédisposition au développement de néphrolithiases qui ne s'explique pas seulement par l'exposition aux facteurs environnementaux.

Finalement, l'identification de mutations dans des formes rares de lithiase calcique constitue une autre évidence en faveur de facteurs génétiques responsables de la formation de lithiases calciques. Parmi ces traits monogéniques, on observe l'acidose tubulaire rénale distale<sup>33</sup>, la maladie de Dent<sup>34</sup> et l'hyperoxalurie primaire<sup>35</sup>. En ce qui concerne l'acidose tubulaire rénale distale, il s'agit d'un désordre dans lequel l'épithélium du tubule distale du rein est incapable de maintenir le gradient d'hydrogène normal entre la lumière du tubule et les cellules. Il en résulte une augmentation de l'excrétion urinaire du calcium et du phosphate, un pH urinaire élevé, une diminution de l'excrétion du citrate et en la formation de lithiases phospho-calciques. La maladie de Dent résulte d'une mutation d'un canal à ions chlore et est associée à une hypercalciurie, une protéinurie de faible poids moléculaire, à une néphrocalcinose et/ou à la formation de lithiases. Finalement, l'hyperoxalurie primaire découle d'un désordre du métabolisme du glyoxylate qui

entraîne une surproduction d'oxalate et par conséquent une hyperoxalurie qui entraîne la formation de lithiases oxalo-calciques.

### 1.2.3 *Transmission du trait lithiasique*

Une étude a comparé la proportion des individus lithiasiques chez les jeunes membres de la famille du proposant dans laquelle aucun, un ou deux individus plus âgés étaient atteints<sup>26</sup>. Les résultats de Resnick *et al.* démontrent une fréquence plus élevée d'individus lithiasiques lorsqu'au moins un membre plus âgé est atteint. Ces résultats suggèrent donc, un mode de transmission polygénique plutôt que monogénique. Cependant, pour bien démontrer cet aspect, il faudrait des études de ségrégation. Jusqu'à ce jour, les gènes qui prédisposent à la formation de lithiase calcique ne sont pas connus tout comme le risque relatif associé à chacun des allèles de susceptibilité. Certains candidats tel que les gènes de la  $1\alpha$ -hydroxylase<sup>36</sup>, la néphrocalcine, l'uromoduline et l'uropontine (Appendice I) furent exclus par des études de liaison génétique. Récemment, une région située près du gène du récepteur de la vitamine D<sub>3</sub> semble démontrer une certaine susceptibilité au développement de lithiases oxalo-calciques dans des familles canadiennes-françaises<sup>37</sup>.

## 2. *Régulation de l'homéostasie du calcium*

Puisqu'une quantité importante de calcium est entreposée dans les os, le calcium est l'ion le plus abondant de l'organisme. Au niveau des liquides corporels, il est principalement un électrolyte extracellulaire. Environ 98 % du calcium chez l'adulte se trouve dans le squelette et les dents, combiné au phosphate afin de former un réseau cristallin de sels minéraux. Le reste du calcium se trouve dans le liquide extracellulaire, de même qu'à l'intérieur des cellules de divers tissus, surtout ceux des muscles squelettiques. Outre sa contribution à la dureté des os et des dents, le calcium est également nécessaire à la coagulation, à la libération des neurotransmetteurs, au maintien du tonus musculaire et à l'excitabilité des tissus nerveux et musculaires. Il est donc impératif que les concentrations ioniques du calcium soit maintenues à un niveau optimal. Les principaux facteurs qui contrôlent les flux de calcium sont les hormones calciotropiques<sup>38</sup> (figure1). Parmi ces agents on retrouve la parathormone (hormone parathyroïdienne, PTH), la vitamine D<sub>3</sub> et la calcitonine.

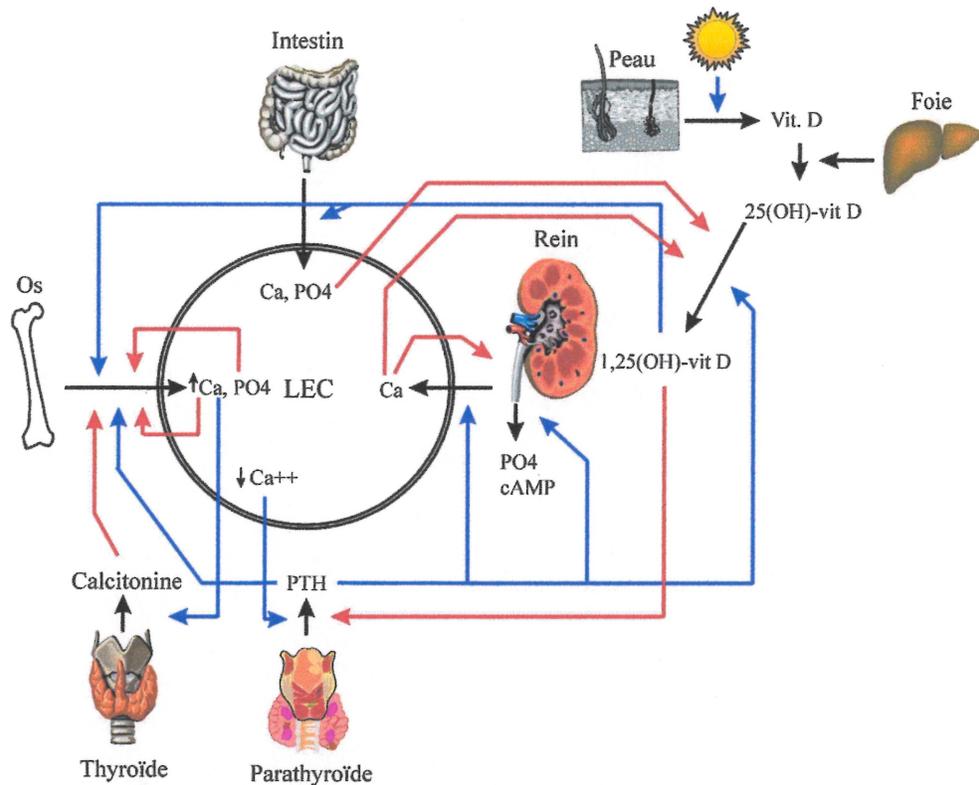


Figure 1: Contrôle hormonal de l'homéostasie du calcium.

Dans cette figure, les flèches bleues indiquent un effet activateur et les flèches rouges un effet inhibiteur. LEC: liquide extracellulaire, Ca: calcium, PO4: phosphate

## 2.1 Mécanisme d'action de la PTH

On sait depuis longtemps, que l'un des organes les plus importants dans la régulation du niveau de calcium sérique sont les glandes parathyroïdes. Ce sont ces glandes qui, en réponse à une diminution de la calcémie, sécrètent la PTH, une hormone peptidique de 84 acides aminés<sup>38</sup>. Plus précisément, ce sont les cellules principales, que l'on retrouve dans ces glandes, qui sont responsables de la production de la PTH. Les cellules principales sont très sensibles aux variations de calcium dans le sang. Cette sensibilité est la conséquence de la présence, au niveau de la membrane cellulaire, d'un récepteur sensible au calcium (CaR)<sup>39,40</sup>. Le mécanisme utilisé par le CaR pour stimuler la sécrétion de la PTH n'est pas encore

complètement élucidé. Cependant, il a été démontré que le CaR stimule la phospholipase C, ce qui entraîne une accumulation intracellulaire d'inositol 1,4,5-triphosphate<sup>41</sup>.

La PTH qui se retrouve dans le flot sanguin agit seulement sur les cellules osseuses et sur les cellules du néphron, car ce sont les deux seuls endroits où l'on retrouve une expression du récepteur de la PTH (PTHr)<sup>42</sup>. Au niveau des os, la PTH a pour effet de stimuler les ostéoclastes afin qu'ils libèrent du calcium et du phosphate de la matrice osseuse. Pour ce qui est des effets produits au niveau du rein, la PTH 1) augmente la réabsorption du calcium et du magnésium; 2) inhibe la réabsorption du phosphate et 3) favorise la formation de la forme active de la vitamine D<sub>3</sub> (calcitriol, 1,25-dihydroxy-vitamine D<sub>3</sub>). En ce qui concerne la formation du calcitriol, la PTH agit en stimulant le promoteur de la 1 $\alpha$ -hydroxylase<sup>43</sup>, l'enzyme responsable de l'activation de la vitamine D<sub>3</sub>. La calcitriol a donc pour effet d'augmenter l'absorption intestinal du calcium, du phosphate et du magnésium. Ainsi, la PTH agit sur l'homéostasie du calcium en augmentant la résorption osseuse et en augmentant l'absorption intestinale et rénale du calcium.

## **2.2 Mécanisme d'action de la calcitonine**

La calcitonine est une hormone sécrétée par les cellules parafolliculaires (cellules C) de la glande thyroïde. Cette hormone réduit la quantité de calcium et de phosphate dans le sang en inhibant la résorption osseuse et en augmentant la réabsorption du calcium et du phosphate par les os. Cependant, même si la calcitonine agit rapidement, chez le rat, en condition expérimentale, son importance dans la physiologie n'est pas très évidente<sup>44</sup>. Sur le plan clinique, la calcitonine ne cause aucun symptôme qu'elle soit absente ou présente en excès. Elle joue probablement un rôle plus important dans les situations où l'on observe une résorption osseuse exagérée comme dans l'hypercalcémie ou la maladie de Paget. Ainsi, les individus qui subissent une ablation de la glande thyroïde maintiennent l'homéostasie du calcium, tant que leurs glandes parathyroïdes sont fonctionnelles. La sécrétion de la calcitonine est directement régulée par le taux de calcium sanguin

via un système de rétroaction négative<sup>44</sup>. L'augmentation de la calcémie entraîne l'activation du CaR, qui par un système de second messenger active la production de la calcitonine.

### 2.3 Mécanisme d'action de la vitamine D

Les rôles associés à la vitamine D sont de réguler l'homéostasie du phosphate et du calcium et de stimuler la minéralisation des os<sup>45</sup>. Cependant, lorsque la vitamine D est initialement produite, elle se retrouve sous une forme inactive et nécessite l'ajout de deux groupements hydroxyles. La première modification se produit dans le foie. À cet endroit la vitamine D<sub>3</sub> subit une hydroxylation en position 25 par l'enzyme 25-hydroxylase<sup>46</sup>. La seconde hydroxylation, étape limitant la formation de calcitriol, transforme la 25-hydroxy-vitamine D<sub>3</sub> en 1,25-dihydroxy-vitamine D<sub>3</sub> (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) et est effectuée par une enzyme rénale qui appartient à la famille des cytochromes P450, la 1 $\alpha$ -hydroxylase (CYP1 $\alpha$ )<sup>47</sup>. Divers facteurs comme la PTH<sup>43</sup>, le calcium, le phosphate et la vitamine D<sup>47</sup> régulent la production du calcitriol. Un fois sous sa forme active, la vitamine D peut agir sur les os, le rein et l'intestin afin de maintenir un niveau adéquat de calcium et de phosphate sérique. Son rôle physiologique le plus important est la stimulation de l'absorption intestinale du calcium. Son mécanisme d'action nécessite la liaison du calcitriol avec le récepteur de la vitamine D (RVD). Le RVD est une phosphoprotéine de la famille des facteurs de transcription à doigt de zinc qui lie l'hormone avec une grande affinité<sup>48</sup>. Une liaison avec l'hormone entraîne une phosphorylation du récepteur<sup>49</sup> et permet à celui-ci d'aller se lier l'ADN<sup>50</sup> avec son domaine en doigt de zinc, et ainsi réguler l'expression de certains gènes dans les tissus cibles. Les gènes régulés par le RVD sont pour la majorité impliqués dans l'homéostasie du calcium. Parmi ceux-ci on y retrouve l'ostéocalcine<sup>51</sup>, l'ostéopontine<sup>52</sup>, la PTH<sup>53</sup>, les hydroxylases CYP24<sup>54</sup> et CYP1 $\alpha$ <sup>47</sup> et les calbindines<sup>55</sup>. Les calbindines sont des protéines cytosoliques, ayant une forte affinité pour le calcium, dont le rôle est de faciliter le transport du calcium dans le cytoplasme.

### 3. L'hypercalciurie

#### 3.1 Généralités sur l'hypercalciurie

L'hypercalciurie se définit comme une augmentation de l'excrétion urinaire du calcium; elle constitue le facteur de risque le plus fréquemment associé au développement de lithiases rénales et se retrouve chez environ 40 % des cas<sup>1,56,57</sup>. On dit d'un individu, qu'il est hypercalciurique si son taux de calcium urinaire est supérieur à 7,5 mmol/24h (300 mg/jour), s'il est un homme, et supérieur à 6,3 mmol/24h (250 mg/jour), s'il s'agit d'une femme. On peut aussi utiliser l'excrétion de calcium corrigé par le poids; dans ce cas on dit d'un individu qu'il est hypercalciurique lorsque son excrétion de calcium urinaire excède 0,1 mmol/kg (4 mg/kg) et ce peu importe son sexe et son âge. Cette définition se base sur une valeur moyenne d'excrétion urinaire de calcium obtenue chez des individus dits normaux ( $3,9 \pm 1,6$  mmol/24h)<sup>56</sup>. Cette valeur permet d'affirmer qu'une excrétion urinaire de calcium entre 0,7 et 7,1 mmol/24h est considérée comme normale.

L'hypercalciurie idiopathique est une affection qui touche environ 5 % de la population<sup>58</sup>. Elle est plus fréquente chez les hommes, apparaît aux environs de 30 ans et semble démontrer une tendance familiale<sup>59</sup>. Généralement, les patients hypercalciuriques ne présentent pas de désordre défini pouvant expliquer l'élévation de l'excrétion urinaire du calcium observé. Les mécanismes moléculaires responsables de l'hypercalciurie sont encore inconnus. Cependant, on suppose que celle-ci résulte de désordres dans la régulation des échanges des ions calciques au niveau de certains sites où l'on retrouve des flux importants de calcium<sup>60,61</sup>. Ces désordres se produisent fort probablement dans les intestins, les reins ou dans les os et se traduisent par une augmentation de l'excrétion urinaire de calcium. Ainsi, l'identification des facteurs génétiques responsables de l'excrétion du calcium dans l'urine permettra la caractérisation des mécanismes moléculaires conduisant à l'hypercalciurie et au développement de lithiases calciques.

### 3.2 Génétique de l'hypercalciurie

Certaines études ont présenté des familles dans lesquelles l'hypercalciurie semble être transmise comme un trait autosomal<sup>59,62-64</sup>, cependant, il existe des évidences qui portent à croire que l'hypercalciurie n'est pas une entité physiopathologique simple transmise comme un trait monogénique. Ces évidences proviennent d'une étude réalisée par Hodgkinson *et al.* qui démontre que la courbe de distribution de l'excrétion urinaire du calcium chez les patients lithiasiques a une forme similaire à celle observée chez les gens normaux, sauf que l'on observe une déviation de la courbe vers les grandes valeurs chez les patients lithiasiques<sup>65</sup>. Ce type de résultats démontre que l'excrétion du calcium est un trait complexe auquel plusieurs facteurs contribuent. Ces observations suggèrent, aussi, qu'il serait beaucoup plus approprié de traiter la calciurie non pas comme un trait qualitatif mais comme un trait quantitatif comme le sont la tension artérielle et les niveaux de cholestérol.

Finalement, les résultats obtenus par la création du modèle de rat hypercalciurique suggèrent également un mode de transmission polygénique du trait hypercalciurique<sup>60</sup>. Ce modèle de rat fut obtenu par concentration génétique en croisant, sur plus de 40 générations, des rats dont la calciurie était élevée, afin d'obtenir un rat dont l'excrétion urinaire de calcium soit beaucoup plus élevée que celle d'un groupe de rats contrôles<sup>66</sup>. Des mesures de la calciurie démontrent que l'intensité de l'hypercalciurie augmente avec les générations successives d'accouplement sélectif (de 1.18 mg/24h à 8 mg/24h sur 40 générations)<sup>67</sup>. L'analyse de ce modèle démontre qu'il reflète bien les observations faites chez des patients hypercalciuriques. Tout comme chez les patients hypercalciuriques, le modèle présente une hyperabsorption intestinale du calcium<sup>60</sup>, mais aussi un défaut de la réabsorption rénale tubulaire<sup>68</sup> et une tendance accrue à la déminéralisation des os<sup>69</sup> lors d'une diète faible en calcium. Il fut démontré, quoique non confirmé, que ces observations sont le résultat d'une augmentation de la stabilité de l'ARN

messenger codant pour le récepteur de la vitamine D<sub>3</sub>, ce qui a pour effet de rendre les rats plus sensible à la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub><sup>70</sup>.

### 3.3 Classification de l'hypercalciurie

Il existe 4 grandes classes d'hypercalciurie tel que défini par Pak soit : l'hypercalciurie absorptive (HA), rénale (HR), résorptive (HRé) et non-classée (HNC).

#### 3.3.1 L'hypercalciurie absorptive

Dans l'HA, on observe une augmentation de l'absorption intestinal du calcium qui résulte en une hypercalcémie transitoire qui inhibe la sécrétion de la PTH. La diminution de la PTH sérique entraîne une diminution de la réabsorption rénale et une augmentation de l'excrétion urinaire du calcium, ce qui a pour effet de normaliser le calcium sérique. On peut observer deux formes d'HA soit le type I (HA-I), une forme sévère, et le type II (HA-II), une forme plus légère de la maladie. L'HA-I se produit en présence ou en absence d'une diète avec apport élevé de calcium. Par contre, l'HA-II se produit seulement en présence d'une diète riche en calcium.

#### 3.3.2 L'hypercalciurie rénale

Dans ce type d'hypercalciurie, l'événement initiateur est un trouble de la réabsorption tubulaire rénale du calcium. Cela résulte en une diminution de la calcémie, ce qui stimule la sécrétion de la PTH. L'hyperparathyroïdie secondaire provoque une augmentation de la mobilisation du calcium par les os, une augmentation de la synthèse de la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> par les reins et une augmentation de l'absorption intestinale du calcium. Tous ces facteurs mènent à l'hypercalciurie.

#### 3.3.3 L'hypercalciurie résorptive

Cette forme d'hypercalciurie résulte d'une mobilisation excessive du calcium par les os causée par une hyperparathyroïdie primaire. L'HRé est aussi associée avec

une augmentation de l'absorption intestinale du calcium causée par une synthèse anormalement élevée de la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . Dans ce type d'hypercalciurie, l'hypercalcémie est une caractéristique du diagnostique. L'HRé est donc causé par l'augmentation de la charge calcique filtrée.

#### 3.3.4 *Les hypercalciuries non-classées*

Cette catégorie inclue 1) la fuite rénale de phosphate avec hypophosphatémie et hypercalciurie(HNC-I) et 2) l'hypercalciurie à jeun associée à des taux sériques normaux de PTH, de calcium et de phosphate(HNC-II).

#### 3.3.5 *Test diagnostique des hypercalciuries*

Le test de Pak<sup>71</sup> est un test diagnostique qui permet la différenciation de l'origine de l'hypercalciurie selon la réponse de l'organisme lors d'une surcharge ou d'une privation de calcium. Ce test est basé sur le fait 1) que durant le jeûne, le calcium urinaire sera élevé en présence d'un défaut rénal de réabsorption ou d'une mobilisation osseuse excessive; 2) qu'après la prise orale de 1 g de calcium, le calcium urinaire sera élevé en présence d'une hyperabsorption intestinale. Une calciurie à jeun est considérée normale lorsque celle-ci est inférieure à 0,11 mg de calcium/dL de filtrat glomérulaire et la calciurie normale après l'ingestion de 1 g de calcium est inférieure à 0,20 mg de calcium/mg de créatinine. Le tableau 3 résume les caractéristiques physiologiques et les critères diagnostiques associés à chacune des classe d'hypercalciuries.

**Tableau 3: Critères diagnostiques des hypercalciuries**

	Ca Sérique	PO4 Sérique	PTH Sérique	UCa 24h <sup>a</sup>	UCa à jeun	UCa post-charge
HA-I	N	N	N	↑	N	↑
HA-II	N	N	N	N	N	↑
HR	N	N	↑	↑	↑	N/↑
HRé	↑	N	↑	↑	↑	↑
HNC-I	N	↓	N/↓	↑	↑	↑
HNC-II	N	N	N	↑	↑	↑

Ca: calcium, PO4: phosphate, UCa: calciurie, N: normal, ↑: augmenté, ↓ diminué.

<sup>a</sup> diète restreinte en calcium

Par contre, l'utilisation du test de Pak et de cette classification est de plus en plus remise en question. Cette remise en question se base sur le retour à la normale de la calciurie chez des patients suivis à long termes initialement diagnostiqués HA ou HR<sup>72</sup>. Dans cette même étude, certains patients qui initialement étaient diagnostiqués HR manifestaient les caractéristiques cliniques de l'HA et vice versa. D'autres résultats en ce sens sont ceux obtenus avec la souris transgénique servant de modèle pour la maladie de Dent<sup>73</sup>. Les résultats de ce modèle démontrent que le profile d'hypercalciurie varie entre résorptive et absorptive selon la diète en calcium. Ces observations sur la calciurie sont beaucoup plus en accord avec l'expression d'un trait continu avec divers degrés de sévérités et de présentations cliniques.

## 4. *Le récepteur au calcium*

### 4.1 **Clonage moléculaire du récepteur au calcium**

#### 4.1.1 *Récepteur au calcium de la parathyroïde bovine*

Racke *et al.*<sup>74</sup> et Shoback et collaborateurs<sup>75</sup> ont démontré que des ovocytes de *Xenopus laevis* acquièrent une sensibilité aux agonistes du récepteur au calcium (CaR), lorsque ceux-ci sont injectés avec des extraits d'ARNm provenant des glandes parathyroïdes. Par la suite, Brown *et al.*<sup>76</sup> ont utilisé le même genre d'approche dans le but d'isoler, d'une banque d'ADNc provenant de la parathyroïde d'un bovin, un clone pleine longueur et fonctionnel du récepteur au calcium. Ces travaux ont mené à l'isolement d'un clone de 5,3 kb qui contient, en totalité, la séquence codant pour le CaR [CaR de la parathyroïde bovine (BoPCaR)<sup>76</sup>].

La séquence d'acides aminés déduite du BoPCaR prédit trois domaines majeurs (figure 2)<sup>77</sup>: 1) Un large domaine extracellulaire hydrophile à l'extrémité amino-terminale constituée de 613 acides aminés; 2) un domaine transmembranaire hydrophobe comprenant sept segments intramembranaires, caractéristique de la famille des récepteurs couplés aux protéines G, constitué de 250 acides aminés; 3) une queue carboxy-terminale située dans le cytosol et constituée de 222 acides aminés. De plus, le BoPCaR a une séquence qui prédit neuf sites favorables à une N-glycosylation des acides aminés dans le domaine extracellulaire, ce qui suggère que la protéine native soit exprimée comme une glycoprotéine. De plus, les boucles intracellulaires et la queue carboxy-terminale de la protéine contiennent cinq sites, potentiels, de phosphorylation par la protéine kinase C (PKC). Ces sites contribuent probablement au découplage du récepteur médié par la PKC, suite à l'activation de la phospholipase C (PLC) dans les cellules de la parathyroïde bovine<sup>78</sup>.

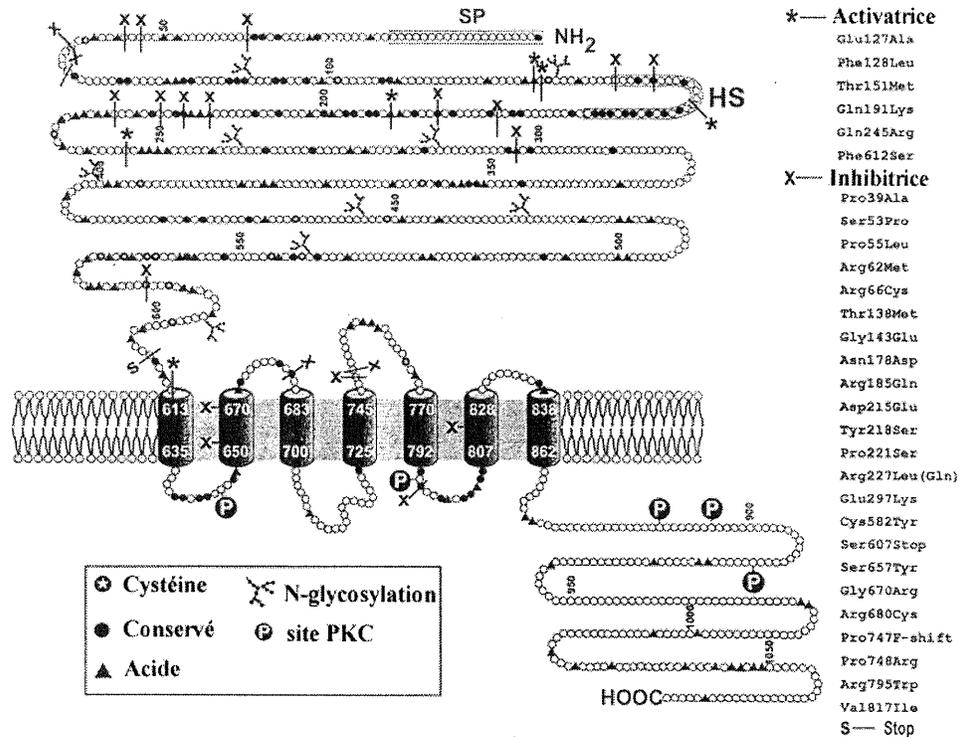


Figure 2: Prédiction de la structure du BoPCaR

Structure du BoPCaR illustrant les mutations activatrices et inhibitrices<sup>79-87</sup>. SP correspond au peptide signal prédit, HS correspond a un segment hydrophobique.

Le BoPCaR partage une homologie de séquence avec un seul membre de la famille des récepteurs couplés aux protéines G, il s'agit du récepteur métabotrope du glutamate (mGluR)<sup>76</sup>. Les mGluRs sont présents dans le système nerveux central et répondent au glutamate, le principal neurotransmetteur excitateur du cerveau<sup>88</sup>. Bien que l'homologie de séquence des acides aminés entre le BoPCaR et les mGluRs soit seulement de 18 à 24 %, ils partagent une impressionnante similarité topologique. Les deux classes de récepteurs possèdent un grand domaine extracellulaire ainsi que 20 résidus cystéines hautement conservés (17 dans le domaine extracellulaire et trois dans les segments transmembranaires ou dans les boucles extracellulaires). Des études ont démontré que c'est le grand domaine extracellulaire qui est responsable de la liaison du ligand dans ces deux types de récepteurs<sup>89,90</sup>. Les cystéines conservées contribuent, probablement, à

l'organisation, du domaine extracellulaire, en une pochette favorisant les interactions avec les ligands à faible charge tel que le  $\text{Ca}^{2+}$  le  $\text{Mg}^{2+}$  ou tout autres cations polyvalents. De plus, il est intéressant de constater que le domaine extracellulaire du BoPCaR contient plusieurs régions constituées en majorité d'acides aminés acides. Ces régions sont similaires à d'autres régions retrouvées sur des protéines liant le calcium avec une faible affinité, tel que la calsequestrine et la calreticuline, mais que l'on ne retrouve pas chez les mGluRs<sup>76</sup>. Finalement, la séquence ne prédit pas de motif ayant une forte affinité pour le calcium. Ce genre de motif serait inopportun pour la détection du calcium dans un fluide, car le site de liaison serait constamment utilisé et le récepteur serait incapable de détecter des variations.

#### 4.1.2 Clonage chez les autres espèces

Plus récemment, deux clones (4,0 et 5,2 kb) ont été isolés à partir d'une banque d'ADNc provenant d'un adénome d'une glande parathyroïde humaine<sup>91</sup>. Des études d'expressions dans des ovocytes confirment que les deux clones codent pour un CaR fonctionnel (HuPCaR). De plus, une forme essentiellement identique a subséquemment été isolée à partir d'une banque d'ADNc de reins humains<sup>92</sup>. De plus, des formes hautement similaires ont été clonées chez le rat, à partir de la médulla externe du rein (RaKCaR)<sup>93</sup>, du striatum du cerveau<sup>94</sup> et d'une ligné de cellules C (rMTC 44-2) dérivée des cellules d'un carcinome de la glande thyroïde<sup>95</sup>. Toutes ces formes dérivent certainement d'un seul et unique gène. De plus, les CaRs isolés chez les différentes espèces ont tous une forte homologie de séquence (> 90 % des acides aminés sont identiques), ce qui suggère fortement qu'ils sont homologues et dérivent du même gène ancestral. La majorité des différences inter-espèces résident dans la queue carboxy-terminale de la protéine et se situent au niveau des sites de glycosylation. La signification fonctionnelle et les différences inter-espèces de ces sites sont encore inconnues.

## 4.2 Couplage récepteur-effecteur

Dans les cellules bovines de la parathyroïde, un taux élevé de calcium extracellulaire entraîne l'activation de la PLC via un mécanisme non-sensible à la toxine pertussis<sup>96</sup>, contrairement au mécanisme menant à l'accumulation d'AMPc<sup>97</sup>. Ces résultats suggèrent que le CaR est couplé à la PLC par une protéine de la famille Gq<sup>98</sup>. Cependant, d'autres études sur des ovocytes exprimant le CaR ont démontré qu'une concentration élevée de calcium extracellulaire augmente l'accumulation d'inositol 1,4,5-triphosphate et de calcium intracellulaire<sup>76</sup> via un mécanisme sensible à la toxine pertussis. Ce qui suggère que la spécificité de la protéine par laquelle le CaR est couplé avec la PLC varie selon la nature de la cellule dans laquelle le récepteur est exprimé<sup>99,100</sup>.

Il a aussi été démontré que des concentrations élevées de calcium extracellulaire inhibent l'accumulation d'AMPc dans des cellules rénales embryonnaires humaines (HEK293) exprimant le CaR<sup>101</sup>. Cependant, le mécanisme par lequel les concentrations élevées de calcium inhibent la production d'AMPc reste encore à déterminer.

## 4.3 Distribution tissulaire

On retrouve une transcription du gène du CaR dans une multitude de tissus. Certains de ces tissus jouent un rôle important dans le contrôle de l'homéostasie du calcium et sont reconnus pour leur habileté à détecter des variations dans la concentration de calcium extracellulaire, ces tissus inclus la glande thyroïde et parathyroïde ainsi que certaines régions du rein. Dans la parathyroïde, on retrouve le CaR à la surface des cellules principales<sup>102</sup>. Au niveau de la parathyroïde, on retrouve le CaR en abondance au niveau de la membrane plasmique des cellules C.

La localisation de l'ARNm et de la protéine du CaR, au niveau du rein, à récemment été clarifiée non seulement par l'utilisation de l'hybridation *in situ* et de

l'immunohistochimie, mais aussi par une étude de RT-PCR sur de l'ARN isolé à partir de microdissection du néphron<sup>103</sup>. Cette étude a démontré que l'on retrouve l'ARNm du CaR dans tous les segments du néphron, incluant le glomérule, le tubule contourné proximal, l'anse ascendante large, le tubule contourné distal et le tubule collecteur. Dans l'anse ascendante large, le CaR a une distribution similaire à celle du PTHr et est principalement présent au niveau de la membrane basolatérale des cellules. Puisque l'on sait qu'une forte concentration de calcium extracellulaire inhibe la production d'AMPc induit par la PTH ainsi que la réabsorption du calcium par le néphron, la présence du CaR et du PTHr dans l'anse ascendante large et dans le tubule contourné distal supporte fortement l'évidence d'un rôle crucial du CaR dans la régulation, par les hormones calciotropiques, de l'homéostasie des ions<sup>79</sup>. De plus, il est implicite que le CaR accomplit cette fonction non seulement par la régulation de la sécrétion de la PTH, mais aussi en modulant l'action de celle-ci sur le rein.

Dans le cerveau, l'immunolocalisation du CaR a révélé la présence du récepteur au niveau du système nerveux central avec une abondance particulière dans le cervelet et l'hippocampe, le bulbe olfactif, la zone épendymal des ventricules cérébraux et dans les artères cérébrales<sup>94</sup>. Son expression au niveau des cellules du cervelet (cellules de Purkinje et granuleuses) suggère qu'il joue un rôle dans la coordination des mouvements, et sa présence au niveau de l'hippocampe soulève la possibilité que le CaR joue un rôle dans certaines fonctions cognitives, tel que l'apprentissage et la mémoire<sup>94,104</sup>. Finalement, la localisation du CaR, au niveau des artères cérébrales ainsi qu'au niveau des fibres et des terminaisons nerveuses et des corps neuronaux des cellules pyramidales de l'hippocampes, suggère que celui-ci joue un rôle dans la régulation du relâchement des neurotransmetteurs ou dans un autre aspect de la fonction neuronale. Finalement, il est possible que le CaR, dans le cerveau, réponde à d'autres ligands que le calcium, tel que les polycations, et ainsi joue un rôle plus général de détecteur d'ion qu'au niveau de la parathyroïde.

#### 4.4 Régulation du récepteur au calcium

À ce jour, il existe très peu d'études sur la régulation de la fonction et/ou l'expression du CaR. Les activateurs de PKC émoussent considérablement l'augmentation de l'accumulation d'inositol phosphate et de calcium intracellulaire causé par les fortes concentrations de calcium extracellulaire dans les cellules parathyroïdiennes bovines<sup>78,105,106</sup>. La présence des sites de phosphorylation de la PKC, prédit, sur le domaine intracellulaire du CaR suggère que les effets altérants l'activité de la PKC dans les cellules de la parathyroïde sont probablement le résultat de la phosphorylation d'un ou de plusieurs de ces sites<sup>76,92-95</sup>. Cependant, des études démontrant, de façon directe, une phosphorylation du CaR par la PKC et la conséquence fonctionnelle de l'élimination de ces sites permettront une dissection plus détaillée du mécanisme impliqué. De plus, ces études établiront l'importance de ces sites dans la régulation de la fonction du récepteur. En ce qui concerne les activateurs de PKA via un mécanisme dépendant de l'AMPc, contrairement aux activateurs de PKC, ils n'ont pas d'effets apparents sur l'augmentation d'inositol phosphate et de calcium intracellulaire dans les cellules parathyroïdiennes bovines<sup>107</sup>.

Les études sur le niveau d'expression du CaR sont eux aussi à un stade très précoce. Le traitement de rats avec de la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  entraîne une très faible augmentation du niveau d'expression de l'ARNm du CaR dans la parathyroïde dans une étude<sup>108</sup>, mais non dans une autre<sup>109</sup>. Par contre, une augmentation ou une diminution du calcium sérique n'a aucun effet sur le niveau d'expression du CaR dans ces deux études. Cependant une autre étude démontre qu'une concentration élevée de calcium extracellulaire augmente de deux fois l'expression de l'ARNm du CaR dans des cellules AtT-20<sup>100</sup>. Ce résultat soulève la possibilité que la régulation du récepteur dans des tissus responsables de l'homéostasie du calcium, tel que la parathyroïde, est différente de celle dans des tissus qui ne sont pas directement liés au métabolisme des ions, tel que le cerveau. Fait intéressant, une infusion de calcium entraîne une augmentation du niveau d'ACTH *in vivo*, ce qui suggère que la

présence du CaR dans les cellules AtT-20 n'est pas simplement due à une expression ectopique du récepteur dans une lignée tumorale.

Des cellules parathyroïdiennes bovines mises en culture subissent une diminution rapide et marquée de l'expression de l'ARNm et de la protéine du CaR, une diminution de 75 à 80 % pour les deux paramètres en 18h et 36 à 48h, respectivement<sup>102</sup>. Ceci est accompagné d'une augmentation du seuil d'activation de la sécrétion de PTH par la concentration de calcium extracellulaire, suivie d'une perte de la suppression de la sécrétion de la PTH médiée par une forte concentration de calcium sérique. Par conséquent, le niveau d'expression du CaR joue probablement un rôle important dans le contrôle de la sécrétion de la PTH régulée par la concentration du calcium extracellulaire. Contrairement à ce qui a été observé au niveau de la parathyroïde, on observe une augmentation dramatique de la régulation de l'expression de l'ARNm et de la protéine du CaR dans les reins de rat durant la première semaine de vie<sup>110</sup>. Ceci correspond dans le temps avec le développement de l'anse ascendante large et reflète l'expression tissue spécifique du récepteur dans le rein. Ces grands changements dans l'expression du CaR peuvent se produire autant *in vivo* qu'*in vitro*, cependant les mécanismes responsables de ces changements, ainsi que la détermination de l'expression tissue spécifique du CaR sont encore très nébuleux.

#### **4.5 Le gène du récepteur au calcium**

Le gène codant pour le CaR est localisé, chez l'humain, sur le chromosome 3<sup>111</sup>. Il est composé de six exons codant pour la protéine<sup>80</sup> et au moins un exon non-codant supplémentaire situé en 5'<sup>82</sup>. Les cinq premiers exons codent pour le domaine extracellulaire du CaR et le sixième codent pour le domaine transmembranaire et la queue carboxy-terminale. Cette structure exonique suggère que le CaR est le résultat d'une fusion entre sept domaines transmembranaires, un motif de transduction de signal et un exon ayant la propriété de détecter les taux de calcium extracellulaire. En ce qui concerne les séquences situées en 5' de la région

codante responsables du niveau et de la spécificité tissulaire de l'expression du CaR, peu de choses sont connus à ce jour.

#### 4.6 Maladies associées au récepteur au calcium

Depuis son clonage chez l'humain, le CaR a fait l'objet de plusieurs études qui ont tenté d'associer des modifications génétiques du récepteur à des traits pathologiques liés au métabolisme du calcium. Parmi ces traits, on retrouve l'hypocalciurie hypercalcémique familiale (HHF, aussi appelé hypercalcémie familiale bénigne, HFB) et l'hyperparathyroïdisme néonatal sévère (HPTNS), deux syndromes de résistance au calcium extracellulaire. Ces deux syndromes sont le résultat d'une diminution de la détection du calcium extracellulaire. L'HHF est un désordre transmis de façon autosomal dominant et le locus maladie, chez l'humain, a été localisé sur le chromosome 3<sup>111</sup>, plus précisément sur la bande 3q21-24<sup>112</sup>. À ce jour, nombreuses mutations inactivatrices du CaR ont été associées à l'HHF, la majorité étant située dans le domaine extracellulaire de la protéine du CaR (figure 2). En ce qui concerne l'HPTNS, il est fortement suggéré par Marx *et al.*<sup>113,114</sup> qu'il s'agit de la forme homozygote de l'HHF. De plus, Pollak *et al.* ont démontré, pour les deux traits, que le gène maladie est situé sur le chromosome 3q2 dans quatre familles ayant des individus atteints de HHF et des individus atteints d'HPTNS<sup>115</sup>. Finalement, Pollak *et al.*<sup>81</sup> ont identifié des mutations du CaR menant à une activation constitutive du récepteur. Ces mutations, dans le domaine extracellulaire (figure 2), sont associées à un syndrome familiale, l'hypocalcémie autosomale dominante (HAD).

## **5. Méthodes d'analyse en épidémiologie génétique**

### **5.1 Types d'approche**

#### *5.1.1 Étude des gènes candidats*

L'approche de l'étude des gènes candidats consiste à cibler quelques gènes d'intérêt pour un trait particulier et d'en faire l'étude à l'aide de marqueurs génétiques. Les marqueurs génétiques sont alors choisis selon leur informativité et leur proximité du gène d'intérêt. On peut donc parler de l'étude d'une région candidate et non seulement de l'étude d'un gène candidat. À titre d'exemple on peut parler du locus HLA (Human Leucocyte Antigen) sur le chromosome 6p21, qui est une région candidate pour les maladies auto-immunes<sup>116,117</sup>. Il est primordial, pour ce type d'étude, d'avoir un minimum de connaissances sur la physiopathologie du trait d'intérêt, car les gènes qui sont choisis doivent susciter un certain doute quant à leur possible implication dans le développement du trait. Ce type d'approche est donc limité par la solidité des connaissances de la physiopathologie du trait et du gène d'intérêt.

#### *5.1.2 Criblage du génome*

La deuxième approche consiste en une analyse de liaison génétique à l'aide de plusieurs marqueurs génétiques qui, contrairement à l'étude des gènes candidats, sont uniformément distribués à travers le génome. Cette approche a pour but d'identifier une ou des régions qui contiennent des éléments génétiques responsables du développement d'un trait. Contrairement à l'autre type d'approche, le criblage du génome ne requiert aucune connaissance a priori quant au rôle du gène ou au mécanisme de développement du trait. Par contre, ce type d'étude nécessite des coûts très élevés associés au génotypage des individus.

### **5.2 Analyse de liaison génétique**

Les études de liaison génétique sont couramment utilisées dans l'identification des gènes responsables du développement d'un trait complexe<sup>118</sup>.

Ce type d'étude tente de mettre en évidence la co-ségrégation d'un marqueur polymorphe avec un trait chez des familles comportant plusieurs membres atteints. Il existe deux types d'analyse de liaison variant selon qu'on précise a priori (paramétrique) ou non (non-paramétrique) le mode de transmission.

### 5.2.1 *Étude paramétrique*

La méthode paramétrique est sans aucun doute la méthode la plus puissante pour la détection d'une liaison génétique. On dit de cette méthode qu'elle est paramétrique car elle est dépendante d'un modèle de transmission. Ce type d'approche, tout comme l'approche non-paramétrique, utilise la méthode du maximum de vraisemblance<sup>119</sup>. On peut calculer le lod score en calculant le logarithme en base 10 du ratio de deux vraisemblances soit: la probabilité que le locus et le trait soient liés (fraction de recombinaison ( $\theta$ ) entre 0 et 0,49) sur la probabilité qu'ils ne le soient pas ( $\theta = 0,5$ ). On peut donc calculer le lod score à l'aide de la formule qui suit:

$$Z(\theta) = \log_{10} [\theta^R (1-\theta)^{NR} / (0,5)^R (0,5)^{NR}]$$

dans laquelle  $Z(\theta)$  correspond au lod score pour une fraction de recombinaison  $\theta$ ,  $R$  correspond au nombre d'individus recombinants et  $NR$  correspond au nombre d'individus non-recombinants.

On considère qu'une valeur de lod score supérieure à 3 constitue une évidence en faveur de la liaison et qu'une valeur inférieure à (-2) constitue une évidence contre une liaison entre les marqueurs et le trait étudié<sup>119</sup>. On retient donc la distance de recombinaison, exprimée en pourcentage ( $\theta$ ), pour laquelle on obtient le lod score maximum, comme étant la distance la plus probable entre le marqueur et le trait étudié. Le point faible de la méthode paramétrique est qu'elle requiert la spécification des paramètres de transmission, la pénétrance et la fréquence allélique du trait. Dans le cas d'un trait complexe, comme la lithiase rénale, ces paramètres sont inconnus.

### 5.2.2 *Étude non-paramétrique*

La méthode non-paramétrique est moins puissante mais beaucoup plus robuste que la méthode paramétrique et ne requiert pas de connaissances a priori du mode de transmission. L'étude des paires de germains est sans aucun doute la méthode non-paramétrique la plus répandue<sup>120</sup>. Selon la ségrégation mendélienne pour un locus autosomique, les germains ont en commun 0, 1 ou 2 allèles identiques par descendance (identical by descent, IBD) dans les proportions respectives de 25: 50: 25 %<sup>121</sup>. Cette méthode d'analyse est basée sur le fait qu'en présence d'une liaison génétique entre un marqueur et un trait, le ratio change et la proportion chez les germains atteints ayant deux allèles en commun augmente. Il existe plusieurs tests simples qui ont été développés<sup>120,121</sup>. Par contre, celui qui s'adapte le mieux aux différents modes de transmission est celui du test de la moyenne<sup>122</sup>. Le test de la moyenne consiste en un test unilatéral t avec N -1 degrés de liberté. Il se résume par la formule qui suit:

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

dans laquelle, N correspond au nombre total de paires de germains,  $n_1$  correspond à la proportion des paires ayant un allèle en commun et  $n_2$  correspond à la proportion des paires ayant deux allèles en commun.

De plus, il est possible, à l'aide de la méthode non-paramétrique, de faire une analyse de liaison génétique pour des traits quantitatifs, comme par exemple: la tension artérielle, la calciurie ou la résistance à l'insuline. Dans ce type d'analyse, on considère que les germains qui sont semblables pour un trait quantitatif devraient avoir plus d'allèles IBD que les germains qui sont différents. Lors de ce type d'analyse, on utilise la régression entre la différence au carré des mesures phénotypiques et la proportion des allèles, comme test pour identifier une liaison génétique entre le locus marqueur et le trait<sup>120</sup>. On estime qu'il y a possibilité de liaison entre un locus marqueur et trait lorsque la pente de la régression est significativement négative. Pour déterminer si la régression d'une pente est significative, on utilise la formule qui suit:

$$t = p / \sqrt{v(p)}$$

dans la quelle,  $p$  correspond à la valeur de la pente et  $v$  à la variance de celle-ci.

## Corps du mémoire:

### 6. *Étude du gène du récepteur au calcium dans l'hypercalciurie idiopathique et la néphrolithiase calcique*

**Hypothèse:** Une variation génétique au locus du CaR est liée à l'hypercalciurie idiopathique et/ou la néphrolithiase calcique dans des familles canadiennes-françaises.

**Rationnelle:** Le CaR joue un rôle important dans le métabolisme du calcium en régulant la sécrétion de la PTH en réponse aux variations du taux de calcium extracellulaire. De plus, des variations génétiques entraînant un gain de fonction du CaR mènent à l'hypocalcémie autosomale dominante, un trait pathologique associé à une hypercalciurie. Par conséquent, il se peut qu'une variation génétique au locus du CaR entraîne un faible gain de fonction résultant une hypercalciurie, causé par une fuite rénale de calcium.

**Conclusion:** Cette étude suggère que des variations génétiques au locus du CaR ne sont pas liées à l'hypercalciurie idiopathique ainsi qu'à la formation de néphrolithiases oxalo-calcique dans des familles canadiennes-françaises.

### **6.1 Article: Evaluation of the Calcium Sensing Receptor Gene in Idiopathic Hypercalciuria and Calcium Nephrolithiasis**

Martin Petrucci B.Sc., Patrick Scott M.Sc., Denis Ouimet MD, Marie-Lucie Trouvé RN, Yanick Proulx B.Sc., Luc Valiquette MD, Gérald Guay MD, Alain Bonnardeaux MD, Ph.D. *Kidney Int* 2000 Jul; 58(1): 38-42.

#### *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 (lodscore  $< -2$ ) 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 [1]. 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 [2-6]. A positive family history is a strong risk factor [6] and the passage or formation of calcium stones is probably a polygenic trait [3] 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 [7]. 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 [8], 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 [9]. 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 [10-13].

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 [14]. 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 [14]. 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 [15]). 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 [16].

Genotyping was performed on genomic DNA extracted from peripheral leukocytes by a salting out procedure [17]. 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 [18], 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 [19,20].

Genetic and quantitative trait linkage analyses on intermediate phenotypes relevant to calcium homeostasis were performed with the MAPMAKER/SIBS program version 2.1 [21] 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 [22]. 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 [23]) 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 [13]. 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 [24-26], as well as delineating the “environmental” factors associated with stone formation [27], 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 [14] but have recently suggested that a gene at or near the vitamin D receptor on chromosome 12 might be linked to this trait [28]. 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 calculuria above the 75<sup>th</sup> percentile in our database.

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

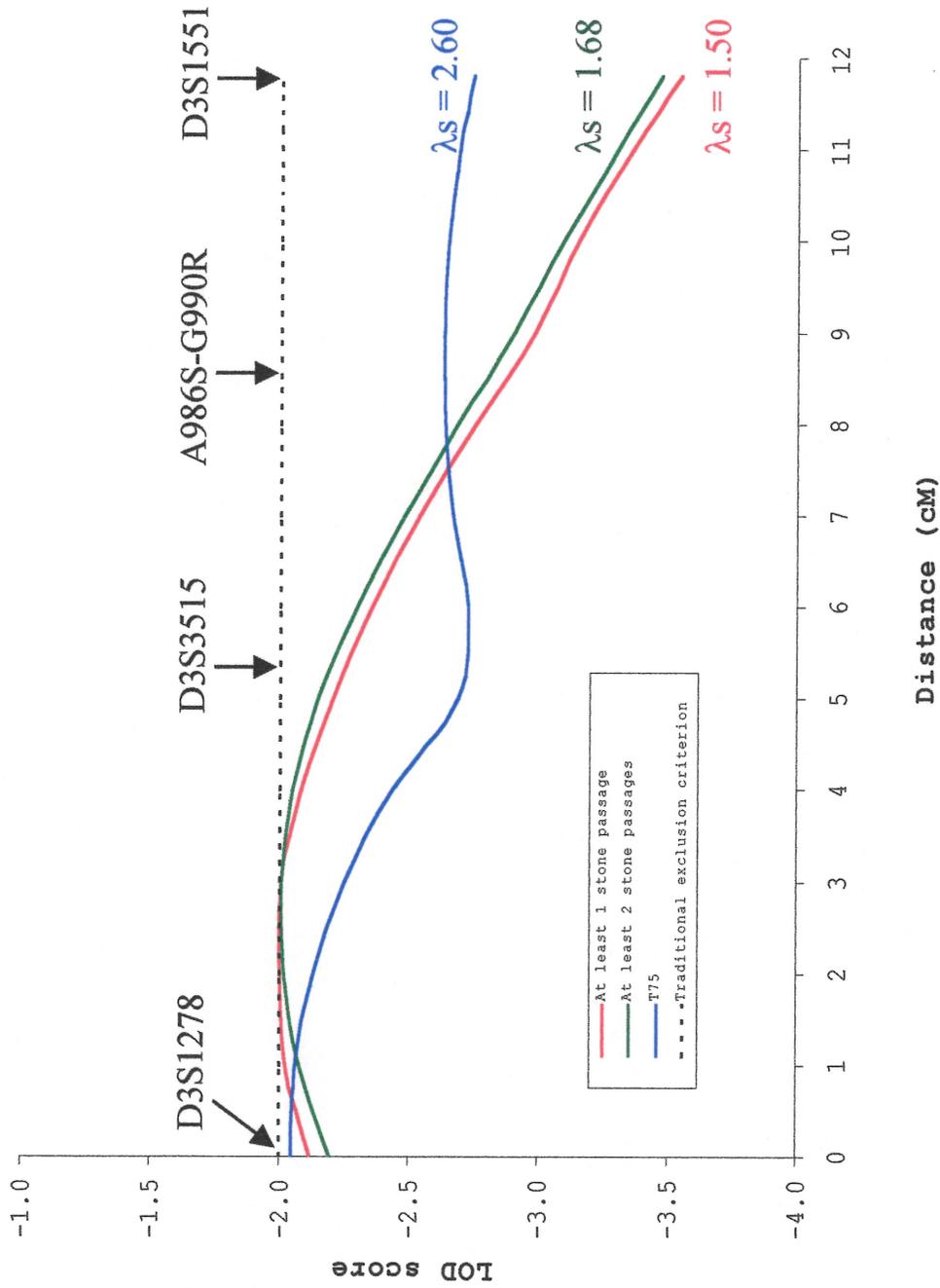
Status	At least 1 stone passage		At least 2 stone passages		Trait T75 <sup>a</sup>		
	Unaffected	Affected	P-values	Affected	P-values	Affected	P-values
Serum Calcium (mmol/L)	2.33 ± 0.10 245	2.31 ± 0.15 282	0.13	2.31 ± 0.13 187	0.28	2.34 ± 0.10 80	0.41
Serum PTH (pmol/L)	3.12 ± 1.62 229	3.15 ± 1.48 263	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 [15]).



**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.

**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.

## 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., Peacock, M., Baker, M., Marshall, D., Pearlman, B., Speed, R., Sergeant, V. & Smith, A.: 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., Park, J., Lee, W.S., Gamba, G., Brown, E.M. & Hebert, S.C.: 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., Naruse, M., Baum, M., Jo, I., Hebert, S.C., Brown, E.M. & Harris, H.W.: 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., Chou, Y.H., Marx, S.J., Steinmann, B., Cole, D.E., Brandi, M.L., Papapoulos, S.E., Menko, F.H., Hendy, G.N., Brown, E.M., Seidman, E. & Seidman, J.G.: 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., Trump, D., Wooding, C., Besser, G.M., Chew, S.L., Grant, D.B., Heath, D.A., Hughes, I.A., Paterson, C.R., Whyte, M.P. & Thakker, R.

- R.V.: Calcium-sensing receptor mutations in familial benign hypercalcemia and neonatal hyperparathyroidism. *J Clin Invest* 96 : 2683-2692, 1995.
12. Pollak, M.R., Brown, E.M., Estep, H.L., McLaine, P.N., Kifor, O., Park, J., Hebert, S.C., Seidman, C.E. & Seidman, J.G.: Autosomal dominant hypocalcaemia caused by a Ca(2+)-sensing receptor gene mutation. *Nat Genet* 8 : 303-307, 1994.
  13. Pearce, S.H., Williamson, C., Kifor, O., Bai, M., Coulthard, M.G., Davies, M., Lewis-Barned, N., McCredie, D., Powell, H., Kendall-Taylor, P., Brown, E.M. & Thakker, R.V.: A familial syndrome of hypocalcemia with hypercalciuria due to mutations in the calcium-sensing receptor. *New Engl J Med* 335 : 1115-1122, 1996.
  14. Scott, P., Ouimet, D., Proulx, Y., Trouve, M.L., 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* 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., Peltekova, V., Janicic, N., Liew, C.C., Hwang, D., Evrovski, J., Hendy, G.N. & Cole, D.E.: Calcium sensing receptor gene: analysis of polymorphism frequency. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 227 : 122-125, 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., Soliman, E., Pausova, Z., Seldin, M.F., Riviere, M., Szpirer, J., Szpirer, C. & Hendy, G.N.: 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., Pearce, S., Fisher, S., Steinmeyer, K., Schwappach, B., Scheinman, S., Harding, B., Bolino, A., Devoto, M., Goodyer, P., Rigden, S., Wrong, O., Jentsch, T., Craig, I. & Thakker, R.: A common molecular basis for three inherited kidney stone diseases. *Nature* 379 : 445-449, 1996.
25. Karet, F.E., Gainza, F.J., Gyory, A.Z., Unwin, R.J., Wrong, O., Tanner, M.J., Nayir, A., Alpay, H., Santos, F., Hulton, S.A., Bakkaloglu, A., Ozen, S., Cunningham, M.J., di Pietro, A., Walker, W.G. & Lifton, R.P.: 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 : 6337-42, 1998.
26. Karet, F.E., Finberg, K.E., Nelson, R.D., Nayir, A., Mocan, H., Sanjad, S.A., Rodriguez-Soriano, J., Santos, F., Cremers, C.W., Di Pietro, A., Hoffbrand, B.I., Winiarski, J., Bakkaloglu, A., Ozen, S., Dusunsel, R., Goodyer, P., Hulton, S.A., Wu, D.K., Skvorak, A.B., Morton, C.C., Cunningham, M.J., Jha, V. & Lifton, R.P.: 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., Ouimet, D., Valiquette, L., Proulx, Y., Trouve, M., Guay, G., Gagnon, B. & Bonnardeaux, A.: Suggestive evidence for linkage to calcium nephrolithiasis near the vitamin D receptor locus. *J Am Soc Nephrol* 10 : 1007-1013, 1999.

## Discussion:

### 7. *Synthèse des résultats*

Dans cette étude, nous avons utilisé une approche de gène candidat pour déterminer l'implication éventuelle du gène du CaR dans l'excrétion urinaire du calcium et/ou dans le développement de lithiases urinaires oxalo-calciques. Cette étude a été effectuée sur un groupe de familles multigénérationnelles d'origine canadienne-française, ayant plusieurs individus atteints. Nous avons réalisé un analyse multipoints à l'aide de la méthode de comparaison des paires de germains atteints. Ce type d'analyse est très approprié dans l'étude d'un trait dont le mode de transmission est complexe ou inconnu. Les résultats de cette étude suggèrent que des variations génétiques au locus, ou près du locus du gène CaR ne sont pas associées au développement de néphrolithiases hypercalciuriques dans notre groupe de famille, ou dans un sous-groupe d'individus hypercalciuriques. De plus, le locus du CaR n'est pas associé à des phénotypes intermédiaires liés à l'homéostasie du calcium tel que la calcémie, la calciurie, le taux sérique de PTH et de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .

Ces résultats suggèrent que le locus du CaR peut être exclu comme un gène principal pour la néphrolithiase à un ratio  $\lambda_s$  (défini comme le ratio de la prévalence chez les enfants de parents atteints et de la prévalence dans la population en général<sup>30</sup>) de 1,50 et 1,68, pour les traits  $\geq 1$  et  $\geq 2$  épisodes lithiasiques respectivement. De plus, le locus du CaR est exclu, avec un  $\lambda_s$  de 2,6, pour le trait lithiasique hypercalciurique (au moins un épisode lithiasique concordant pour une calciurie au-dessus du 75<sup>ème</sup> centile). Ces résultats sont applicables pour les familles étudiées ici et n'excluent pas la possibilité qu'une variation du gène du CaR soit impliquée dans l'hypercalciurie idiopathique ou dans le développement de lithiases rénales, dans une autre population. De plus, nous ne pouvons pas exclure que des mutations rares du gène du CaR soient associées avec la formation de néphrolithiases<sup>123</sup>. Cependant, des variations de ce gène prédisposant à la formation de lithiases rénales sont probablement peu communes dans notre population lithiasique.

De plus, cette étude démontre que l'excrétion urinaire du calcium est augmentée chez les individus lithiasiques, comparativement à ceux ne formant pas de lithiases. Les individus atteints ont une calciurie de 24 heures et à jeun augmentée, ainsi qu'une augmentation de l'excrétion de calcium suite à l'ingestion de 1g de calcium. Cette étude est la première à démontrer, statistiquement, que l'hypercalciurie peut être isolée avec la formation de lithiases en utilisant des contrôles familiaux. Les études antérieures utilisaient des sujets contrôles non apparentés, ce qui peut conduire à une stratification de la population.

Malgré les récents progrès réalisés dans l'identification des traits monogéniques associés à l'hypercalciurie<sup>34,124,125</sup>, ainsi que dans l'identification des facteurs environnementaux associés au développement de lithiases rénales<sup>22</sup>, les bases génétiques responsables de l'hypercalciurie idiopathique demeurent obscures. À ce jour, les gènes de la  $1\alpha$ -hydroxylase<sup>36</sup>, la néphrocalcine, l'uromoduline et l'uropontine (Appendice I) furent exclus comme des gènes principaux pour formation de lithiases calciques. Cependant, Scott *et al.* ont récemment suggéré qu'un gène situé près du locus du récepteur de la vitamine D<sub>3</sub>, sur le chromosome 12 soit lié à la formation de néphrolithiases<sup>37</sup>. Étant donné une liste assez restreinte de gènes candidats, l'équipe du Dr Bonnardeaux a complété son approche de gènes candidats par un criblage du génome, étude présentement en cours.

## 8. *Étude du gène du CaR : Forces et faiblesses*

### 8.1 Puissance de l'étude

Dans l'étude des traits complexes, la puissance de l'étude est directement reliée à la taille de l'échantillon nécessaire à la détection d'une liaison génétique. Risch a démontré que la puissance est dépendante du  $\lambda_s$  du trait<sup>126</sup>. Le calcul de Risch prédit qu'il faut 200 paires de germains afin d'identifier, avec une puissance de 80 %, un locus maladie ayant un  $\lambda_s$  de 2. Cependant, ce calcul sous entend que la fraction de recombinaison est de 0 et que le marqueur utilisé est complètement informatif<sup>126,127</sup>. Ces conditions sont purement théoriques et sont pratiquement irréalisables. Il est possible de minimiser la perte de puissance causée par une augmentation de la fréquence de recombinaison et/ou par une diminution de l'informativité des marqueurs, en effectuant une analyse multipoint<sup>128</sup>. Dans l'étude du gène du CaR la perte de puissance a été limitée par l'utilisation de plusieurs marqueurs hautement polymorphes (indice d'hétérozygotie > 0.85) et couvrant toute la région candidate.

### 8.2 Approche par gènes candidats

Ce type d'approche fut très efficace dans l'identification du rôle du gène de l'insuline dans le diabète mellitus insulino-dépendant<sup>129</sup> et d'un facteur HLA dans la sclérose en plaque<sup>130</sup>. Cependant, l'approche des gènes candidats, tel qu'utilisée dans l'étude du CaR, est une méthode très limitée. Elle devient beaucoup plus efficace, lorsque l'étude des candidats est concentrée dans une région préalablement identifiée par des études de liaison préalables sur l'ensemble du génome. Il est donc préférable d'effectuer, au préalable, une étude plus générale d'un chromosome ou du génome entier à l'aide de marqueurs génétiques dispersés uniformément dans la région d'intérêt. Par la suite, on focalise sur les gènes candidats situés dans le ou les locus positifs, en ajoutant d'autres marqueurs dans ces régions. Ce type d'approche est beaucoup plus efficace pour l'identification des facteurs génétiques. Cependant

elle est aussi plus coûteuse et plus longue. Elle n'est donc pas à la portée de tous les groupes de recherche.

### **8.3 Étude d'une population isolée**

Le choix d'une population, dans laquelle l'origine ethnique est commune, est très important dans une étude génétique, car elle permet de diminuer l'hétérogénéité génétique. Dans ce type de population, les variations génétiques responsables du développement d'un trait sont moins nombreuses et proviennent souvent d'un nombre limité d'haplotypes ancestraux. La population canadienne-française reflète bien le profil d'une population homogène, car depuis le début de la colonie la population québécoise est demeurée relativement isolée, principalement à cause de considérations géographiques et linguistiques. De plus, il est très fréquent de retrouver des familles avec de multiples enfants dans cette population, ce qui est idéal pour les analyses de liaison. Le seul problème, dans l'étude de ce type de population, est que les variations génétiques identifiées dans ces groupes peuvent ne pas être retrouvées dans une population plus hétérogène.

## 9. *Perspectives*

Plusieurs gènes candidats potentiellement responsables du développement de lithiases rénales et de l'hypercalciurie idiopathique ont été étudiés. Cependant, aucun de ceux-ci ne démontre un rôle important dans la pathogenèse du trait lithiasique associé à l'hypercalciurie. L'identification et le clonage récent d'autres gènes potentiellement impliqués dans le métabolisme du calcium tel que les canaux calciques<sup>131</sup>, les Ca-ATPases<sup>132</sup>, l'échangeur Na/Ca<sup>133</sup>, fait de ceux-ci des candidats pour la formation de lithiases. De plus, la démonstration d'une augmentation de l'activité de la Ca(Mg)-ATPase chez les patients hypercalciuriques fait aussi de celui-ci un candidat intéressant<sup>134</sup>. Cependant, la récente découverte du rôle de la sous unité  $\gamma$  de la pompe  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase dans les fuites rénales de magnésium<sup>135</sup> soulève un doute quant au lien évident entre le facteur génétique responsable du trait lithiasique et le métabolisme du calcium. Ce résultat suggère que les mécanismes moléculaires responsables des échanges ioniques dans le néphron sont très complexes et probablement inter-reliés d'un ion à un autre. Cette découverte rend donc la liste des gènes, potentiellement, candidats pour la néphrolithiase très longue. C'est pour cette raison et étant donné le faible rendement de l'approche par gène candidats, que nous croyons que l'identification des facteurs génétiques responsables du développement de lithiases oxalo-calcique passe inévitablement par un criblage du génome humain. Des travaux en ce sens sont présentement en cours dans le laboratoire du Dr Bonnardeaux. Cependant, les résultats se situent à un stade partiel. Par contre, à la lumière des résultats obtenus jusqu'à maintenant, certains locus du chromosome 6, 10, 14 et 20 semblent démontrer une liaison (NPL >2). Cependant, l'étude doit être approfondie avant de conclure à une liaison génétique entre ces locus et la formation de néphrolithiases.

## Bibliographie:

1. Coe, F., Parks, J. & Asplin, J. The pathogenesis and treatment of kidney stones [Review]. *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. & Edstrand, 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**, 10-3 (1987).
6. Andriani, R.T. & Carson, C.C.d. Urolithiasis. *Clin Symp* **38**, 3-32 (1986).
7. Mandel, N. Mechanism of stone formation. *Semin Nephrol* **16**, 364-374 (1996).
8. Pak, C. *et al.* Ambulatory evaluation of nephrolithiasis. Classification, clinical presentation and diagnostic criteria. *Am J Med* **69**, 19-30 (1980).
9. Levy, F., Adams-Huet, M. & Pak, C. Ambulatory evaluation of nephrolithiasis: an update of a 1980 protocol. *Am J Med* **98**, 50-59 (1995).
10. Lieske, J.C. & Toback, F.G. Interaction of urinary crystals with renal epithelial cells in the pathogenesis of nephrolithiasis. *Semin Nephrol* **16**, 458-473 (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**, 393-8 (1994).
18. Trinchieri, A. Epidemiology of urolithiasis. *Arch Ital Urol Androl* **68**, 203-49 (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**, 23-5 (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. Sutton, R.A. Disorders of renal calcium excretion. *Kidney Int* **23**, 665-73 (1983).
25. McGeown, M. Heredity in renal stone disease. *Clin Sci* **19**, 465-471 (1960).
26. Resnick, M., Pridgen, D. & Goodman, H. Genetic predisposition to formation of calcium oxalate renal calculi. *N Engl J Med* **278**, 1313-1318 (1968).
27. Ljunghall, S. Family history of renal stones in a population study of stone formers and healthy subjects. *Br J Urol* **51**, 249-252 (1979).

28. Trinchieri, A., Mandressi, A., Luongo, P., Coppi, F. & Pisani, E. Familial aggregation of renal calcium stone disease [see comments]. *J Urol* **139**, 478-481 (1988).
29. 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).
30. Risch, N. Linkage strategies for genetically complex traits. I. Multilocus models. *Am J Hum Genet* **46**, 222-228 (1990).
31. 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).
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**, 245-7 (1981).
33. Buckalew, V.M., Jr. Nephrolithiasis in renal tubular acidosis. *Journal of Urology* **141**, 731-7 (1989).
34. Lloyd, S. *et al.* A common molecular basis for three inherited kidney stone diseases. *Nature* **379**, 445-449 (1996).
35. 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).
36. 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).
37. Scott, P. *et al.* Suggestive evidence for linkage to calcium nephrolithiasis near the vitamin D receptor locus. *J Am Soc Nephrol* **10**, 1007-1013 (1999).
38. Hurwitz, S. Homeostatic control of plasma calcium concentration. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **31**, 41-100 (1996).
39. 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).
40. 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).

41. 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**, 113-8 (1987).
42. 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**, 247-64 (1994).
43. Brenza, H.L. *et al.* Parathyroid hormone activation of the 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>-1 $\alpha$ -hydroxylase gene promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 1387-1391 (1998).
44. Austin, L.A. & Heath, H.d. Calcitonin: physiology and pathophysiology. *N Engl J Med* **304**, 269-78 (1981).
45. Jones, G., Strugnell, S.A. & DeLuca, H.F. Current understanding of the molecular actions of vitamin D. *Physiol Rev* **78**, 1193-231 (1998).
46. Saarem, K., Bergseth, S., Oftebro, H. & Pedersen, J.I. Subcellular localization of vitamin D<sub>3</sub> 25-hydroxylase in human liver. *J Biol Chem* **259**, 10936-40 (1984).
47. Takeyama, K. *et al.* 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub> 1 $\alpha$ -hydroxylase and vitamin D synthesis. *Science* **277**, 1827-30 (1997).
48. Haussler, M.R. *et al.* The vitamin D hormone and its nuclear receptor: molecular actions and disease states. *J Endocrinol* **154 Suppl**, S57-73 (1997).
49. 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**, 9315-9 (1991).
50. Ozono, K., Sone, T. & Pike, J.W. The genomic mechanism of action of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *J Bone Miner Res* **6**, 1021-7 (1991).
51. 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**, 369-73 (1990).
52. 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**, 9995-9 (1990).

53. 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**, 2203-8 (1988).
54. 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**, 1675-8 (1995).
55. Christakos, S., Gill, R., Lee, S. & Li, H. Molecular aspects of the calbindins. *J Nutr* **122**, 678-82 (1992).
56. Lemann, J. Idiopathic hypercalciuria. in *Nephrolithiasis* (eds. Coe, F., Brenner, B. & Stein, J.) 86-115 (Churchill Livingstone, New York, 1980).
57. Coe, F. & Bushinsky, D. Pathophysiology of hypercalciuria. *Am J Physiol* **247**, F1-F13 (1984).
58. Robertson, W.G. & Morgan, D.B. The distribution of urinary calcium excretions in normal persons and stone-formers. *Clin Chim Acta* **37**, 503-8 (1972).
59. Coe, F., Parks, J. & Moore, E. Familial idiopathic hypercalciuria. *N Engl J Med* **300**, 337-340 (1979).
60. 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).
61. 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).
62. Mehes, K. & Szelid, Z. Autosomal dominant inheritance of hypercalciuria. *Eur J Pediatr* **133**, 239-242 (1980).
63. Pak, C., Mc Guire, J. & Peterson, R. Familial absorptive hypercalciuria in a large kindred. *J Urol* **126**, 717-719 (1981).
64. Harangi, F. & Mehes, K. Family investigations in idiopathic hypercalciuria. *Eur J Pediatr* **152**, 64-8 (1993).
65. 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).

66. 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).
67. Favus, M.J. Hypercalciuria: lessons from studies of genetic hypercalciuric rats. *J Am Soc Nephrol* **5**, S54-8 (1994).
68. Tsuruoka, S., Bushinsky, D.A. & Schwartz, G.J. Defective renal calcium reabsorption in genetic hypercalciuric rats. *Kidney Int* **51**, 1540-1547 (1997).
69. Bushinsky, D.A., Neumann, K.J., Asplin, J. & Krieger, N.S. Alendronate decreases urine calcium and supersaturation in genetic hypercalciuric rats. *Kidney Int* **55**, 234-43 (1999).
70. Yao, J., Kathpalia, P., Bushinsky, D.A. & Favus, M.J. Hyperresponsiveness of vitamin D receptor gene expression to 1, 25- dihydroxyvitamin D3. A new characteristic of genetic hypercalciuric stone-forming rats. *J Clin Invest* **101**, 2223-2232 (1998).
71. 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).
72. Aladjem, M., Barr, J., Lahat, E. & Bistrizter, T. Renal and absorptive hypercalciuria: a metabolic disturbance with varying and interchanging modes of expression. *Pediatrics* **97**, 216-9 (1996).
73. Luyckx, V.A., Leclercq, B., Dowland, L.K. & Yu, A.S. Diet-dependent hypercalciuria in transgenic mice with reduced CLC5 chloride channel expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 12174-9 (1999).
74. Racke, F.K., Hammerland, L.G., Dubyak, G.R. & Nemeth, E.F. Functional expression of the parathyroid cell calcium receptor in *Xenopus* oocytes. *FEBS Lett* **333**, 132-6 (1993).
75. Chen, T.H., Pratt, S.A. & Shoback, D.M. Injection of bovine parathyroid poly(A)+ RNA into *Xenopus* oocytes confers sensitivity to high extracellular calcium. *J Bone Miner Res* **9**, 293-300 (1994).
76. Brown, E.M. *et al.* Cloning and characterization of an extracellular Ca<sup>2+</sup> - sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature* **366**, 575-580 (1993).
77. Chattopadhyay, N., Mithal, A. & Brown, E.M. The calcium-sensing receptor: a window into the physiology and pathophysiology of mineral ion

- metabolism [published erratum appears in *Endocr Rev* 1996 Oct;17(5):517]. *Endocr Rev* **17**, 289-307 (1996).
78. Kifor, O., Congo, D. & Brown, E.M. Phorbol esters modulate the high Ca<sup>2+</sup>-stimulated accumulation of inositol phosphates in bovine parathyroid cells. *J Bone Miner Res* **5**, 1003-11 (1990).
  79. Brown, E.M. *et al.* Calcium-ion-sensing cell-surface receptors. *N Engl J Med* **333**, 234-40 (1995).
  80. Pollak, M.R. *et al.* Mutations in the human Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor gene cause familial hypocalciuric hypercalcemia and neonatal severe hyperparathyroidism [see comments]. *Cell* **75**, 1297-303 (1993).
  81. Pollak, M.R. *et al.* Autosomal dominant hypocalcaemia caused by a Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor gene mutation. *Nat Genet* **8**, 303-307 (1994).
  82. Pearce, S.H. *et al.* Calcium-sensing receptor mutations in familial benign hypercalcemia and neonatal hyperparathyroidism. *J Clin Invest* **96**, 2683-2692 (1995).
  83. Chou, Y.H. *et al.* Mutations in the human Ca<sup>2+</sup>-sensing-receptor gene that cause familial hypocalciuric hypercalcemia. *Am J Hum Genet* **56**, 1075-9 (1995).
  84. Heath, H., 3rd *et al.* Clustered inactivating mutations and benign polymorphisms of the calcium receptor gene in familial benign hypocalciuric hypercalcemia suggest receptor functional domains [see comments]. *J Clin Endocrinol Metab* **81**, 1312-7 (1996).
  85. Aida, K. *et al.* Familial hypocalciuric hypercalcemia associated with mutation in the human Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor gene. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **80**, 2594-8 (1995).
  86. Perry, Y., Finegold, D., Armitage, M. & Ferrell, R. A missense mutation in the Ca-sensing receptor causes familial autosomal dominant hypoparathyroidism. *Am J Hum Genet* **55S**, A17 (1994).
  87. Pearce, S., Coulthard, M., Kendall-Taylor, P. & Thakker, R. Autosomal dominant hypocalcaemia associated with a mutation in the calcium-sensing receptor. *J Bone Miner Res* **10** :[Suppl 1], S176 (Abstract 149) (1995).
  88. Nakanishi, S. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science* **258**, 597-603 (1992).

89. Takahashi, K., Tsuchida, K., Tanabe, Y., Masu, M. & Nakanishi, S. Role of the large extracellular domain of metabotropic glutamate receptors in agonist selectivity determination. *J Biol Chem* **268**, 19341-5 (1993).
90. Hammerland, L. *et al.* Cation binding determinants of the calcium receptor revealed by functional analysis of chimeric receptor and a deletion mutant. *J Bone Miner Res* **10**, S156 (Abstract 69) (1995).
91. Garrett, J.E. *et al.* Molecular cloning and functional expression of human parathyroid calcium receptor cDNAs. *J Biol Chem* **270**, 12919-12925 (1995).
92. Aida, K., Koishi, S., Tawata, M. & Onaya, T. Molecular cloning of a putative Ca(2+)-sensing receptor cDNA from human kidney. *Biochem Biophys Res Commun* **214**, 524-9 (1995).
93. Riccardi, D. *et al.* Cloning and functional expression of a rat kidney extracellular calcium/polyvalent cation-sensing receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 131-135 (1995).
94. Ruat, M., Molliver, M.E., Snowman, A.M. & Snyder, S.H. Calcium sensing receptor: molecular cloning in rat and localization to nerve terminals. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 3161-5 (1995).
95. Garrett, J.E. *et al.* Calcitonin-secreting cells of the thyroid express an extracellular calcium receptor gene. *Endocrinology* **136**, 5202-11 (1995).
96. Hawkins, D., Enyedi, P. & Brown, E. The effects of high extracellular Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> concentrations on the levels of inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate in bovine parathyroid cells. *Endocrinology* **124**, 838-44 (1989).
97. Chen, C.J., Barnett, J.V., Congo, D.A. & Brown, E.M. Divalent cations suppress 3',5'-adenosine monophosphate accumulation by stimulating a pertussis toxin-sensitive guanine nucleotide-binding protein in cultured bovine parathyroid cells. *Endocrinology* **124**, 233-9 (1989).
98. Varrault, A. *et al.* Expression of G protein alpha-subunits in bovine parathyroid. *Endocrinology* **136**, 4390-6 (1995).
99. Moriarty, T.M. *et al.* Coupling of exogenous receptors to phospholipase C in *Xenopus* oocytes through pertussis toxin-sensitive and -insensitive pathways. Cross-talk through heterotrimeric G-proteins. *J Biol Chem* **264**, 13524-30 (1989).

100. Emanuel, R.L. *et al.* Calcium-sensing receptor expression and regulation by extracellular calcium in the AtT-20 pituitary cell line. *Mol Endocrinol* **10**, 555-65 (1996).
101. Rogers, K., Dunn, C., Hebert, S., Brown, E. & Nemeth, E. Pharmacological comparison of bovine parathyroid, human parathyroid, and rat kidney calcium receptor expressed in HEK 293 cells. *J Bone Miner Res* **10**, S483 (abstract T516) (1995).
102. Mithal, A. *et al.* The reduced responsiveness of cultured bovine parathyroid cells to extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  is associated with marked reduction in the expression of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ -sensing receptor messenger ribonucleic acid and protein. *Endocrinology* **136**, 3087-92 (1995).
103. Riccardi, D. *et al.* Localization of the extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ -sensing receptor and PTH/PTHrP receptor in rat kidney. *Am J Physiol* **271**, F951-6 (1996).
104. Dunn, C., Brown, E., Hebert, S. & Rogers, K. Localization of calcium receptor mRNA in the adult rat central nervous system by in situ hybridization. *Abstract of the Neuroscience Meeting*, 1061 (abstract) (1994).
105. 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).
106. Racke, F.K. & Nemeth, E.F. Cytosolic calcium homeostasis in bovine parathyroid cells and its modulation by protein kinase C. *J Physiol (Lond)* **468**, 141-62 (1993).
107. Brown, E.M., Redgrave, J. & Thatcher, J. Effect of the phorbol ester TPA on PTH secretion. Evidence for a role for protein kinase C in the control of PTH release. *FEBS Lett* **175**, 72-5 (1984).
108. Zhong, M. *et al.* Rat parathyroid gland calcium receptor: regulation by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> but not by dietary hyperparathyroidism. *J bone miner Res* **9 (suppl 1)**, S217 (abstract A436) (1994).
109. Rogers, K.V. *et al.* Calcium receptor messenger ribonucleic acid levels in the parathyroid glands and kidney of vitamin D-deficient rats are not regulated by plasma calcium or 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Endocrinology* **136**, 499-504 (1995).

110. Baum, M. *et al.* Perinatal expression of aquaporins-2 and 3 and the calcium receptor in developing rat kidney collecting ducts. *J Am Soc Nephrol* **6**, 319 (abstract) (1995).
111. Chou, Y.H. *et al.* The gene responsible for familial hypocalciuric hypercalcemia maps to chromosome 3q in four unrelated families. *Nat Genet* **1**, 295-300 (1992).
112. Heath, H.d., Jackson, C.E., Otterud, B. & Leppert, M.F. Genetic linkage analysis in familial benign (hypocalciuric) hypercalcemia: evidence for locus heterogeneity. *Am J Hum Genet* **53**, 193-200 (1993).
113. Marx, S.J. *et al.* The hypocalciuric or benign variant of familial hypercalcemia: clinical and biochemical features in fifteen kindreds. *Medicine (Baltimore)* **60**, 397-412 (1981).
114. Marx, S.J., Fraser, D. & Rapoport, A. Familial hypocalciuric hypercalcemia. Mild expression of the gene in heterozygotes and severe expression in homozygotes. *Am J Med* **78**, 15-22 (1985).
115. 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).
116. Risch, N. Assessing the role of HLA-linked and unlinked determinants of disease. *Am J Hum Genet* **40**, 1-14 (1987).
117. Thomson, G. HLA disease associations: models for the study of complex human genetic disorders. *Crit Rev Clin Lab Sci* **32**, 183-219 (1995).
118. Lander, E. & Schork, N. Genetic dissection of complex traits. *Science* **265**, 2037-2048 (1994).
119. Morton, N.E. Sequential tests for the detection of linkage. *Am J Hum Genet* **7**, 277-318 (1955).
120. Haseman, J. & Elston, R. The investigation of linkage between a quantitative trait and a marker locus. *Behav Genet* **2**, 3-19 (1972).
121. Suarez, B.K., Rice, J. & Reich, T. The generalized sib pair IBD distribution: its use in the detection of linkage. *Ann Hum Genet* **42**, 87-94 (1978).
122. Blackwelder, W.C. & Elston, R.C. A comparison of sib-pair linkage tests for disease susceptibility loci. *Genet Epidemiol* **2**, 85-97 (1985).

123. Pearce, S.H. *et al.* A familial syndrome of hypocalcemia with hypercalciuria due to mutations in the calcium-sensing receptor. *New Engl J Med* **335**, 1115-1122 (1996).
124. 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**, 6337-42 (1998).
125. 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).
126. Risch, N. Linkage strategies for genetically complex traits. II. The power of the affected relative pairs. *Am J Hum Genet* **46**, 229-241 (1990).
127. 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**, 242-53 (1990).
128. 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).
129. Spielman, R., McGinnis, R. & Ewens, W. Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin dependent diabetes mellitus (IDDM). *Am J Human Genet* **52**, 506-516 (1993).
130. Yaouanq, J. *et al.* Evidence for linkage disequilibrium between HLA-DRB1 gene and multiple sclerosis. The French Research Group on Genetic Susceptibility to MS [letter; comment]. *Science* **276**, 664-5 (1997).
131. 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**, 8375-8 (1999).
132. 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**, 629-41 (1991).
133. 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).

134. Bianchi, G. *et al.* Abnormal red-cell calcium pump in patients with idiopathic hypercalciuria. *N Engl J Med* **319**, 897-901 (1988).
135. Meij, I.C. *et al.* Dominant isolated renal magnesium loss is caused by misrouting of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase gamma-subunit [In Process Citation]. *Nat Genet* **26**, 265-6 (2000).

## Appendices:

### *Appendice I: Exclusion Mapping of Crystallization Inhibitor Genes in Calcium Urolithiasis*

Jean-François Cailhier, MD, Martin Petrucci, BSc, Marie-Lucie Trouvé, RN, Luc Valiquette, MD, Gérald Guay, MD, Denis Ouimet, MD, Alain Bonnardeaux, MD-PhD.

Soumis au Journal of Urology en novembre 2000

#### ABSTRACT

We used a candidate gene approach to determine whether 3 genes coding for major 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 the exclusion of 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, for affected sib-pairs concordant for urine calcium excretion below the 25<sup>th</sup> and 50<sup>th</sup> percentiles, respectively. We conclude that loci encoding 3 major crystallization inhibitors are unlikely to be involved in 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 (43)) including uromodulin (Tamm-Horsfall protein, THP) (9), osteopontin (1, 39) 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 (42). 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, and this has been the focus of numerous studies. Low excretion of urinary citrate, a non-protein inhibitor of both crystallization (reviewed in (26)) and adhesion of crystals to renal epithelial cells (19), contributes to stone formation in primary renal tubular acidosis. In recurrent stone formers with no apparent biochemical abnormality conducive to stone formation, some (15, 24, 32, 41), but not all studies, (29, 34) 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 (23, 44), and specific biochemical anomalies of inhibitors have been described for nephrocalcin (10, 21, 22), osteopontin (3) as well as THP (7, 11-13, 33, 36). Genes coding for these proteins have been cloned, including nephrocalcin, which is probably encoded by the osteocalcin-related gene or ORG (6).

To determine whether genetic variation of major crystallization inhibitors, namely THP, osteopontin and nephrocalcin cause simple and/or recurrent stone formation,

we performed 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 (37, 38). 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 (intravenous pyelogram, abdominal X-ray). Subjects with uric acid stones on crystallographic/biochemical analyses were not considered affected. Urine sampling consisted of a single 24-hour urine collection under a free diet, as well as a calcium-loading test (25). Urine samples with 24-h creatinine excretion outside a 20% limit of that predicted by the Cockcroft-Gault formula (4) were excluded. Standard biochemical analyses on urine and serum samples were performed, as previously described (37).

We used 3 binary phenotypes for the study: 1) passage of a stone, irrespective of urine calcium excretion; 2) stone passage with urinary calcium excretion below the 50<sup>th</sup> percentile (T50) of the siblings sampled; and 3) stone passage with urinary calcium excretion below the 25<sup>th</sup> percentile (T25). Thus, the T50 group includes the T25 group. 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, with corresponding values of 0.242 and 0.365 mmol/mmol for traits T25 and T50, respectively. 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 (THP), 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. We used the Whitehead Institute/MIT server (<http://www.genome.wi.mit.edu>) to map the three genes and selected 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 (8, 20) to construct a genetic map for each locus. Genetic linkage analysis was performed with the MAPMAKER/SIBS program version 2.1 (16) 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, 1q21.2-21.3 and 4q21.1-q21.21, respectively, in accordance with previously published data (28, 30, 45). The genetic distances and order for multiallelic markers for ORG were D1S2696-D1S305-D1S263 at 7.3 cM and 14.0 cM. For OPN, order was D4S2922-D4S1534-D4S423 with distances of 9.9 cM and 7.4 cM. For uromodulin, order was D16S3103-D16S3041-D16S420 with distances of 6.5 cM and 9.8 cM (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, 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, 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, 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 major crystallization inhibitors to determine whether genetic variation is likely to contribute to urolithiasis. These genes have been previously the focus of many studies that have suggested a potential role in stone formation. Using the entire group of affected sibs as well as subgroups with below average urine calcium excretion, we have demonstrated that none of these genes are likely to contribute to stone formation in our population. 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.

Our results suggest that if genetic variation at loci coding for crystallization inhibitors is implicated in stone formation, it is unlikely to result from defects in THP, osteopontin or nephrocalcin. There are additional crystallization inhibitors such as prothrombin fragment 1 (40) and uronic acid-rich protein (bikunin) (2) that have not been investigated in the present study. Although we have restricted analyses to candidate genes for which phenotype data suggested potential implication (3, 7, 10-13, 21, 22, 33, 36), 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 (17, 18), perturbation of crystal removal from the lumen by renal cells (14) or inorganic crystallization inhibitors (26). 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 (31). 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 refute this hypothesis. Other susceptibility genes for hypercalciuric stone formation include *CLCN5*, as it was

found that a subject with apparent idiopathic hypercalciuria but without low molecular weight proteinuria carried a mutation in the gene (35). 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 needs confirmation (38). Our previous studies have excluded the calcium sensing receptor (27) and CYP1 $\alpha$  (37), the rate-limiting enzyme in the synthesis of 1,25 vitamin D<sub>3</sub>. Ultimately, genome-wide screens and candidate gene analyses will identify susceptibility loci involved in urolithiasis and idiopathic hypercalciuria, but this will require larger cohorts of densely affected families.

**Table 1.** Pedigrees and Sibships with Calcium Urolithiasis

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

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

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

**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	10 <sup>-5</sup>	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	0.02	0.76 ± 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	0.07	0.515 ± 0.617	0.63
(mmol/mmol)	147	207	108		126	

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 25<sup>th</sup> percentile among all siblings.

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

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

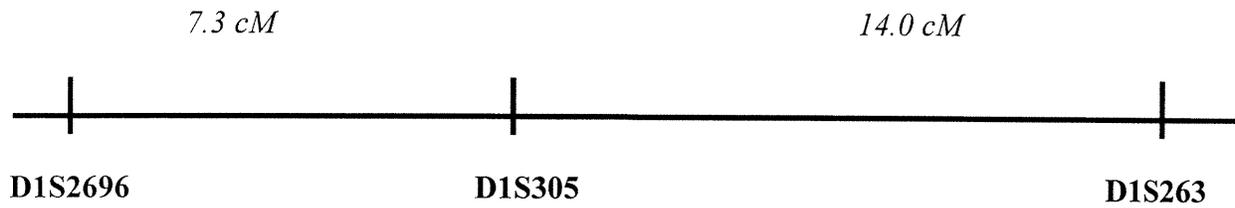
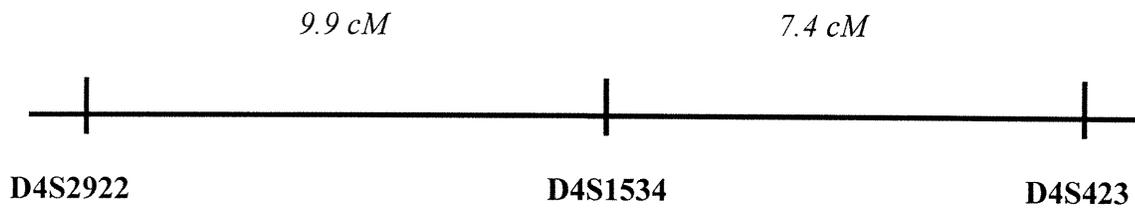
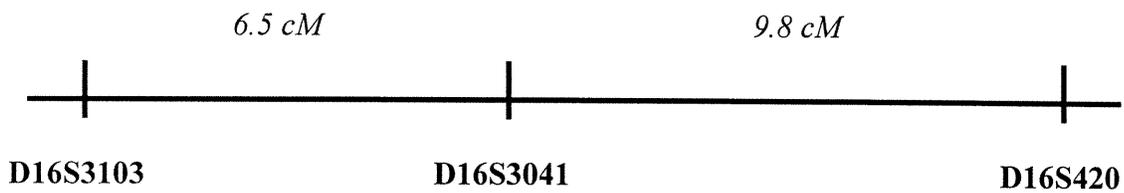
All values mean ± SD.

All P values versus unaffected group.

## FIGURE LEGENDS

### **Figure 1.**

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 1. Markers and Genetic Distances****Chromosome 1: Osteocalcin-related gene (ORG)****Chromosome 4: Osteopontin gene (OPN)****Chromosome 16: Uromodulin (THP)**

## REFERENCES

1. Asplin, J. R., D. Arsenault, J. H. Parks, F. L. Coe, and J. R. Hoyer. Contribution of human uropontin to inhibition of calcium oxalate crystallization. *Kidney Int* 53: 194-9, 1998.
2. Atmani, F., J. Mizon, and S. R. Khan. Identification of uronic-acid-rich protein as urinary bikunin, the light chain of inter-alpha-inhibitor. *Eur J Biochem* 236: 984-90, 1996.
3. Bautista, D., J. Denstedt, A. Chambers, and J. Harris. Low-molecular-weight variants of osteopontin generated by serine proteinases in urine of patients with kidney stones. *J Cell Biochem* 61: 402-409, 1996.
4. Cockcroft, D. W., and M. H. Gault. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron* 16: 31-41, 1976.
5. Coe, F. L., Y. Nakagawa, J. Asplin, and J. H. Parks. Role of nephrocalcin in inhibition of calcium oxalate crystallization and nephrolithiasis. *Miner Electrolyte Metab* 20: 378-84, 1994.
6. Desbois, C., D. A. Hogue, and G. Karsenty. The mouse osteocalcin gene cluster contains three genes with two separate spatial and temporal patterns of expression. *J Biol Chem* 269: 1183-90, 1994.
7. Ganter, K., D. Bongartz, and A. Hesse. Tamm-Horsfall protein excretion and its relation to citrate in urine of stone-forming patients. *Urology* 53: 492-5, 1999.
8. Green, P. Construction and comparison of chromosome 21 radiation hybrid and linkage maps using CRI-MAP. *Cytogenet Cell Genet* 59: 122-4, 1992.
9. Hess, B. Tamm-Horsfall glycoprotein and calcium nephrolithiasis. *Miner Electrolyte Metab* 20: 393-8, 1994.
10. Hess, B., Y. Nakagawa, and F. L. Coe. Inhibition of calcium oxalate monohydrate crystal aggregation by urine proteins. *Am J Physiol* 257: F99-106, 1989.

11. Hess, B., Y. Nakagawa, J. Parks, and F. Coe. Molecular abnormality in Tamm-Horsfall glycoprotein in calcium oxalate nephrolithiasis. *Am J Physiol* 260: F569-F578, 1991.
12. Hess, B., L. Zipperle, and P. Jaeger. Citrate and calcium effects on Tamm-Horsfall glycoprotein as a modifier of calcium oxalate crystal aggregation. *Am J Physiol* 265: F784-91, 1993.
13. Jefferson, A., T. M. Reynolds, A. Elves, and A. S. Wierzbicki. Patients with recurrent renal stones have a physico-chemically altered urinary Tamm-Horsfall glycoprotein profile. *Ann Clin Biochem* 33: 540-4, 1996.
14. Khan, S. R., and P. A. Glenton. Deposition of calcium phosphate and calcium oxalate crystals in the kidneys. *J Urol* 153: 811-7, 1995.
15. Kok, D. J., S. E. Papapoulos, and O. L. Bijvoet. Low inhibition of crystal agglomeration and citrate excretion in recurrent calcium oxalate stone formers. *Contrib Nephrol* 58: 73-7, 1987.
16. Kruglyak, L., and E. Lander. Complete multipoint sib-pair analysis of qualitative and quantitative traits. *Am J Hum Genet* 57: 439-454, 1995.
17. Lieske, J. C., and S. Deganello. Nucleation, adhesion, and internalization of calcium-containing urinary crystals by renal cells. *J Am Soc Nephrol* 10: S422-9, 1999.
18. Lieske, J. C., R. Leonard, H. Swift, and F. G. Toback. Adhesion of calcium oxalate monohydrate crystals to anionic sites on the surface of renal epithelial cells. *Am J Physiol* 270: F192-9, 1996.
19. Lieske, J. C., R. Leonard, and F. G. Toback. Adhesion of calcium oxalate monohydrate crystals to renal epithelial cells is inhibited by specific anions. *Am J Physiol* 268: F604-12, 1995.
20. Matisse, T. C., M. Perlin, and A. Chakravarti. Automated construction of genetic linkage maps using an expert system (MultiMap): a human genome linkage map. *Nat Genet* 6: 384-90, 1994.
21. Nakagawa, Y., V. Abram, J. H. Parks, H. S. Lau, J. K. Kawooya, and F. L. Coe. Urine glycoprotein crystal growth inhibitors. Evidence for a molecular

- abnormality in calcium oxalate nephrolithiasis. *J Clin Invest* 76: 1455-62, 1985.
22. Nakagawa, Y., M. Ahmed, S. L. Hall, S. Deganello, and F. L. Coe. 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: 1782-7, 1987.
  23. Nishio, S., M. Hatanaka, H. Takeda, T. Iseda, H. Iwata, and M. Yokoyama. Analysis of urinary concentrations of calcium phosphate crystal-associated proteins: alpha2-HS-glycoprotein, prothrombin F1, and osteopontin. *J Am Soc Nephrol* 10: S394-6, 1999.
  24. Pak, C., and K. Holt. Nucleation and growth of brushite and calcium oxalate in urine of stone formers. *Metabolism* 25: 665-673, 1976.
  25. Pak, C., R. Kaplan, H. Bone, J. Townsend, and O. Waters. A simple test for the diagnosis of absorptive, resorptive and renal hypercalciurias. *New Engl J Med* 292: 497-500, 1975.
  26. Pak, C. Y. Citrate and renal calculi: an update. *Miner Electrolyte Metab* 20: 371-7, 1994.
  27. Petrucci, M., P. Scott, M.-L. Trouve, G. Guay, L. Valiquette, D. Ouimet, and A. Bonnardeaux. Evaluation of the Calcium Sensing Receptor Gene in Idiopathic Hypercalciuria and Calcium Nephrolithiasis. *Kidney Int* in press, 2000.
  28. Pook, M. A., S. Jeremiah, S. J. Scheinman, S. Povey, and R. V. Thakker. Localization of the Tamm-Horsfall glycoprotein (uromodulin) gene to chromosome 16p12.3-16p13.11. *Ann Hum Genet* 57: 285-90, 1993.
  29. Porile, J., J. Asplin, J. Parks, Y. Nakagawa, and F. Coe. Normal calcium oxalate crystal growth inhibition in severe calcium oxalate nephrolithiasis. *J Am Soc Nephrol* 7: 602-607, 1996.

30. Puchacz, E., J. B. Lian, G. S. Stein, J. Wozney, K. Huebner, and C. Croce. Chromosomal localization of the human osteocalcin gene. *Endocrinology* 124: 2648-50, 1989.
31. Reed, B. Y., H. J. Heller, W. L. Gitomer, and C. Y. Pak. Mapping a gene defect in absorptive hypercalciuria to chromosome 1q23.3-q24. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 3907-13, 1999.
32. Robertson, W., and M. Peacock. Calcium oxalate crystalluria and inhibitors of crystallization in recurrent renal stone formers. *Clin Sci (Lond)* 43: 499-506, 1972.
33. Romero, M. C., S. Nocera, and A. B. Nesse. Decreased Tamm-Horsfall protein in lithiasic patients. *Clin Biochem* 30: 63-7, 1997.
34. Ryall, R., C. Hibberd, B. Mazzachi, and V. Marshall. Inhibitory activity of whole urine: a comparison of urines from stone formers and healthy subjects. *Clin Chim Acta* 154: 59-67, 1986.
35. Scheinman, S. J., J. P. Cox, S. E. Lloyd, S. H. Pearce, P. V. Salenger, R. R. Hoopes, D. A. Bushinsky, O. Wrong, J. R. Asplin, C. B. Langman, A. G. Norden, and R. V. Thakker. Isolated hypercalciuria with mutation in CLCN5: relevance to idiopathic hypercalciuria. *Kidney Int* 57: 232-9, 2000.
36. Schnierle, P., F. Hering, and H. Seiler. Isoelectric focusing of Tamm-Horsfall glycoproteins: a simple tool for recognizing recurrent calcium oxalate renal stone formers. *Urol Res* 24: 79-82, 1996.
37. Scott, P., D. Ouimet, Y. Proulx, M. L. Trouve, G. Guay, B. Gagnon, L. Valiquette, and A. Bonnardeaux. The 1 alpha-hydroxylase locus is not linked to calcium stone formation or calciuric phenotypes in French-Canadian families. *J Am Soc Nephrol* 9: 425-32, 1998.
38. Scott, P., D. Ouimet, L. Valiquette, G. Guay, Y. Proulx, M. L. Trouve, B. Gagnon, and A. Bonnardeaux. Suggestive evidence for a susceptibility gene near the vitamin D receptor locus in idiopathic calcium stone formation [In Process Citation]. *J Am Soc Nephrol* 10: 1007-13, 1999.

39. Shiraga, H., W. Min, W. J. VanDusen, M. D. Clayman, D. Miner, C. H. Terrell, J. R. Sherbotie, J. W. Foreman, C. Przysiecki, E. G. Neilson, and 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: 426-30, 1992.
40. Stapleton, A. M., C. J. Dawson, P. K. Grover, A. Hohmann, R. Comacchio, V. Boswarva, Y. Tang, and R. L. Ryall. Further evidence linking urolithiasis and blood coagulation: urinary prothrombin fragment 1 is present in stone matrix. *Kidney Int* 49: 880-8, 1996.
41. Tiselius, H. G., H. Bek-Jensen, A. M. Fornander, and M. A. Nilsson. Crystallization properties in urine from calcium oxalate stone formers. *J Urol* 154: 940-6, 1995.
42. Wesson, J. A., E. M. Worcester, J. H. Wiessner, N. S. Mandel, and J. G. Kleinman. Control of calcium oxalate crystal structure and cell adherence by urinary macromolecules. *Kidney Int* 53: 952-7, 1998.
43. Worcester, E. M. Inhibitors of stone formation. *Semin Nephrol* 16: 474-86, 1996.
44. Yasui, T., K. Fujita, S. Sasaki, M. Sato, M. Sugimoto, S. Hirota, Y. Kitamura, S. Nomura, and K. Kohri. Expression of bone matrix proteins in urolithiasis model rats. *Urol Res* 27: 255-61, 1999.
45. Young, M. F., J. M. Kerr, J. D. Termine, U. M. Wewer, M. G. Wang, O. W. McBride, and L. W. Fisher. cDNA cloning, mRNA distribution and heterogeneity, chromosomal location, and RFLP analysis of human osteopontin (OPN). *Genomics* 7: 491-502, 1990.

## Remerciements:

Je tiens à remercier sincèrement mon directeur scientifique, le Dr Alain Bonnardeaux, de m'avoir permis d'entreprendre ce stage de maîtrise 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 Yanick Proulx pour son assistances techniques. Je ne pourrais passer sous silence les nombreuses discussions animées avec mon collègue étudiant Patrick Scott.

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.

Finalement, un merci tous spécial à la CIBPA pour le support financier durant les deux années de ma formation aux études supérieures.