

Université de Montréal

**Rôle des fragments carboxyl-terminaux de la parathormone
dans l'action biologique de l'hormone**

Par

Loan Nguyen

Département de médecine

Faculté de médecine

Thèse présentée à la faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Philosophiae Doctor (Ph.D)

en sciences biomédicales

Novembre 2001

© Nguyen Loan , 2001



W
4
J58
2002
v. 079

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée

Rôle des fragments carboxyl-terminaux de la parathormone
dans l'action biologique de l'hormone.

Présentée par

Loan Nguyen

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Marielle Gascon-Barré
Président-rapporteur

Dr Pierre D'Amour
Directeur de recherche

Dr Daniel Lajeunesse
Examineur interne

Dr Richard Kremer
Examineur externe

Dr Michèle G. Brunette
Représentant du doyen de la FES

Thèse acceptée le

17 / 05 / 02

À mon directeur de recherche, Dr Pierre D'Amour

Pour les grands principes de la recherche qu'il m'a inculqués, et l'intérêt
qu'il porte à ma formation qui m'a permis de réaliser ce projet.

Ma respectueuse reconnaissance

SOMMAIRE

Même si l'existence de multiples formes de PTH en circulation est connue de longue date, la nature de cette immunohétérogénéité n'a cessé de changer avec l'ajout de nouveaux dosages de PTH. Ainsi l'ajout du dosage de PTH intacte (I-PTH) dans les années 80-90 permettait pour la première fois de mesurer directement la forme biologiquement active de la PTH, la PTH(1-84). Ceci s'est avéré particulièrement utile en insuffisance rénale où les fragments carboxyl-terminaux de la PTH s'accumulaient. Plusieurs études avaient démontré que les antigènes utilisés dans les dosages de I-PTH réagissaient avec la PTH(1-84) mais pas avec les fragments synthétiques PTH(1-34), PTH(39-84), PTH(53-84). Cependant aucune de ces études n'avait regardé le profil HPLC de la PTH détectée en circulation.

En 1993, le laboratoire du Dr P. D'Amour a démontré pour la première fois que le dosage de I-PTH de *Nichol's Institute* réagissait avec une forme moléculaire de PTH autre que la PTH(1-84). Par la suite le même laboratoire a démontré que cette forme moléculaire de PTH, maintenant appelée *non-(1-84)PTH*, s'accumulait en insuffisance rénale pour constituer 40-50 % de la PTH intacte mesurée alors qu'elle représentait seulement 15-20% chez l'individu normal (Brossard JH 1993). La disponibilité commerciale de la hPTH(7-84) a permis de démontrer que cette dernière se comportait comme la *non-(1-84)PTH* dans les dosages de I-PTH et migrait à proximité de la *non-(1-84)PTH* sur profil HPLC.

Dans la première partie de nos travaux, nous avons voulu connaître l'origine de cette nouvelle forme moléculaire de PTH. Nous avons voulu savoir si elle originait du métabolisme périphérique de la PTH(1-84) et si elle était aussi sécrétée par les parathyroïdes. Par la suite, nous avons voulu savoir si la hPTH(7-84), un prototype de

non-(1-84)PTH et d'autres fragments carboxyterminaux synthétiques représentatifs de ceux retrouvés en circulation, PTH(39-84) et PTH(53-84), pouvaient influencer l'activité biologique de la PTH(1-84) *in-vivo* telle que nous la connaissons.

Le rôle du métabolisme périphérique de la PTH(1-84) dans la génération de la *non*-(1-84)PTH a été étudié chez le rat normal (N), et l'influence de l'insuffisance rénale sur sa concentration a été étudiée chez le rat néphrectomisé (NPX). Expérimentalement, la hPTH(1-84) a été injectée par voie intraveineuse chez les animaux N et NPX et la disparition de la PTH injectée a été suivie au moyen d'un dosage de I-PTH sur prélèvements sériés dans le temps. Par la suite, la I-PTH mesurée à chaque temps a été fractionnée par HPLC et les formes moléculaires identifiées ont été quantifiées par planimétrie. La disparition de la hPTH(1-84) injectée se faisait de façon biexponentielle. Ces exponentielles s'expliquaient par la clairance de la hPTH(1-84) injectée ainsi que par la formation et la clairance de la *non*-(1-84)PTH aussi identifiée. La demi-vie ($t_{1/2}$) de la première exponentielle était similaire dans les 2 groupes, tandis que la deuxième était plus longue chez les rats NPX. Il en résultait une plus grande quantité de hPTH(1-84) sous la courbe à tous les temps chez les rats NPX. L'apparition de la forme *non*-(1-84) était maximale à 8 minutes dans les 2 groupes avec des niveaux plus élevés chez les NPX. La surface totale sous la courbe de *non*-(1-84)PTH, (production - clairance) était supérieure chez les rats NPX comparés aux normaux.

L'origine glandulaire de la *non*-(1-84)PTH a été étudiée au moyen de cellules parathyroïdiennes isolées à partir d'adénomes humains. L'étude de sécrétion de la PTH a été effectuée à la calcémie du patient et les formes moléculaires de PTH sécrétées ont été

séparées par HPLC et les fractions obtenues ont été dosées. Les profils obtenus ont été comparés aux profils obtenus avec le sérum de patients souffrant de la même maladie. Les résultats ont démontré que la forme *non*-(1-84)PTH était sécrétée par tous les adénomes étudiés. De plus, le profil des formes moléculaires sécrétées s'est avéré similaire à celui des formes moléculaires obtenues en circulation. Quantitativement, la *non*-(1-84)PTH représentait $21.1 \pm 3.9\%$ de l'I-PTH sécrétée, et $32.5 \pm 1.3\%$ de l'I-PTH circulante.

Cette première partie de notre travail a donc démontré que la *non*(1-84)PTH était générée par le métabolisme périphérique de la hPTH(1-84) et aussi sécrétée par les cellules parathyroïdiennes. L'insuffisance rénale, en augmentant la disponibilité du substrat et en diminuant la clairance de la *non*-(1-84)PTH, doublait les taux circulants de *non*-(1-84)PTH.

Dans la deuxième partie de notre projet, nous avons étudié l'influence des fragments carboxyl-terminaux de la PTH, représentatifs de ceux trouvés en circulation, sur l'activité biologique de la PTH *in-vivo*. L'influence de ces fragments sur la réponse calcique à la PTH a été étudiée chez le rat anesthésié et thyroparathyroïdectomisé (TPTX). Après avoir développé une hypocalcémie aiguë, ces rats sont infusés par voie intraveineuse avec de la hPTH(1-34) ou de la hPTH(1-84), avec ou sans fragments carboxyl-terminaux tels que la hPTH(7-84), hPTH(39-84), hPTH(53-84), et ce à différentes concentrations. Les résultats démontrent que la hPTH(7-84) seule a un effet hypocalcémiant au-delà de l'hypocalcémie induite par la parathyroïdectomie. La hPTH(1-84) et la hPTH(1-34) sont capables de corriger l'hypocalcémie secondaire à la parathyroïdectomie. L'infusion de hPTH(7-84) avec la hPTH(1-84) ou hPTH(1-34), à dix fois la concentration de ces dernières inhibe la réponse calcémique à ces préparations. La calcémie observée peut-être considérée comme

la somme de l'effet positif de la hPTH(1-84) ou de la hPTH(1-34) et de l'effet négatif de la hPTH(7-84). L'inhibition observée est directement proportionnelle à la dose de hPTH(7-84) infusée. Les fragments carboxyl-terminaux plus petits exercent un rôle complémentaire à celui de la hPTH(7-84) utilisée à moindres concentrations. Ces résultats démontrent pour la première fois que les fragments carboxylterminaux peuvent modifier la calcémie *in-vivo*. De plus, la phosphatémie est réduite par l'infusion de la hPTH(1-84) ou de hPTH(1-34) seule mais augmentée suite à l'addition de hPTH(7-84) dans l'infusat. Parallèlement, la phosphaturie est réduite chez les animaux TPTX et revient à la normale avec l'infusion de hPTH(1-84) ou de hPTH(1-34). L'addition de la hPTH(7-84) semble avoir un effet inhibiteur sur la phosphaturie qui n'est pas statistiquement concluant.

L'étude du système de récepteur impliqué dans l'effet hypocalcémiant de la hPTH(7-84) a été effectuée sur des cellules ostéoblastiques de rat (ROS 17/2.8) utilisant la ^{125}I -[Nle^{8,18},Tyr³⁴]hPTH(1-34) comme traceur spécifique du récepteur classique PTH/PTHrP, et la ^{125}I -[Tyr³⁴]hPTH(19-84) comme traceur spécifique du récepteur carboxyl-terminal (C-PTH) de la PTH. Les résultats obtenus suggèrent que l'effet hypocalcémiant de la hPTH(7-84) est médié par le récepteur C-PTH. En effet, seulement la hPTH(1-84) était capable de déplacer les traceurs des deux récepteurs, alors que la hPTH(7-84) déplaçait uniquement le traceur du récepteur C-PTH, et la hPTH(1-34) celui du récepteur PTH/PTHrP. La voie de signalisation a aussi été étudiée. L'interaction de la hPTH(1-84) et de la hPTH(1-34) avec le récepteur PTH/PTHrP des cellules ROS 17/2.8 augmentait la production d'AMPC. La hPTH(7-84) n'avait aucun effet sur la production d'AMPC dans ce système. Donc, l'activité biologique de la hPTH(7-84) serait médiée par

le récepteur C-PTH et le messenger secondaire serait autre que l'AMPc. L'action de la hPTH(7-84) pourrait s'exercer au niveau de l'ostéolyse ostéocytaire qui est rapide.

Les résultats de cette étude sur les effets des fragments carboxyl-terminaux sur la réponse calcémique à la PTH(1-84) ou hPTH(1-34), démontrent pour la première fois un rôle des fragments carboxyl-terminaux dans la biologie classique de la PTH. La modulation par la hPTH(7-84) de la réponse calcique à la PTH rend plus plausible l'hypothèse d'une interaction des formes moléculaires circulantes de la PTH avec différents récepteurs pour expliquer les effets biologiques de l'hormone. Ceci représente une nouvelle vision de l'hétérogénéité de la PTH, de la biologie de la PTH et ouvre de nouvelles voies d'investigation sur le rôle des fragments carboxyl-terminaux et sur le récepteur C-PTH.

Mots clés : PTH, fragments carboxylterminaux de la PTH, récepteur C-PTH,
métabolisme périphérique, insuffisance rénale.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE.....	i
LISTE DES FIGURES	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xiii
INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
CHAPITRE 1. BIOSYNTHÈSE, SÉCRÉTION ET FORMES CIRCULANTES DE PARATHORMONE		
I.	BIOSYNTHÈSE DE LA PTH ET SON CONTRÔLE	
	I.1 Le gène et sa protéine.....	9
	I.2 Régulation de l'expression du gène	11
	I.3 Régulation post-translationnelle.....	16
II.	SÉCRÉTION DE LA PTH	
	II.1 Agents sécrétagogues et mécanismes.....	19
	II.2 Produits de sécrétion des parathyroïdes	22
III.	LA PARATHORMONE CIRCULANTE	
	III.1 Description.....	23
	III.2 Régulation aiguë et chronique par la calcémie	24

IV.	MÉTABOLISME PÉRIPHÉRIQUE DE LA PARATHORMONE CIRCULANTE	
IV.1	Description générale	29
IV.2	Rôle du foie, des reins et autres tissus	30
IV.3	Régulation calcique.....	34
V.	SIGNIFICATION DE L'IMMUNOHÉTÉROGÉNÉITÉ DE LA PARATHORMONE CIRCULANTE	
V.1	Processus d'activation biologique	35
V.2	Processus d'inactivation biologique	36
V.3	Parathormone comme polyhormone.....	37

CHAPITRE 2 ACTIVITÉ BIOLOGIQUE DE LA PARATHORMONE

I.	LE RÉCEPTEUR CLASSIQUE PTH/PTHrP	
I.1	Seconds messagers.....	45
I.2	Interaction structurale avec la parathormone	48
I.3	Actions principales	49
II	LE RÉCEPTEUR CARBOXYL-TERMINAL DE LA PARATHORMONE	
II.1	Description.....	51
II.2	Interaction structurale avec la parathormone	52

CHAPITRE 3 ÉTUDES EXPÉRIMENTALES

I.1	Prémisses	59
I.2	Hypothèses.....	60
II	RÉSULTATS	
II.1	Introduction.....	62
II.2	Article 1 : Origin of parathyroid hormone (PTH) fragments detected by intact-PTH assays.....	64
II.3	Commentaire.....	92
II.4	Introduction.....	93
II.5	Article 2 : Synthetic carboxyl-terminal fragments of PTH decrease ionized calcium concentration in rat by acting on a receptor different from the PTH/PTHrP receptor	95
II.6	Commentaire.....	128
II.7	Article 3 : PTH metabolites in renal failure : Bioactivity and clinic implications	130
III	DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION.....	159
IV	BIBLIOGRAPHIE	167

LISTE DES FIGURES

- Figure 1: **Régulation de la calcémie chez l'individu normal.** 4
- Figure 2: **Structure primaire de la préproPTH.**
Tiré de: Justin Silver. Regulation of parathyroid hormone synthesis and secretion. Disorders of bone and mineral metabolism. Fredric L. Coe and Murray J. Favus. Raven Press, Chap 4: 84. 1992. 10
- Figure 3: **Régulation de la transcription. Rôle de la 1,25(OH)₂D₃.**
Tiré de: Justin Silver. Regulation of parathyroid hormone synthesis and secretion. Disorders of bone and mineral metabolism. Fredric L. Coe and Murray J. Favus. Raven Press, Chap 4: 101. 1992. 13
- Figure 4 : **Régulation de la parathormone synthétisée.**
Tiré de: Disorders of bone and mineral metabolism. Fredric L. Coe and Murray J. Favus. Raven Press, Chap 5:109. 1992 18
- Figure 5 : **Mécanisme de sécrétion. Rôle du récepteur à calcium.**
Tiré de: Justin Silver. Regulation of parathyroid hormone synthesis and secretion. Disorders of bone and mineral metabolism. Fredric L. Coe and

- Murray J. Favus. Raven Press, Chap 4: 98. 1992. 21
- Figure 6 : **La Parathormone intacte circulante. Régulation aiguë par la calcémie.**
- Tiré de : Brossard JH, Cloutier M, Roy L, Lepage R, Gascon-Barré M and D'Amour P. Accumulation of a non-(1-84) molecular form of parathyroid hormone (PTH) detected by intact PTH assay in renal failure: importance in the interpretation of PTH values. J Clin Endocrinol Metab 81:3923-3929. 1996 26
- Figure 7 : **Les fragments carboxyl-terminaux circulants de parathormone. Régulation aiguë par la calcémie**
- Tiré de : Brossard JH, Cloutier M, Roy L, Lepage R, Gascon-Barré M and D'Amour P. Accumulation of a non-(1-84) molecular form of parathyroid hormone (PTH) detected by intact PTH assay in renal failure: importance in the interpretation of PTH values. J Clin Endocrinol Metab 81:3923-3929. 1996 27
- Figure 8: **Hétérogénéité de la PTH circulante. Modulation de la régulation calcique.....28**

Figure 9 : Effets biologiques de la PTH. Interaction des formes moléculaires circulantes avec différents récepteurs..... 39

Figure 10: Activité biologique de différentes régions de la PTH et les récepteurs impliqués.

Tiré de: Lawrence E. Mallette. Parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein as polyhormones. The Parathyroids. Basic and Clinical Concepts. Bilezikian JP, Marcus R, Levine MA Edts. Raven Press, Chap 12:177.1994..... 54

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN:	acide désoxyribonucléique
ARNm:	acide ribonucléique messenger
kDa:	kilodalton
Vit D:	vitamine D (calciférol)
1,25(OH) ₂ D ₃ :	1,25-dihydroxyvitamine D ₃
OK:	cellules tubulaire rénales d'opossum
ROS 17/2.8:	cellules ostéoblastiques de rat
Cos-7:	cellules rénales de singe modifiées
Osteoblast-like:	ostéosarcome
NPX:	néphrectomie
PTX:	parathyroïdectomie
TPTX:	thyroparathyroïdectomie
PTH:	parathormone
I-PTH:	parathormone intacte
C-PTH:	parathormone carboxyl-terminale
b-PTH:	parathormone bovine
h-PTH:	parathormone humaine
PTHrP:	peptide apparenté à la parathormone
RIA:	dosage radioimmunologique
IRMA:	dosage immunoradiométrique
P:	phosphate
Ca ⁺⁺ :	Calcium ionisé

Ca: calcium
CaR: récepteur à calcium
RE: réticulum endoplasmique

INTRODUCTION GÉNÉRALE

LE CALCIUM ET LA CALCÉMIE

Le calcium (Ca) est un élément qui joue un rôle clé dans plusieurs processus biologiques de l'organisme. Sa concentration dans le sérum est maintenue de façon étroite entre 2.2 et 2.55mM. Le Ca en circulation représente 0.1% du Ca total de l'organisme et existe sous 3 formes: lié aux protéines (40%), ionisé (50%) et chélaté par certains anions (10%). Seul le Ca ionisé (Ca^{++}), dont les variations reflètent mieux l'état du statut calcique que celles du Ca total, est important pour influencer les processus biologiques de l'organisme.

Pour assurer le bon fonctionnement de l'ensemble de l'organisme, la calcémie doit être maintenue à un niveau presque constant. Le maintien de la calcémie nécessite des interactions complexes entre trois hormones clés, la parathormone (PTH), la vitamine D, et la calcitonine, et aussi trois organes, l'os, le rein, et l'intestin.

L'HOMÉOSTASIE CALCIQUE

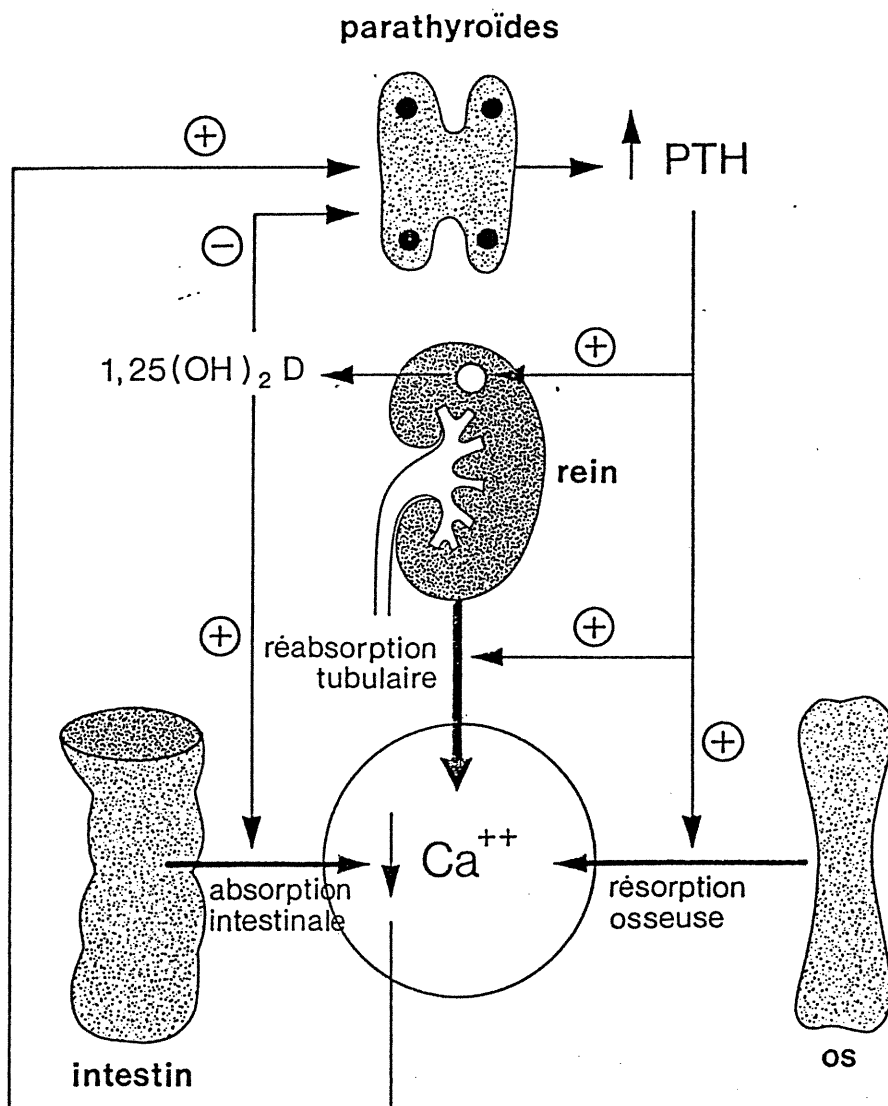
La parathormone

Les glandes parathyroïdes représentent le système endocrinien principal dans le maintien de l'homéostasie calcique, et ce grâce au récepteur à calcium (CaR), localisé sur la membrane des cellules principales des parathyroïdes.

Ces CaR permettent aux cellules de détecter et de répondre rapidement à une baisse ou à une élévation de la calcémie en sécrétant plus ou moins de PTH respectivement. Classiquement, la PTH exerce ses effets biologiques en se liant à un récepteur spécifique, le récepteur PTH/PTHrP, couplé à une protéine G, et localisé sur les membranes des cellules des tissus cibles. L'activation de ce récepteur permet entre autre aux cellules cibles de mobiliser le Ca et de normaliser la calcémie. Les effets principaux de la PTH dans la régulation de la calcémie sont la stimulation de la résorption osseuse par les ostéoclastes, la stimulation de la réabsorption tubulaire distale du Ca et, indirectement, l'augmentation de l'absorption intestinale du Ca via la synthèse accrue du métabolite actif de la vitamine D la 1,25 dihydroxyvitamine D (1,25(OH)₂D). L'élévation de calcémie va à son tour inhiber la sécrétion de la PTH. Cette boucle de contrôle assure un maintien des taux de calcémie en dedans de limites étroites avec peu de variations quotidiennes (**fig 1**).

Figure 1: Régulation de la calcémie chez l'individu normal.

Hypercalcémie



La calcitonine

La calcitonine est un polypeptide de 32 acides-aminés (AA), synthétisé par les cellules parafolliculaires de la thyroïde, aussi appelées cellules C. La calcitonine est possiblement impliquée dans l'inhibition de la résorption osseuse induite par la PTH au niveau des ostéoclastes. Ses effets physiologiques demeurent controversés. Les effets rénaux et osseux de la calcitonine ne sont observés qu'à des doses supraphysiologiques. L'excès de calcitonine (cancer médullaire de la thyroïde) ou son absence (thyroïdectomie) semblent avoir peu d'influence sur le métabolisme phosphocalcique.

La 1,25(OH)₂D

La vitamine D est une préhormone qui fait partie de la famille des sécostéroïdes liposolubles. Elle est synthétisée au niveau de la peau sous l'effet combiné des rayons U.V. du soleil et de la chaleur. Elle provient aussi en partie de l'alimentation. Pour exercer sa fonction, la vitamine D doit subir une hydroxylation en position 25 au niveau hépatique et une hydroxylation en position 1 au niveau rénal pour devenir la 1,25(OH)₂D, le métabolite actif de la vitamine D. La première hydroxylation dépend d'un effet de masse alors que la seconde est dépendante des niveaux circulants de PTH et de phosphate. La 1,25(OH)₂D exerce ses effets biologiques en agissant directement au niveau du noyau des cellules cibles sur les gènes appropriés. Les organes cibles de la 1,25(OH)₂D dans le contrôle de la calcémie sont l'intestin et l'os. Au niveau de l'intestin la 1,25(OH)₂D va

augmenter l'absorption intestinale du Ca en induisant l'activité d'un transporteur intracellulaire liant le Ca. Ceci permet d'augmenter la vitesse de transfert et la quantité de calcium absorbé. Sur l'os, elle agit essentiellement sur les ostéoclastes pour favoriser la résorption osseuse, et ses effets dépendent de sa concentration. À concentration physiologique, elle est synergique aux effets de la PTH et à concentration pharmacologique, elle reproduit seule les effets de la PTH. Au niveau du rein elle augmente la réabsorption du Ca . En effet, chez le lapin déficient en vitamine D, le transport du Ca au niveau des membranes lumineales et basolatérales du tubule distal est augmenté par la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (Bouhtiauy I *et al* . Endocrinology 132:115-120, 1993).

Parmi ces trois hormones, la PTH est l'hormone clé dans la régulation de la calcémie. La relation entre les formes moléculaires de PTH en circulation, les récepteurs à PTH à différents niveaux et les activités biologiques de l'hormone, ci-dessus mentionnées, vont maintenant nous intéresser.

CHAPITRE 1

**BIOSYNTHÈSE, SÉCRÉTION ET FORMES
CIRCULANTES DE PARATHORMONE.**

I BIOSYNTHÈSE DE LA PTH ET SON CONTRÔLE

I.1 LE GÈNE ET SA PROTÉINE

Il existe une seule copie du gène de la PTH dans le génome humain et elle est exprimée principalement dans le tissu parathyroïdien et possiblement aussi dans l'hypothalamus. Le gène a été bien étudié chez l'homme (Vasicek T 1983), le boeuf (Weaver CA 1984), le rat (Heinrich G 1984) et le poulet (Russell J 1991). Il est situé sur le bras court du chromosome 11 et les homologies nucléotidiques entre les espèces sont de l'ordre de 80%. Tous ces gènes renferment trois exons et deux introns. Le premier exon renferme la séquence 5' non codante de l'ARN messager, le deuxième la séquence de la préproPTH et le troisième le reste de la séquence de la molécule de PTH mature.

La transcription du gène génère le message du précurseur de l'hormone, le préproPTHmRNA. La PTH est un polypeptide linéaire formé de 84 acides aminés (9500 Da) (Brewer HB Jr 1970, Niall HD 1970, Mallette LE 1986) synthétisé sous forme d'un précurseur, la préproPTH, à partir du PréProPTHmRNA. La partie pré est clivée par une endopeptidase lorsque la protéine traverse la membrane du réticulum endoplasmique (RE), libérant ainsi la proPTH dans la lumière du RE. La séquence pro est clivée dans l'appareil de Golgi juste avant que la PTH se retrouve dans les vésicules sécrétoires. La PTH(1-84) mature et bioactive est le produit final de cette synthèse (**fig2**).

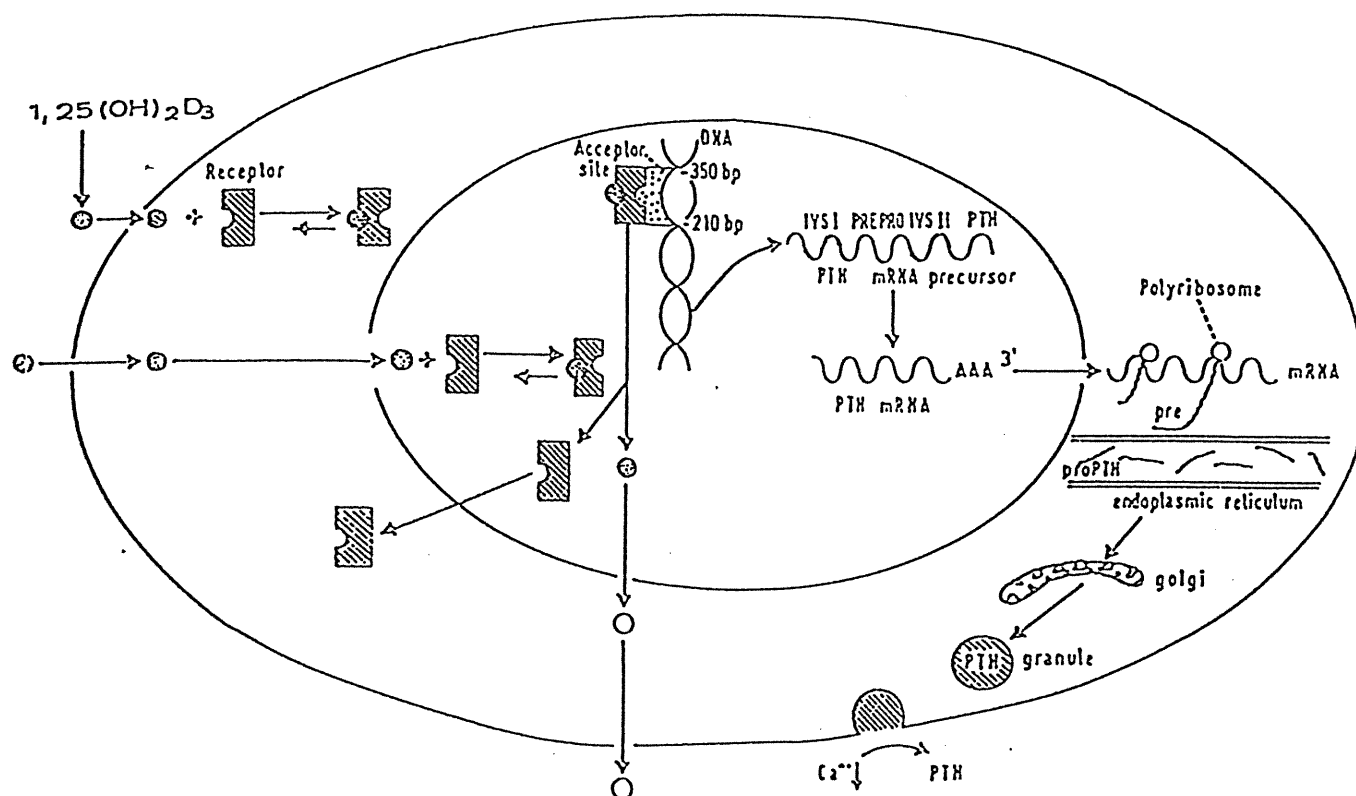
1.2 RÉGULATION DE L'EXPRESSION DU GÈNE.

La biosynthèse de la PTH est contrôlée principalement par le Ca, le P et la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. Le Ca et la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ sont les modulateurs de la synthèse les mieux étudiés. Leurs effets sur l'expression du gène de la PTH sont médiés par des mécanismes différents.

Rôle de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$

Le rôle de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ dans la régulation de la transcription du gène de la PTH a été étudié *in-vivo* et *in-vitro*. Silver (Silver J 1985) a rapporté en 1985, le premier l'effet direct de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ sur les cellules parathyroïdiennes bovines en culture primaire. Des niveaux élevés de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ diminuaient les niveaux de PreProPTHmRNA et des niveaux abaissés avaient un effet inverse. Par la suite, ces résultats ont été confirmés *in-vivo* chez le rat normal par le même auteur (Silver J 1986). Ces effets de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ sur la transcription du gène de la PTH ont été confirmés dans plusieurs études *in-vitro* (Karmali R 1989, Brown AJ 1989, Russell J 1986). Seule la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ semble capable à concentration physiologique d'inhiber la transcription du gène de la PTH, les autres métabolites requerrant des doses supraphysiologiques. L'action régulatrice de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ est médiée par un élément de réponse situé sur le gène de la PTH (**fig 3**). En effet, après la liaison de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ avec son récepteur (VDR), le complexe migre dans le noyau et va se fixer sur l'élément de réponse de la région régulatrice du gène de la préproPTH pour inhiber la transcription du gène.

Le rôle de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ dans la multiplication des cellules parathyroïdiennes a aussi été étudié *in-vitro* sur les cellules parathyroïdiennes principales bovines en présence (Nygren P 1988, Kremer R 1989) ou en absence (Ishimi Y 1990) de facteurs de croissance dans le milieu de culture. Ces études ont démontré que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ augmentait de façon aigüe la prolifération cellulaire. Le rôle de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ dans la multiplication des cellules parathyroïdiennes a aussi été étudié *in-vivo* chez le rat carencé en vitamine D. Chez cet animal, le nombre de cellules parathyroïdiennes n'augmentait que d'un facteur de 1,7 alors que le PreProPTHmRNA augmentait d'un facteur de 10 face à un déficit en $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (Naveh-Many T 1990). Ainsi, la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ peut agir à la fois sur la transcription du gène de la PTH et sur la multiplication des cellules parathyroïdiennes.



Model of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ action on the parathyroid cell. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ binds to its receptor (VDR) in the parathyroid cell, which then binds to PTH gene promoter's vitamin D response element (VDRE). In some way this decreases the activity of RNA polymerase II leading to less transcription to the preproPTH mRNA precursor. This precursor is normally processed and spliced to the mature preproPTH mRNA with its polyadenylated tail, which then in the nucleus is attached to polyribosomes where it is translated to preproPTH. The pre sequence of the peptide while still a nascent chain attached to the polysome recognizes and binds to a docking protein, which is a receptor protein located on the cytoplasmic face of the endoplasmic reticulum membrane. The signal peptide is cleaved from the polypeptide chain by signal peptidase before the synthesis of the chain is completed (co-translational cleavage). ProPTH is transported along the Golgi apparatus and the pro sequence is cleaved, leaving the mature PTH in the secretory granule.

Figure 3: Régulation de la transcription. Rôle de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

Tiré de: Justin Silver. Regulation of parathyroid hormone synthesis and secretion.

Disorders of bone and mineral metabolism. Fredric L. Coe and Murray J. Favus. Raven

Press, Chap 4: 101. 1992

Rôle du calcium

Le rôle du Ca ne se limite pas à influencer la sécrétion de PTH. Il est aussi un régulateur du gène de la PTH et est impliqué dans le développement de l'hypertrophie ou de l'hyperplasie du tissu parathyroïdien. L'hypercalcémie diminue la quantité de PreProPTHmRNA *in-vitro* (Russell J 1983, Brookmann JJ 1986, Russell J 1987). La première étude *in-vitro* avec des cellules parathyroïdiennes bovines a démontré qu'une hypercalcémie diminuait le niveau de PreProPTHmRNA sur une période de plusieurs jours (Russell J 1983). Ces résultats ont été confirmés par d'autres études (Brookmann 1986, Russell J 1987) qui ont aussi démontré une légère augmentation du niveau de PreProPTHmRNA en hypocalcémie (Brookmann 1986). Ces effets du calcium ont aussi été étudiés *in-vivo* chez le rat (Naveh-Many 1989, Yamamoto M 1989). Les résultats obtenus en hypercalcémie ont été similaires à ceux obtenus *in-vitro*, cependant, contrairement aux études *in-vitro*, ces études ont aussi démontré une augmentation marquée du niveau de PreProPTHmRNA en hypocalcémie.

Une étude *in-vivo* chez le rat carencé en Ca a permis de démontrer que l'action du Ca dans la régulation du gène de la PTH n'est pas transcriptionnelle (Naveh-Many T 1990). On observe une augmentation importante de l'ARNm de la PTH sans augmentation de la transcription du gène par hybridation *in-situ* (Naveh-Many T 1990). Cette régulation post-transcriptionnelle est médiée par la liaison d'une protéine cytosolique avec certaines séquences non traduites de la région 3' du RNAm-PreProPTH (3'UTR). Cette liaison stabilise le RNAm et le rend moins apte à la dégradation (Naveh-Many T 1999, Yalcindag

C 1999, Sela Brown A 2000). L'hypocalcémie favorise la synthèse de cette protéine et l'hypercalcémie a un effet inverse. La présence de cette protéine est observée dans d'autres tissus, mais sa quantité n'est régulée par le Ca que dans les parathyroïdes.

Rôle du phosphore

Il a été longtemps considéré que l'influence du P sur la PTH était médiée par l'intermédiaire du calcium. Son rôle direct a été démontré par l'étude de Lopez Hilker *et al* (1990) chez le chien urémique. Ils ont démontré que l'hyperphosphatémie avait un effet direct sur l'hyperparathyroïdie secondaire du chien avec calcémie normale et calcitriol abaissé. Ces résultats ont été confirmés chez l'homme urémique par Lafage MH *et al.* (1992). En effet, la restriction alimentaire en P permettait de normaliser le niveau de PTH circulante et les signes histologiques d'ostéite fibreuse sans augmentation de la calcémie ou du calcitriol sérique.

Le rôle du PO_4 dans la régulation de l'expression du gène de la PTH est indépendant des niveaux de Ca et de $1,25(OH)_2D$ et a été rapporté *in-vivo* chez le rat hypophosphatémique avec niveaux normaux de Ca et de $1,25(OH)_2D$ (Kilav *et al* 1995). Ces animaux avaient un niveau d'ARNm de PTH diminué et l'hybridation *in-situ* de l'ARN marqué nouvellement synthétisé suggérait que cet effet n'était pas transcriptionnel. La diminution de l'ARNm de la PTH induite par l'hypophosphatémie est donc post-transcriptionnelle, et est due à la dégradation de l'ARNm de la PTH en absence de liaison à une protéine cytosolique qui stabilise l'ARNm de la PTH (Naveh-Many 1999, Yalcindag

1999, Sela-Brown 2000). Il s'agit de la même protéine que celle impliquée dans l'effet du Ca. Sa synthèse est favorisée par l'hyperphosphatémie et inhibée par l'hypophosphatémie. Un rôle indépendant du PO_4 a aussi été confirmé *in-vivo* chez le rat normal (Hernandez *et al* 1996) où l'hyperphosphatémie augmentait l'ARNm de la PTH indépendamment des niveaux de Ca, CaR, $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ et VDR.

I.3 RÉGULATION POST-TRANSLATIONNELLE.

Des études effectuées sur du tissu parathyroïdien d'origine porcine (Chu LLH 1973) et bovine (Habener JF 1975) ont démontré que la PTH nouvellement synthétisée, marquée avec des acides aminés radioactifs, subit un sort différent dépendant de la concentration du Ca ambiant. En hypocalcémie, la majorité de la PTH nouvellement synthétisée était retrouvée comme produit de sécrétion dans le milieu et à l'intérieur des cellules parathyroïdiennes. En hypercalcémie, la majorité de la PTH nouvellement synthétisée ne pouvait être retrouvée ni dans le milieu ni dans les cellules, suggérant un processus de dégradation, calcium dépendant, en fonction des besoins en parathormone. Ce phénomène a été bien démontré *in-vitro* par Habener (Habener JF 1975) sur des cellules parathyroïdiennes bovines. Il a démontré que la sécrétion de la PTH augmentait rapidement en réponse à une hypocalcémie et ce sans modification de la biosynthèse ni du taux de conversion de la Pro-PTH en PTH. À l'inverse, en hypercalcémie, presque 50% de l'hormone nouvellement synthétisée était dégradée à l'intérieur de la cellule. Il a conclu que cette dégradation intracellulaire représentait un mécanisme de régulation de la

production d'hormone liée à une protéolyse généralisée. Cette étude confirmait les résultats obtenus par Chu *et al*, (Chu LLH 1973) qui avait étudié la sécrétion *in-vitro* de glandes parathyroïdes de rat maintenues en hyper ou hypocalcémie de façon chronique. L'hypercalcémie réduisait la conversion de Pro-PTH en PTH secondairement à la dégradation intracellulaire de la Pro-PTH, de la PTH ou des deux. Il est probable, mais non démontré, que ce processus est aussi celui qui est responsable de la formation des fragments carboxyl-terminaux de la PTH (**fig4**).

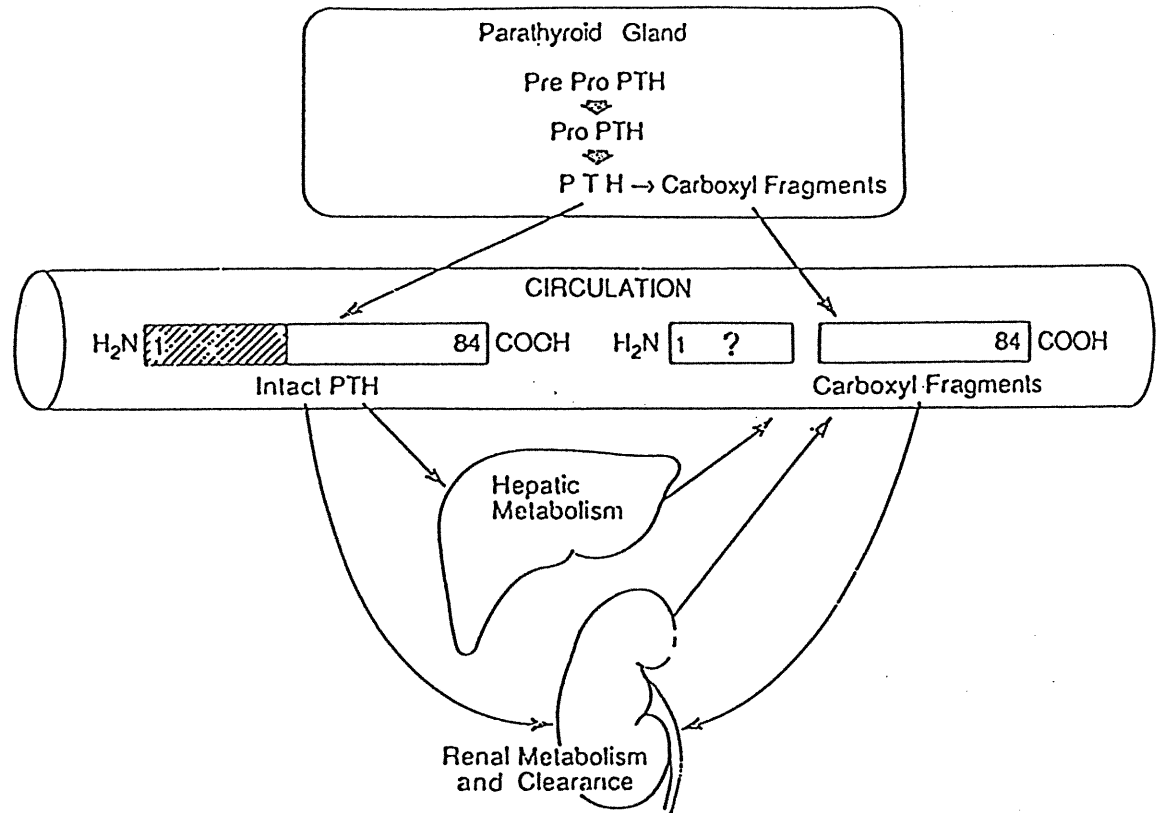


FIG. 2. Secretion, metabolism, clearance, and circulating forms of immunoreactive PTH. PTH is synthesized as a preprohormone, is converted to prohormone, and is secreted as intact hormone, or, it is metabolized into biologically inactive carboxyl fragments prior to secretion. These carboxyl fragments containing both the middle and carboxyl regions are also produced by peripheral metabolism of intact PTH by liver and kidney. The half-life in vivo and the concentration of intact biologically active hormone are small compared with that of inactive carboxyl fragments. Both carboxyl fragments and intact hormone are cleared in the kidney by glomerular filtration. The existence of a significant concentration of amino-terminal fragments is uncertain. From Endres et al. [119].

Figure 4: **Régulation de la parathormone synthétisée**

Tiré de: Disorders of bone and mineral metabolism. Fredric L. Coe and Murray J. Favus.

Raven Press, Chap 5:109. 1992

II SÉCRÉTION DE LA PTH.

La sécrétion de PTH dépend de la quantité de PTH mature emmagasinée dans les granules sécrétoires. La PTH destinée à la sécrétion étant limitée, elle doit être continuellement renouvelée pour répondre aux besoins de l'organisme. Lorsqu'une hypocalcémie est maintenue pour plus de 10-15 min, on assiste à une inhibition du catabolisme intracellulaire de PTH puis à une augmentation de la synthèse *de novo*. À plus long terme, une hypertrophie (jours) et une hyperplasie (semaines) vont successivement s'installer si l'hypocalcémie n'est pas corrigée.

II.1 AGENTS SÉCRÉTAGOGUES ET MÉCANISMES

La sécrétion de la PTH est régulée principalement par le Ca mais aussi par des sécrétagogues tels que la sécrétine, le magnésium, les catécholamines et la vitamine D.

La relation qui existe entre la sécrétion de la PTH et la calcémie est définie par une fonction sigmoïdale inversée (Brown EM 1983), l'hypocalcémie stimulant et l'hypercalcémie inhibant la sécrétion de la PTH. Les quatre paramètres permettant de définir cette fonction sont le taux maximal de sécrétion obtenu lors d'un stimulus hypocalcique, le taux de sécrétion minimal ou non-suppressible obtenu lors d'une inhibition par une hypercalcémie, le seuil de stimulation (*set-point*), ou la concentration de Ca qui correspond à 50% de la fonction sécrétoire et, finalement, la pente, qui représente la sensibilité des cellules parathyroïdiennes aux variations de calcémie. L'étendue de la

fonction parathyroïdienne permet une grande variation de l'activité sécrétoire et contribue au maintien de la calcémie.

Généralement les cellules du système endocrinien répondent au Ca via les canaux calciques, tandis que les cellules principales des parathyroïdes sont capables de détecter et de répondre à de très petites variations du Ca grâce à un récepteur membranaire spécifique au Ca (CaR). Brièvement, l'activation des CaR par une hypocalcémie va déclencher une série de réactions impliquant 2 voies de transmission du signal, la production d'AMPc d'une part et l'augmentation du Ca libre cytosolique d'autre part, qui vont déclencher une sécrétion de la PTH par exocytose (**fig 5**).

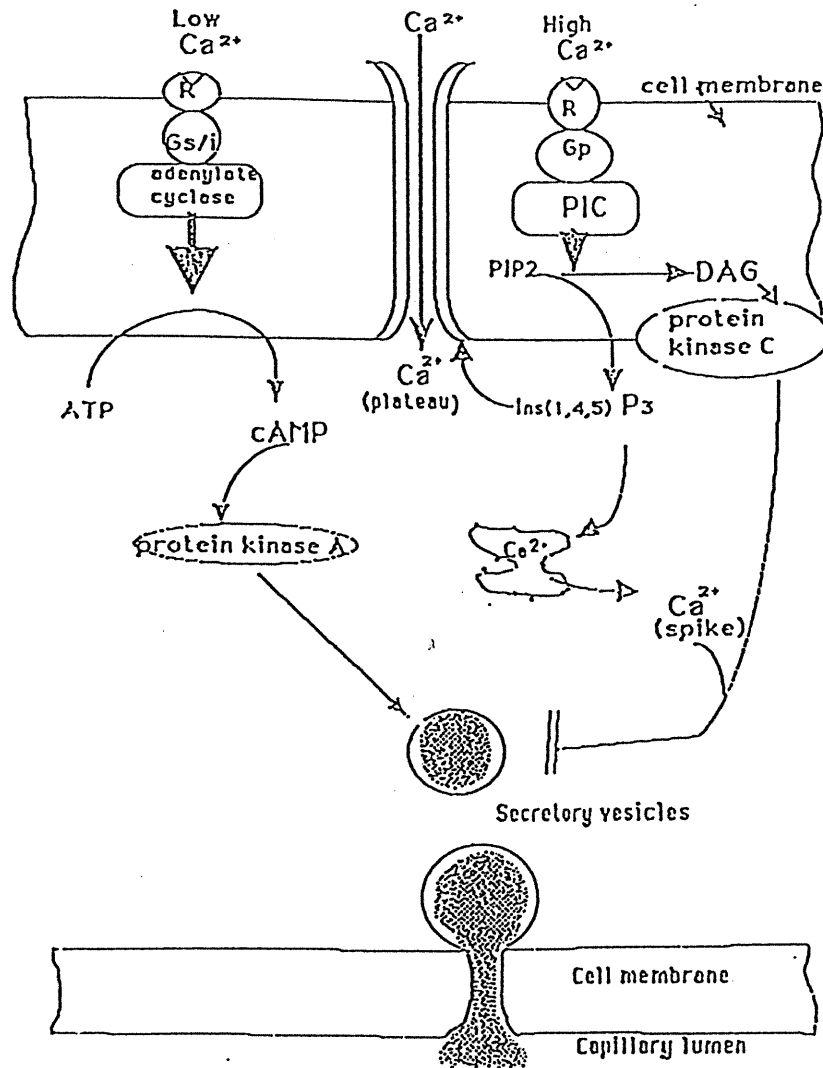


FIG. 15. Diagram depicting cellular events by which changes in extracellular calcium may regulate PTH secretion. Changes in extracellular calcium concentration would be recognized by a plasma membrane "receptor" (R), which would then activate either the adenylate cyclase or inositol phosphate pathways, through different guanine nucleotide-regulatory-protein (G_s , G_i , or G_p). cAMP agonists are potent secretagogues. Phosphoinositidase C (PIC) activation leads to the synthesis of inositol triphosphate [$\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$] and diacylglycerol (DAG) (230). $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ raises the intracellular calcium concentration by a transient spike in intracellular calcium derived from release of intracellular calcium from the endoplasmic reticulum, and a more sustained increase due to influx of calcium through voltage sensitive and insensitive channels. An increase in diacylglycerol (DAG) concentration leads to an increase in protein kinase C activity which inhibits PTH secretion.

Figure 5 : **Mécanisme de sécrétion. Rôle du récepteur à calcium.**

Tiré de: Justin Silver. Regulation of parathyroid hormone synthesis and secretion.

Disorders of bone and mineral metabolism. Fredric L. Coe and Murray J. Favus. Raven

Press, Chap 4: 98. 1992.

II.2 PRODUITS DE SÉCRÉTION DES PARATHYROÏDES

Certaines études sur l'origine des fragments circulants de la PTH suggéraient que les parathyroïdes sécrétaient uniquement la PTH(1-84) (Serge GV 1972, Habener JF 1971, Martin TJ 1972) alors que d'autres suggéraient aussi la sécrétion de fragments d'un poids moléculaire plus petit que celui de la PTH(1-84) (Arnaud CD 1970, Sherwood LM 1970, Arnaud CD 1971, Sherwood LM 1971). Des études ultérieures ont permis de confirmer la contribution des parathyroïdes aux fragments circulants.

In-vivo chez l'homme, l'effluent veineux des glandes parathyroides adénomateuses ou hyperplasiques contient de gros fragments carboxyl-terminaux ainsi que de la PTH(1-84) (Flueck JA 1977). La sécrétion de fragments amino-terminaux a aussi été démontrée à partir de cellules d'adénomes humains *in-vitro* (El-Hajj 1989) mais n'a pas été confirmée avec l'utilisation de cellules porcines ou bovines (Morrissey JJ 1980, MacGregor RR 1986). Une étude *in-vitro* (Hanley DA 1978) utilisant des glandes parathyroïdes bovines, a démontré que la quantité et la qualité des formes moléculaires de PTH mesurées dans le milieu, étaient influencées par la calcémie. Une autre étude *in-vivo* (Mayer GP 1979) a démontré que l'effluent veineux des parathyroides contenait principalement des fragments carboxyl-terminaux en normo- ou en hypercalcémie et de la PTH(1-84) en hypocalcémie. Une étude de sécrétion *in-vitro* (El Hajj FG 1989), utilisant des morceaux de tissus parathyroïdien hyperplasique provenant de patients souffrant d'insuffisance rénale, a démontré que la sécrétion des fragments carboxyl-terminaux était contrôlée par la calcémie. En hypocalcémie, on observait une sécrétion de 55% d'hormone intacte et de

45% de fragments carboxyl-terminaux, alors qu'en hypercalcémie la sécrétion des fragments carboxylterminaux augmentait à 63.3% et celle de l'hormone intacte diminuait à 34.7%. Des études de sécrétion *in-vitro* ont permis de déterminer les sites de clivage protéolytique et d'identifier les fragments sécrétés. Ces études ont démontré que les parathyroïdes sécrétaient les fragments (34-84) et (37-84) chez le porc (Morrissey JJ 1980) et les fragments (24-84), (28-84) et (43-84) chez le boeuf (MacGregor RR 1986)

III LA PARATHORMONE CIRCULANTE.

III.1 DESCRIPTION.

L'immunohétérogénéité de la PTH circulante est connue de longue date (Berson SA 1968). La PTH circulante est composée de PTH intacte et de gros fragments carboxyl-terminaux (Canterbury JM 1972, Serge GV 1972, Goldsmith RS 1973, Silverman R 1973, Arnaud CD 1974, Dambacher MA 1979, Gautvik KM 1983, D'Amour P 1986). La première est pourvue d'activité biologique (Canterbury JM 1973, Gautvik KM 1984, Goltzman D 1980, Schettler T 1984), alors que les seconds ont été considérés jusqu'à récemment comme biologiquement inactifs (Canterbury JM 1973, Gautvik KM 1984). On a aussi rapporté la présence de petits fragments amino-terminaux biologiquement actifs (Canterbury JM 1972, Silverman R 1973, Canterbury JM 1973, Goltzman D 1980) et carboxyl-terminaux biologiquement inactifs (Canterbury JM 1972, Dambacher MA 1979, Canterbury JM 1973, Gautvik KM 1984). La PTH intacte circulante est composée de 85%

de PTH(1-84) et 15% de *non*(1-84)PTH ou gros fragments carboxylterminaux avec une structure aminoterminal partiellement préservée (Brossard JH 1993, Brossard JH 1996). La PTH intacte compte seulement pour 15-30% de l'immunoréactivité carboxyl-terminale détectée en circulation. Le reste de cette immunoréactivité, 70-80%, est composé principalement de fragments carboxyl-terminaux et de fragments mid-carboxyl-terminaux.

III.2 RÉGULATION AIGUË ET CHRONIQUE PAR LA CALCÉMIE.

Les études effectuées chez l'homme (Brossard JH 1996, Lepage R 1998, D'Amour P 1992) ont démontré que la composition de la PTH circulante est influencée par la calcémie. En normo- et en hypercalcémie la PTH circulante est composée principalement des fragments carboxyl-terminaux de PTH (80%), (**fig 6**) alors qu'en hypocalcémie la forme intacte est relativement plus importante (35%) (**fig 7**). Cette régulation aiguë des formes moléculaires de PTH par la calcémie est modulée dans différents modèles expérimentaux chez l'animal ou encore lors de certaines maladies chez l'homme. Dans les modèles d'hyperparathyroïdie secondaire, avec ou sans insuffisance rénale, on note un changement du profil HPLC de la PTH circulante vers une quantité accrue d'hormone intacte, hPTH(1-84), par rapport aux fragments carboxyl-terminaux et ce à tous les niveaux de calcémie (Cloutier M 1994). Le même phénomène est observé lors d'une hypoparathyroïdie partielle induite par une parathyroïdectomie à 50% (Cloutier M 1997). À l'inverse, une hypercalcémie chronique chez l'homme (Brossard JH 1993), ou la correction médicale d'une hyperparathyroïdie secondaire favorise la sécrétion de fragments

carboxyl-terminaux, puisque l'activité sécrétoire des glandes hyperplasiées a été compensée par une augmentation du catabolisme intracellulaire de la PTH nouvellement synthétisée. De façon similaire, un besoin diminué en PTH observé lors du traitement à la 1,25(OH)₂D chez le chien normal conduit à un profil HPLC des fragments circulant favorisant les fragments carboxyl-terminaux à tous les niveaux de calcémie (Cloutier M 1997). Le ratio fragments carboxyl-terminaux/I-PTH est donc étroitement contrôlé de façon aiguë et de façon chronique par la calcémie (**fig 8**) et il reflète bien l'activité de fonction parathyroïdienne reliée au catabolisme intracellulaire.

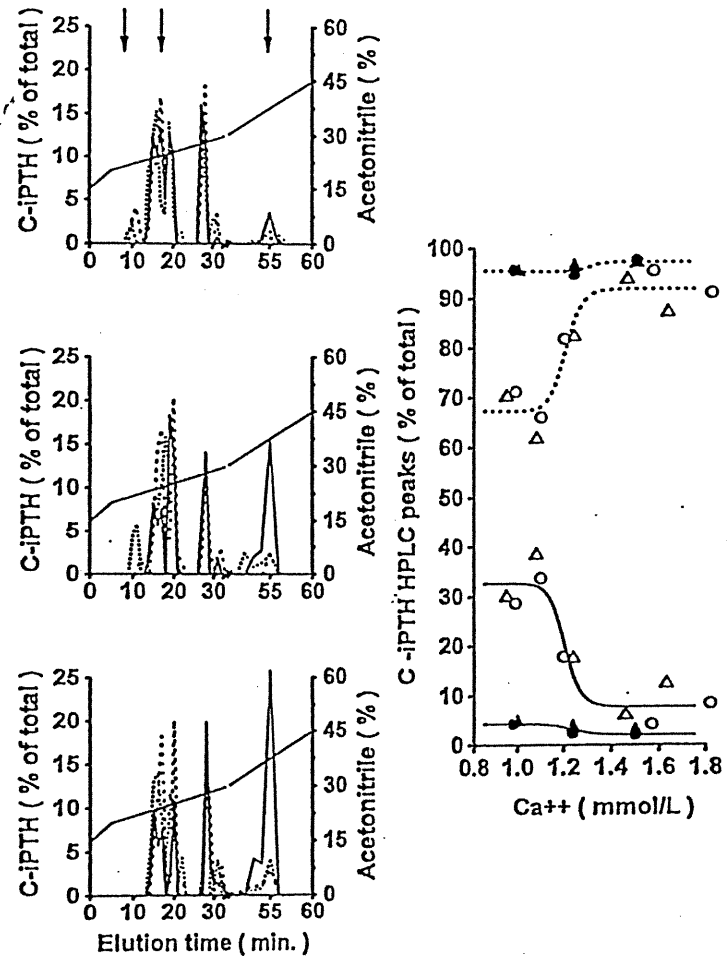


FIG. 3. HPLC profiles of C-PTH for a pool of normal individuals (—) and for renal failure patients with LBI (- - -) or HBI (● ● ●) in hypercalcemia (*top left*), normocalcemia (*center left*), and hypocalcemia (*bottom left*). The elution positions of hPTH-(39-68), hPTH-(39-84), and hPTH-(1-84) are indicated by *arrows from left to right*. On the *right*, a planimetric evaluation of the hPTH-(1-84) peak (55 min; —) and of all of the other peaks together (- - -) is provided as a function of Ca^{2+} concentration for pooled sera from normal individuals (Δ), for a single normal individual (O), for pooled serum from renal failure patients with LBI (●), and for a single renal failure patient with HBI (\blacktriangle).

Figure 6

La Parathormone intacte circulante. Régulation aiguë par la calcémie

Tiré de : Brossard JH, Cloutier M, Roy L, Lepage R, Gascon-Barré M and D'Amour P.

Accumulation of a non-(1-84) molecular form of parathyroid hormone (PTH) detected by

intact PTH assay in renal failure: importance in the interpretation of PTH values. J Clin

Endocrinol Metab 81:3923-3929. 1996.

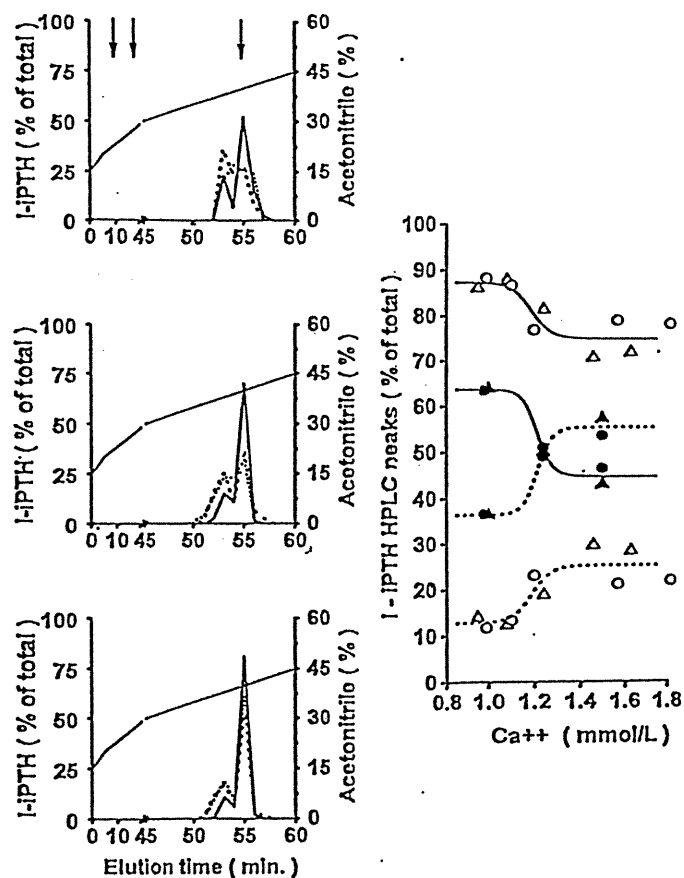


FIG. 2. HPLC profiles of I-PTH for a pool of normal individuals (—) and for renal failure patients with LBI (- - -) or HBI (● ● ●) in hypercalcemia (*top left*), normocalcemia (*center left*), and hypocalcemia (*bottom left*). The elution positions of hPTH-(39-68), hPTH-(39-84), and hPTH-(1-84) are indicated by *arrows from left to right*. On the *right*, a planimetric evaluation of the hPTH-(1-84) peak (55 min; —) and the non-(1-84) PTH peak (53 min; - - -) is provided as a function of the Ca^{2+} concentration for pooled sera from normal individuals (Δ), for a single normal individual (O), for pooled sera from renal failure patients with LBI (\bullet), and for a single renal failure patient with HBI (\blacktriangle).

Figure 7 :

Les fragments carboxylterminaux de parathormone circulants.

Régulation aiguë par la calcémie.

Tiré de : Brossard JH, Cloutier M, Roy L, Lepage R, Gascon-Barré M and D'Amour P.

Accumulation of a non-(1-84) molecular form of parathyroid hormone (PTH) detected by intact PTH assay in renal failure: importance in the interpretation of PTH values. J Clin

Endocrinol Metab 81:3923-3929. 1996.

Hétérogénéité de la PTH circulante

Modulation de la régulation calcique

Résumé

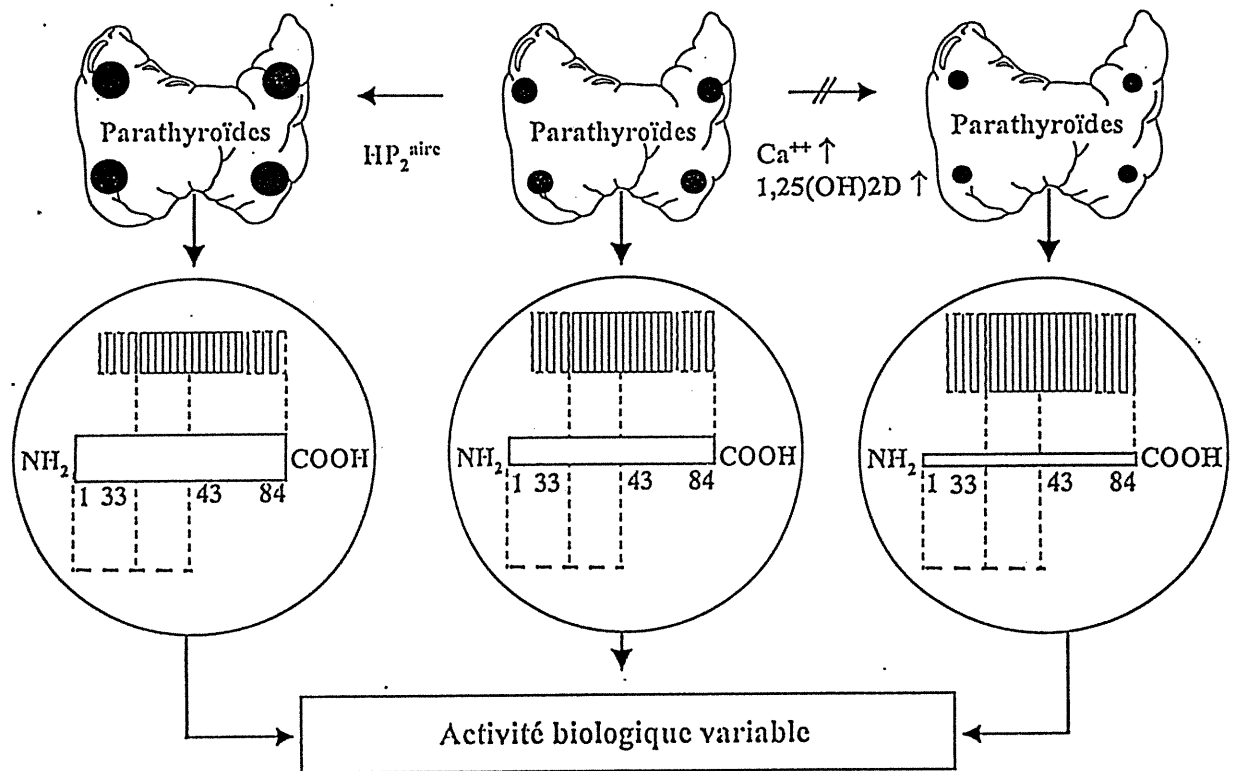


Figure 8: Hétérogénéité de la PTH circulante.

Modulation de la régulation calcique.

IV MÉTABOLISME PÉRIPHÉRIQUE DE LA PARATHORMONE CIRCULANTE.

IV.1 DESCRIPTION GÉNÉRALE.

Une fois sécrétée l'hormone subit une clairance périphérique. La clairance de la PTH circulante est surtout hépatique (60-70%) et rénale (20-30%), la liaison de l'hormone avec son récepteur au niveau des autres tissus cibles occupant une place mineure (<1%). Si la fonction rénale est normale, la demi-vie de l'hormone intacte est d'environ 5 minutes alors que celle des fragments carboxyl-terminaux de 20 minutes. La filtration glomérulaire assure aussi bien la clairance des fragments que celle de la PTH intacte. Cependant, l'hormone intacte et les fragments amino-terminaux ont une demi-vie plus courte que celle des fragments carboxyl-terminaux, parce que l'hormone intacte et les fragments amino-terminaux sont aussi clairés par le foie. La filtration glomérulaire demeure la voie principale de clairance des fragments carboxyl-terminaux. En plus de sa fonction de clairance, le métabolisme périphérique de la PTH contribue à l'immunohétérogénéité de la PTH circulante en relâchant en circulation des fragments carboxyl-terminaux similaires à ceux sécrétés par les parathyroïdes (D'Amour P 1979). Différentes préparations de PTH(1-84) injectées chez l'animal entier (Nguyen-Yamamoto L submitted 2001, Serge GV 1974, Serge GV 1976, Serge GV 1977, Martin KJ 1976, Newman WF 1975a, Teitelbaum AP 1979) ont démontré la génération de gros fragments

carboxyl-terminaux avec (Martin KJ 1976, Newman WF 1975a) ou sans (Serge GV 1974, Serge GV 1976, Serge GV 1977, Habener JF 1976) petits fragments au cours du métabolisme périphérique. Du point de vue structural, les grands fragments carboxyl-terminaux sont clivés à la position 34, 37, 41 et 43 de la ^{125}I -bPTH(1-84) injectée chez le chien ou le rat. Le métabolisme de la ^{125}I -PTH(39-84) injectée chez le rat suggère aussi un clivage progressif de fragments carboxyl-terminaux en circulation à partir de leur structure aminoterminal (D'Amour P 1985). La plupart des études démontrent que moins de 20% de la PTH(1-84) injectée est retournée en circulation sous forme de fragments (D'Amour P 1979, Serge GV 1976, Bringhurst FR 1988, Newman WF 1975a, Serge GV 1981, Barrett PQ 1978, Teitelbaum AP 1979, Newman WF 1979). Le métabolisme périphérique de la PTH(1-84), en plus de sa fonction de clairance, contribue aussi à l'immunohétérogénéité de la PTH circulante. Il génère des fragments carboxyl-terminaux, et les relâche dans la circulation (**fig 4**).

IV.2 RÔLE DU FOIE, DES REINS ET AUTRES TISSUS.

Le rôle du rein dans le métabolisme de la PTH circulante a d'abord été suggéré par Berson et Yalow en 1968, qui ont observé une prolongation de la demi-vie de la PTH après une parathyroïdectomie chez les patients souffrant d'insuffisance rénale. Les études de Fang et Tashjian (Fang VS 1972) ont démontré qu'une hépatectomie partielle prolongeait de façon significative la disparition de la PTH injectée chez l'animal, suggérant aussi un rôle important du foie dans la clairance de la PTH. Le rôle de ces organes dans

le métabolisme de la PTH intacte a été confirmé lors d'études ultérieures *in-vitro* sur le foie et sur les reins isolés et perfusés (Newman WF 1975a, Daugaard H 1988, Martin KJ 1977, Hruska KA 1977, Daugaard H 1990), ainsi que lors d'études *in-vivo* chez le chien (Fox J 1983).

Le foie.

La captation hépatique de la PTH se fait via le réseau vasculaire (D'Amour P 1979, Martin KJ 1976, Newman WF 1975a, Singer FR 1975, Oldham SB 1978, Zull JE 1972) et semble être plus sélective pour la PTH(1-84). Le foie capte environ 65% de la PTH(1-84) à chaque passage (D'Amour P 1984) et ce par deux mécanismes différents. Le premier est Ca dépendant (D'Amour P 1996), implique les hépatocytes (Newman WF 1975a, Bergeron JJM 1981, Rouleau MF 1986, D'Amour P 1984), dépend de la région aminoterminal, (1-34), et représente 35% de la captation totale. Le deuxième est Ca indépendant (D'Amour P 1985, Newman WF 1975c), à haute capacité et non-saturable, implique les cellules de Küpffer, dépend de la séquence (28-48) et représente 65% de la captation hépatique (D'Amour P 1984, D'Amour P 1981a, Bringhurst FR 1982, Pillai S 1986). Une faible captation hépatique de fragments carboxyl-terminaux a également été démontrée (Fox J 1983, D'Amour P 1996, Fogh-Andersen N 1984), de même que son inhibition par l'hypercalcémie (D'Amour P 1996).

Le foie relâche des fragments carboxyl-terminaux dont la structure est similaire à celle des fragments normalement retrouvés en circulation (D'Amour P 1979, Newman WF

1975a, D'Amour P 1981a, Serge GV 1981b). Les sites de clivage hépatique de la PTH(1-84) sont localisés aux acides aminés 34 et 37. Le foie est donc le site principal du métabolisme périphérique de la PTH(1-84) et de la production et de la libération des fragments carboxyl-terminaux en circulation. La production des fragments amino-terminaux a aussi été rapportée *in-vitro* (Bringhurst 1982, Pillai S 1986, Serge GV 1981b, Caterbury JM 1975, Daugaard H 1988) mais ces fragments sont dégradés si rapidement qu'ils ne sont pas relâchés (Bringhurst 1982, Serge GV 1981b, Caterbury JM 1975, Daugaard H 1988).

Le rein

Le rein extrait les différentes formes circulantes de PTH via son réseau vasculaire (D'Amour P 1979, Martin KJ 1976, Newman WF 1975a, Singer FR 1975, Oldham SB 1978, Zull JE 1972). Des études menées chez le chien (Martin KJ 1976, Martin KJ 1977, Hruska KA 1977) et chez le rat (D'Amour P 1979, D'Amour P 1985, Serge GV 1981) démontrent que le rein extrait toutes les formes moléculaires de PTH filtrées, aussi bien la PTH(1-84) que les fragments. Martin (Martin KJ 1977) a étudié le rôle de la filtration glomérulaire ainsi que la réabsorption tubulaire et périrubulaire dans la clairance de la PTH. Selon lui, la clairance des formes biologiquement actives, PTH intacte et PTH(1-34), impliquerait à la fois la filtration glomérulaire et réabsorption périrubulaire. La clairance des fragments carboxyl-terminaux dépendrait uniquement de la filtration glomérulaire et de la réabsorption tubulaire. Ces observations n'ont cependant pas été confirmées dans un

système de rein isolé et perfusé de rat (Daugaard H 1988, Daugaard H 1990, Daugaard H 1994) ou chez le chien anesthésié (Newman WF 1979). Dans ces systèmes, seule la filtration glomérulaire était responsable de la clairance de la PTH(1-84) et de celle des fragments. Plusieurs études suggèrent l'implication d'enzymes lysosomiaux de la famille des cathepsines B/D dans la dégradation de la PTH filtrée par le rein. Le rein semble jouer un rôle mineur dans la formation des fragments de PTH mais un rôle majeur dans leur clairance (D'Amour P 1979, D'Amour P, Serge GV 1981, Daugaard H 1988, Hruska KA 1977, Daugaard H 1990, Daugaard H 1994).

L'os.

Le métabolisme osseux de la PTH suscite certaines controverses. La ^{125}I -hPTH(1-84) biologiquement active est captée par l'os *in-vivo* (Newman WF 1975a, Calvo MS 1985). Une étude de perfusion d'os isolé chez le chien a démontré que seule la PTH (1-34) et non la PTH(1-84) était captée par l'os (Martin KJ 1978). Cette étude démontrait un gradient artérioveineux de l'ordre de 36% pendant l'infusion de bPTH(1-34), accompagné d'une augmentation de production de d'AMPc. Par contre d'autres études *in-vitro* ont démontré que la PTH(1-84) n'avait pas besoin d'être métabolisée en PTH(1-34) pour être active sur les cellules osseuses. La captation des fragments carboxyl-terminaux par l'os a aussi été démontrée chez le rat normal et chez le rat néphrectomisé (D'Amour P 1985). La contribution de l'os à l'immunohétérogénéité de la PTH est considérée comme négligeable.

IV.3 RÉGULATION CALCIQUE.

Contrairement au métabolisme glandulaire de la PTH intacte qui est contrôlé par la calcémie, la régulation du métabolisme périphérique par la calcémie semble peu importante et controversée. La clairance périphérique de la PTH(1-84) chez le rat n'est pas influencée par la calcémie (Newman WF 1979). La calcémie n'influence pas l'extraction hépatique de la ^{125}I -bPTH(1-84) (Barrett PQ 1978, Zull JE 1972). À l'inverse, des études de perfusion *in-vitro*, utilisant le foie de rat isolé, ont démontré que l'extraction de la hPTH(1-34), celle de la hPTH(1-84) ainsi que celle de divers fragments de PTH (Daugaard H 1988) est augmentée par l'hypercalcémie. Les études *in-vitro* de Hruska *et al*, (Hruska KA 1977) utilisant le rein isolé et perfusé, ont démontré une dégradation accrue de la PTH en hypercalcémie. La régulation calcique du métabolisme périphérique demeure controversée à cause des différences entre les études *in vivo* et celles *in vitro*.

V. RÔLE DU MÉTABOLISME DE LA PTH.

V. 1 PROCESSUS D'ACTIVATION BIOLOGIQUE.

Le métabolisme de la PTH intacte, périphérique et glandulaire, implique un clivage dans la région (33-43) de la PTH. Or l'activité biologique de la PTH est située dans les premiers 34 AA, et un clivage après cette région pourrait générer des fragments amino-terminaux biologiquement actifs. Certains auteurs ont suggéré que le métabolisme de la PTH aurait pour but d'activer la PTH en générant des fragments amino-terminaux biologiquement actifs.

En 1968, Parsons et Robinson (Parsons JA 1968) sont les premiers à démontrer que l'injection directe de bPTH(1-84) dans la circulation du tibia de chat n'a aucun effet sur la libération du Ca, mais que l'infusion de bPTH(1-84) chez l'animal entier provoquait, elle, la libération du Ca. Une étude entreprise avec le tibia isolé de chien par Martin (Martin KJ 1978) a démontré que seule la bPTH(1-34), et non la bPTH(1-84), était captée par l'os, où son activité biologique se traduisait par une augmentation de la production d'AMPc. Donc, selon ces 2 études, les effets obtenus au niveau de l'os par la PTH, à savoir la libération du Ca et production de l'AMPc, seraient médiés non pas par la forme intacte de l'hormone mais par un métabolite apparenté à la PTH(1-34). Ces résultats suggéraient que la PTH intacte devait subir des transformations périphériques avant d'exercer ses effets biologiques sur l'os.

Malgré ces observations, plusieurs études ne semblent pas considérer le métabolisme périphérique de la PTH comme une étape d'activation requise. Une étude chez le rat normal a démontré que des fragments amino-terminaux de la PTH sont produits *in-vitro* par les cellules de Kupffer isolées ou *in-vivo* par le foie ou le rein, mais ces fragments sont rapidement dégradés *in-situ* et ne sont pas relâchés dans la circulation (Bringhurst FR 1988). De plus, des études subséquentes avec des préparations d'os à la fois *in-vitro* (Freitag JJ 1979, Goltzman D 1978) et *in-vivo* (Calvos MS 1985) et de rein *in-vitro* (Goltzman D 1976) ont démontré que la PTH(1-84) est capable d'exercer ses actions sans qu'il y ait besoin d'une transformation en fragments. Même si les fragments amino-terminaux ont été détectés occasionnellement en insuffisance rénale ou en hyperparathyroïdie primaire (Canterbury JM 1972, Canterbury JM 1973, Goltzman D 1980), les dosages de la PTH amino-terminale chez l'individu normal n'ont jamais fourni d'évidences solides pour valider leur existence.

V. 2 PROCESSUS D'INACTIVATION BIOLOGIQUE.

L'inactivation de la PTH intacte, par le métabolisme périphérique et glandulaire, permet à l'organisme de se débarrasser de la PTH biologiquement active lorsque la calcémie est normalisée ou élevée. Cette inactivation de la PTH(1-84) est d'autant plus importante dans un système où l'organisme doit répondre rapidement à tout changement de Ca. Cette explication pourrait être valable pour le métabolisme glandulaire de la PTH, par exemple en hypercalcémie où l'hormone synthétisée est dégradée et où les fragments

représentent la forme sécrétoire dominante. Cependant, en tenant compte de l'existence du récepteur C-PTH ainsi que des divers effets rapportés impliquant les fragments carboxylterminaux, le métabolisme périphérique de la PTH intacte ne peut être considéré comme une simple inactivation de la PTH intacte.

V. 3 PARATHORMONE COMME POLYHORMONE

En plus du rôle connu de la PTH intacte dans la régulation de la calcémie, de nombreuses études portant sur l'activité de différents fragments de PTH ont permis de les associer à d'autres actions biologiques *non-classiques*. Il est aussi suggéré qu'il existe en plus du récepteur PTH/PTHrP, d'autres récepteurs spécifiques à la région intermédiaire (24-48) et à la région carboxylterminale (53-84) de la PTH et que ces récepteurs seraient impliqués dans les actions biologiques *non-classiques* de la PTH. Différentes activités associées à différentes régions de la PTH permettraient de la considérer comme une polyhormone. Le concept de la polyhormone, développé par Mallette (1994), définit une polyhormone comme étant un polypeptide avec plus d'une région biologiquement active, réagissant chacune avec son propre récepteur localisé au niveau du tissu cible. Selon cette notion la PTH pourrait être considérée comme une polyhormone. En effet, les trois différentes régions de la PTH pourraient être associées à différentes activités. 1) La région amino-terminale avec la régulation du métabolisme phosphocalcique, 2) la région intermédiaire, ou mid-région, avec la régulation de la réplication cellulaire et de l'ostéogénèse et 3) la région carboxyl-terminale avec la régulation de l'activité des

ostéoblastes et de la différenciation cellulaire (**fig 9**). Cependant, ces hypothèses nécessitent d'être renforcées. En raison de ces nouvelles hypothèses, la compréhension de l'immunohétérogénéité de la PTH circulante est capitale dans l'appréciation de l'activité biologique de l'hormone.

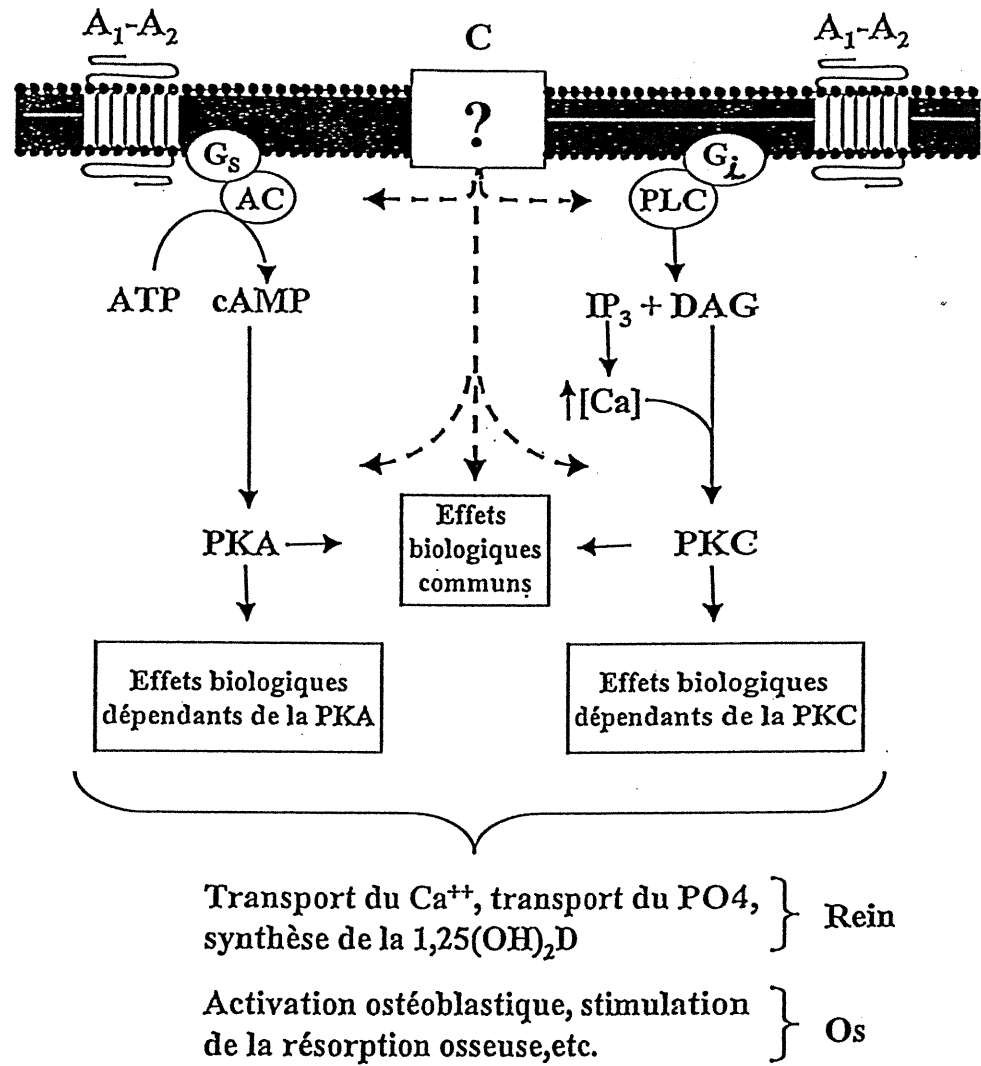


Figure 9. Effets biologiques de la PTH. Interaction des formes moléculaires circulantes avec différents récepteurs.

1) **La région aminotermine, (1-34)**

L'hydroxylation de la 25-hydroxyvitamine D en $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ dépend de la région aminotermine (1-34) de la PTH et est médiée par l'activation de l'AMPc. Cependant, d'autres actions médiées par l'intermédiaire de l'activation du système de messenger secondaire impliquant la protéine kinase C et le calcium intracellulaire ont été rapportées. En effet, l'augmentation de l'excrétion rénale du phosphate (Puschett JB 1981), le transport du phosphate dans les cellules OK (Cole JA 1989) de même que l'effet des analogues de la PTH(1-34) (Muff R 1992) ont été observés à des niveaux de PTH(1-34) de l'ordre du picomolaire, concentrations où l'AMPc ne peut être activé. Ces effets sont médiés par un messenger secondaire impliquant la protéine kinase C (Muff R 1992) et l'activation de cette dernière par le phorbol myristate affecte le transport du phosphate sans modifier les niveaux d'AMPc (Kaufman M 1991).

2) **La région-mid, (24-48)**

Certains effets de la PTH(1-34) sur les cellules osseuses et rénales peuvent être reproduits avec de plus petits fragments de la région amino-terminale et sans l'activation de l'AMPc. L'étude de Schlüter sur les chondrocytes et les cellules rénales (Schlüter K 1989) a démontré que la région-mid, plus précisément la séquence 30-34, possédait une activité mitogénique indépendante de l'activation de l'AMPc. L'étude *in-vivo* de D'Amour

et al (D'amour P 1981) chez le chien renforçait l'idée d'un rôle possible de la région-mid de la PTH en démontrant que 60% de l'extraction hépatique de la PTH(1-84) et sa dégradation subséquante dépendait de la région (28-48). On a aussi démontré que l'activation *in-vitro* de la créatinine kinase, l'augmentation de la prolifération des cellules ROS 17/2.8 et des cellules osseuses embryonnaires de rat par la région (28-48) de la PTH (Sömjen D1990, Sömjen D1991). Puisque ces effets ne dépendaient pas de l'activation de l'AMPc mais plutôt du calcium intracellulaire, ils pourraient être médiés par la protéine kinase C liée aux canaux calciques présents dans ces cellules. Mayer *et al* ont suggéré l'existence possible d'un récepteur spécifique pour la région mid au moyen de la liaison de la ²⁷Tyr-hPTH(28-48) avec les cellules ROS 17/2.8, et du déplacement du traceur par la hPTH(28-48) qui était dix fois plus puissant que la hPTH(1-34) dans l'étude de liaison compétitive (Mayer H 1992. Chugai forum).

3) La région carboxyl-terminale, (53-84)

Les études de liaison utilisant la ¹²⁵I-bPTH(1-84) biologiquement active et les fragments carboxyl-terminaux synthétiques comme agents compétitifs, ont démontré que la région (53-84) se liait de façon saturable et réversible aux membranes de cellules osseuses et rénales (Rizzoli RE 1983, Rao LG 1985, MacKee MD 1985). Plusieurs effets biologiques reliés à cette région ont été rapportés et seront discutés dans la section des récepteurs. Parmi ces actions, on note l'augmentation de l'activité de la glucose-6-phosphate déshydrogénase dans les cellules tubulaires rénales (Arber CE 1980), de la

phosphatase alcaline dans les cellules ostéoblastiques et l'inhibition de l'effet mitogénique de la PTH(1-34) sur la formation osseuse endochondrale chez la souris (Silbermann M 1991). Ces études suggèrent que la région (53-84) possède des effets biologiques distincts de ceux de la PTH intacte et qu'elle pourrait exercer ses actions par l'intermédiaire d'un récepteur carboxyl-terminal caractérisé récemment (Inomata N 1995).

CHAPITRE 2

ACTIVITÉ BIOLOGIQUE DE LA PARATHORMONE

LES RECEPTEURS DE LA PTH.

Il existerait plus d'un récepteur pour la PTH. Un premier, cloné et bien caractérisé, le récepteur PTH/PTHrP classique ou PTH/PTHrP-1 prédomine dans le rein et l'os, les organes cibles principaux de la PTH. Un deuxième, récemment cloné, le récepteur PTH-2 ne reconnaît que la PTH. Il possède une homologie de séquence de l'ordre de 51% avec le récepteur classique et appartient à la même famille de récepteur que ce dernier. Son expression est détectée surtout dans le cerveau et le pancréas, de façon moindre dans les testicules et le placenta. Il n'est pas détecté dans le rein ni dans l'os (Usdin TB *et al* 1995). Finalement un troisième, un récepteur qui reconnaît spécifiquement la partie carboxyl-terminale de la PTH, le récepteur C-PTH, a été identifié au cours des années et étudié plus récemment sur les ostéoblastes (ROS 17/2.8) et les cellules parathyroïdiennes de rat (PT-r3) (Divieti P 2001).

I. LE RÉCEPTEUR CLASSIQUE PTH/PTHrP

Le récepteur PTH/PTHrP classique fait partie de la grande famille des récepteurs couplés aux protéines G (Abou-Samra AB 1992, Bringhurst FR 1993), caractérisés par l'existence de sept domaines transmembranaires. Ce récepteur se lie de façon équivalente à la PTH et au peptide apparenté à la PTH (PTHrP) par leur structure amino-terminale, et ne reconnaît pas les fragments carboxyl-terminaux de la PTH (Pines M 1994). La PTH exerce ses effets biologiques classiques par l'intermédiaire du récepteur PTH/PTHrP

présent à la surface des ostéoblastes et des cellules tubulaires rénales (Urena P 1993, Tian J 1993). L'activation de ce récepteur par la PTH est une étape clé dans le contrôle du métabolisme phosphocalcique. Au-delà de son rôle sur le métabolisme phosphocalcique ce récepteur, via le PTHrP, a un rôle important dans le développement embryonnaire tel que démontré par l'étude d'inactivation ciblée du gène de ce récepteur chez la souris. Une délétion du gène entraîne des troubles majeurs du développement osseux particulièrement au niveau endochondral (Landske B. 1996, Karaplis AC 1994). L'expression de l'ARNm de ce récepteur prédomine dans le rein et l'os, organes cibles de la PTH, mais la répartition tissulaire de ce messager est très vaste. En effet, plusieurs transcripts de tailles différentes ont été détectés par hybridation avec la même sonde de cDNA dans différents tissus tels l'aorte, le coeur, le poumon, la rate, l'estomac, la vessie, le cerveau, le cervelet, les glandes surrénales, les glandes mammaires, le foie, la peau, les testicules et l'ovaire (Urena P 1993). Dans ces tissus le PTHrP pourrait avoir surtout un rôle paracrine.

Régulation de l'expression du récepteur

La régulation de l'expression de l'ARNm du récepteur n'est pas encore parfaitement connue. Des études de liaison, de voies de messenger secondaire, et d'expression de l'ARNm ont permis d'identifier certains facteurs impliqués dans cette régulation. Les facteurs qui augmentent l'expression de l'ARNm du récepteur sont le calcitriol dans les cellules épithéliales du tubule rénal de souris (Sneddon 1998), et dans le rein entier et dans l'épiphyse et la métaphyse osseuse de rat (Turner 1995), l'endotoxine

dans les cellules spléniques de souris (Funk 1993), l'interleukine-2 dans les cellules T (Ikeda 1993), la dexaméthasone (Urena 1994) et le TGF-béata dans les cellules ROS 17/2.8 (MacCauley 1994). Les facteurs qui diminuent l'expression de l'ARNm du récepteur sont la PTH dans les cellules osteoblastiques, SaOs-2 (Fukayama 1994), et dans l'épithélium tubulaire proximal de type OK (Abou-Samra 1994), le PTHrP dans le rein entier avec insuffisance rénale (Soifer 1993) et dans les cellules ROS 17/2.8 (Jüppner 1993), la dexaméthasone qui potentialise l'effet de la PTH dans l'épithélium tubulaire proximal de type OK (Abou-Samra 1994). Il pourrait exister une régulation spécifique à chaque tissu . Ainsi le calcitriol aurait un effet positif au niveau rénal (Sneddon *et al* J Am Soc Nephrol ; 4 :729, 1993; Tuner *et al*, Endocrinol 136 :3751-58, 1995) et négatif au niveau osseux (Gonzalez et Martin, J Am Soc Nephrol, 5 : 880-, 1994).

I.1 SECONDS MESSAGERS.

Tous les effets de la PTH sur l'os, le tubule rénal, et sur d'autres organes seraient médiés par 2 systèmes de second messenger, soit l'AMPc via la protéine kinase A et le calcium intracellulaire via la protéine kinase C. L'activation de ces deux voies différentes par une même hormone pourrait être expliquée par un couplage à deux protéines G différentes, les protéines G_s et $G_{(i,q)}$. La liaison de la PTH au récepteur lié à la protéine G_s amène une production d'AMPc. Ce dernier va se lier à la sous-unité régulatrice de la protéine kinase A qui va à son tour phosphoryler les résidus sérine et thréonine des

protéines cibles. L'activation de la protéine $G_{(i,q)}$ active la production des inositides triphosphates et du diacylglycérol, qui augmentent le calcium libre intracellulaire et stimulent la protéine kinase C.

I.2 INTERACTION STRUCTURALE AVEC LA PARATHORMONE

La découverte de l'activation de l'adénylate cyclase (AC) par la PTH au niveau du rein (Chase LR 1967) et de l'os (Chase LR 1969) représente une découverte majeure, puisqu'elle permet d'étudier l'interaction de la PTH avec son récepteur. La PTH(1-84) est la seule forme circulante biologiquement active de PTH et sa région aminoterminal, (1-34), est responsable de l'activité biologique classique de la PTH. De ces 34 premiers acides aminés, les 3 premiers sont nécessaires à l'activation de l'adénylate cyclase. Cependant, une étude *in-vivo* chez le chien a démontré que l'action hypercalcémiant de la PTH(3-34) pouvait être observée sans production d'AMPc, et donc l'activité biologique de la région (1-34) pourrait aussi être médiée par d'autres voies de signalisation (Serge GV 1985). La région 10-15 et surtout la région 24-34 sont impliquées dans la liaison avec le récepteur. L'activation du système de la phospholipase C *in vitro* se ferait par la région (28-34) (Sömjen D 1990, Sömjen D 1991, Mayer H 1992, Schlüter KD 1989, Silverman R 1991, Shurtz-Swirski R 1990, Erdmann S 1996).

I.3 ACTIONS PRINCIPALES.

La PTH est considérée comme le régulateur principal de la calcémie. Elle exerce son rôle en agissant sur trois tissus cibles, l'os, le rein et l'intestin. La réponse physiologique de l'os à la PTH dans la régulation de la calcémie est biphasique, elle consiste en une libération de calcium, d'abord à partir des surfaces osseuses ostéocytaires, puis plus lentement à partir des dépôts calciques. Dans le premier temps, la résorption osseuse est accrue, suite à une augmentation de l'activité des ostéocytes et des ostéoclastes. Pour pouvoir répondre à la demande prolongée en calcium ou dans les états d'hyperparathyroïdie primaire ou secondaire, la PTH va augmenter la résorption osseuse déjà existante en activant la transformation de cellules mésenchymateuses souches en ostéoclastes afin d'en augmenter le nombre. La résorption et la formation osseuses sont couplées, mais la résorption l'emporte en général dans un premier temps. La libération de phosphate secondaire à la résorption osseuse ne provoque pas d'hyperphosphotémie grâce à l'effet phosphaturiant de la PTH. À l'inverse de l'effet catabolique, l'effet anabolique de la PTH a été rapporté surtout lors de l'administration discontinue de PTH. La PTH est capable de stimuler la formation osseuse en recrutant des osteoblastes (Slovik DM 1986, Tam CS 1982).

Les trois actions majeures de la PTH au niveau rénal sont l'augmentation de la réabsorption tubulaire de Ca, l'augmentation de l'excrétion urinaire de phosphate et l'augmentation de la conversion de 25(OH)VitD en 1,25(OH)₂VitD. La PTH provoque une réabsorption tubulaire distale du Ca. En général, > 50% du calcium filtré est réabsorbé

par transport passif dans le tubule proximal. Cependant, la présence des récepteurs pour la PTH est également rapportée sur le versant basolatéral des cellules épithéliales (Morel F 1981) et donc le transport transépithélial du calcium à ce niveau pourrait être régulé par la PTH. Du calcium filtré restant, environ 10% est réabsorbé dans l'anse de Henle, et 10 % dans la partie distale du tubule contourné distal sous l'influence de la PTH. Malgré ce faible pourcentage, cette dernière portion joue un rôle clé dans la réabsorption rénale du calcium. La réabsorption tubulaire du calcium se fait de façon paracellulaire et transcellulaire. Il est démontré qu'il existe un système de transport du Ca à haute affinité dépendant de l'ATP dans les tubules proximaux et distaux (Ramachandran C and Brunette. *Biochem J*, 257:257-264.1989). L'étude avec vésicules membranaires basolatérales de tubules proximaux et distaux purifiés de rein de lapin a démontré qu'il n'existe pas de différence majeure entre les propriétés du système de transport du Ca dépendant de l'ATP dans ces deux membranes (Ramachandran C 1991). Les différences de modulation du transport du Ca induites par la PTH dans ces deux parties du rein seraient dues aux différents systèmes de second messager, même s'il est bien connu que, comme au niveau osseux, l'action de la PTH au niveau rénal est accompagnée d'une augmentation de l'AMPc. En plus, il est démontré que la PTH stimulerait la production d'inositol triphosphate et celle de diacylglycérol dans les cellules rénales du tubule proximal (Hruska KA 1987).

L'effet inhibiteur de la PTH sur la réabsorption du phosphate dans la partie proximale de tubule rénal est bien connu et médié par une inactivation du cotransporteur Na/P. Cependant, les mécanismes d'action de la PTH à ce niveau restent à déterminer. La

PTH régule la synthèse rénale de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en induisant l'activité enzymatique de la 1 alpha-hydroxylase responsable de sa formation et en inhibant celle de la 24 hydroxylase responsable de son inactivation. La PTH n'a pas d'effet direct sur l'intestin, son action est plutôt médiée par le biais de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, qui entraîne une augmentation de l'absorption intestinale du calcium.

II. LE RÉCEPTEUR DE LA RÉGION CARBOXYL-TERMINALE, (C-PTH).

II.1 Description

L'existence d'un récepteur spécifique pour la région carboxyl-terminale et l'implication possible de ce récepteur dans l'activité biologique de la PTH représentent un chapitre nouveau dans l'activité biologique de l'hormone. De nombreuses études ont contribué à cet avancement.

Arber (Arber CE 1980) a été le premier à suggérer que les fragments carboxyl-terminaux pouvaient avoir certaines activités biologiques. L'activation de la glucose-6 phosphate déhydrogénase du tissu rénal par la PTH a révélé deux pics d'activité biologique associés aux régions 1-34 et 53-84. Des études de déplacement de traceurs (Rao LG 1985, McKee MD 1985, DeMay M 1985, Inomata N 1995, Takasu H 1996) ont suggéré l'existence d'un récepteur spécifique pour la région carboxyl-terminale. Les premières études ont été effectuées sur des membranes rénales (Rao LG 1985) et des cellules ostéoblastiques de rat (ROS 17/2.8) par le laboratoire de Murray (McKee MD 1985). En utilisant la ^{125}I -bPTH(1-84) biologiquement active comme traceur, il a démontré

l'existence de deux sites de liaison spécifique, un premier de haute affinité spécifique pour la région amino-terminale et un deuxième de faible affinité spécifique pour la région carboxyl-terminale. Ce dernier site n'était pas couplé à l'activation de l'adénylate cyclase. Cependant, cette liaison était saturable et réversible. Ces résultats ont été confirmés par Nakamoto (Nakamoto C 1993) qui a étudié l'influence de plusieurs fragments carboxyl-terminaux sur l'activité de la phosphatase alcaline dans les cellules ROS 17/2.8 traitées à la dexaméthasone. Il a démontré que l'effet stimulateur sur l'activité de la phosphatase alcaline dépendait de la région (53-84) de la structure de la PTH. La spécificité du récepteur C-PTH pour la région carboxyl-terminale de la PTH a été démontrée dans une étude de liaison utilisant la $^{125}\text{I}(\text{tyr}34)$ hPTH(19-84) (Inomata N 1995). Ces auteurs ont généré cet analogue de la hPTH(1-84), qui ne réagit pas avec le récepteur classique exprimé dans les cellules ROS 17/2.8 ou les cellules parathyroïdiennes de rat (PT-r3), et ont démontré une liaison de haute affinité du traceur avec ces cellules. Cette liaison est inhibée par la PTH(1-84) et par plusieurs fragments carboxyl-terminaux mais n'est pas inhibée par les fragments amino-terminaux ou mid-carboxyl-terminaux.

II.2 INTERACTION STRUCTURALE AVEC LA PARATHORMONE

L'activité biologique propre aux fragments carboxyl-terminaux de PTH a fait l'objet de nombreuses études *in-vitro* sur les cellules osseuses ou cartilagineuses (Murray TM 1988, Murray TM 1991, Sutherland MK 1994, Nakamoto C 1993, Kaji H 1994, Tsuboi T 1998, Erdmann S 1998). Ces études suggèrent un rôle possible des fragments

carboxyl-terminaux dans la fonction des ostéoblastes (Seitz PK 1995, Murray TM 1988) ainsi que l'expression (Erdmann S 1996) et la différenciation (Silbermann M 1991) des chondrocytes (**Fig 10**).

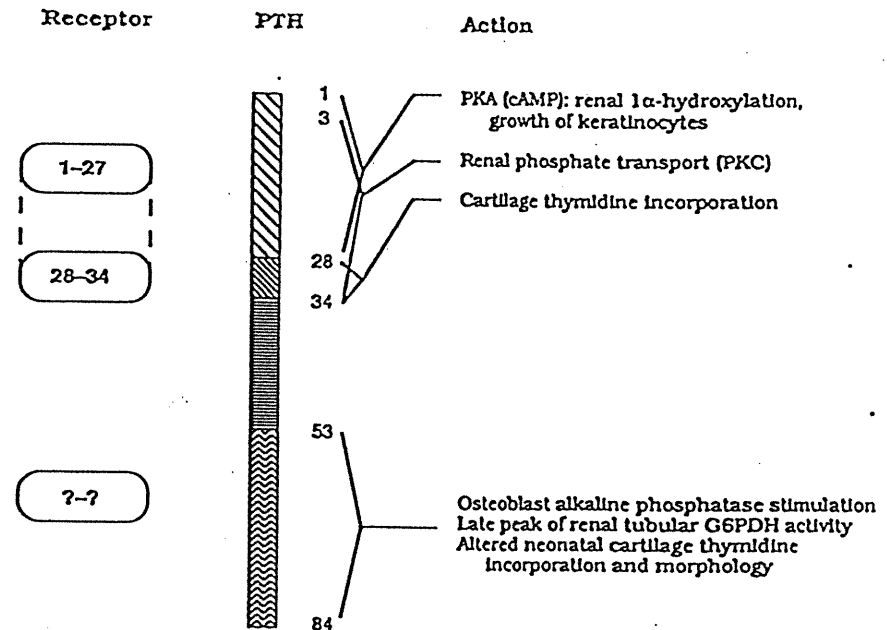


FIG. 8. Schematic diagram of the biologically active regions in PTH and their putative receptors. PKA and PKC represent protein kinases A and C, respectively. The 1-27 and 28-34 receptors are connected by dotted lines because the relationship between these two binding activities is not fully understood. The classic PTH-(1-34) receptor coupled to cAMP generation may also be coupled to the PKC pathway, but there may be a separate receptor mediating some or all of the effects of the 3-34 region on PKC (see text).

Figure 10: **Activité biologique de différentes régions de la PTH et les récepteurs**

Tiré de: Lawrence E. Mallette. Parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein as polyhormones. The Parathyroids. Basic and Clinical Concepts. Bilezikian JP, Marcus R, Levine MA Edts. Raven Press, Chap 12:177.1994.

La résorption osseuse est l'une des fonctions principales de la PTH et un effet des fragments carboxyl-terminaux sur la différenciation et l'activité des ostéoclastes a été rapporté par Kaji (Kaji H 1994). Cette étude a démontré que ces fragments sont capables de stimuler la formation des cellules ostéoclastiques (*osteoclast-like*), la résorption osseuse par les ostéoclastes matures en présence des ostéoblastes, et l'accélération de la formation des ostéoclastes à partir des cellules souches hémopoïétiques en absence des ostéoblastes. Ces effets pourraient donc être indirectement dus aux fragments via les ostéoblastes.

La région (53-84) est la région carboxylterminale la plus étudiée. Des études *in-vitro* ont permis d'attribuer certains effets biologiques à cette région: elle augmente l'activité de la glucose 6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) dans les cellules tubulaires rénales (Arber CE 1980), l'activité de la phosphatase alcaline dans les cellules ROS17/2.8 traitées à dexaméthasone (Murray TM 1988, 1991, Sutherland MK 1994, Nakamoto C 1993) et elle abolit l'effet mitogène de la PTH(1-34) au niveau du cartilage condylien néonatal (Silverman R 1991). Cette région est aussi capable de réguler l'expression de plusieurs gènes dans les cellules SaOS-2 humaines et cet effet du fragment (53-84) est distinct de ceux obtenus par la PTH(1-34). Parmi ces gènes on trouve celui de la phosphatase alcaline, de l'ostéocalcine et du récepteur de la vitamine D (Murray TM 1992). Parallèlement à ces effets observés au niveau osseux, des études menées sur la sécrétion de la PTH ont démontré que le fragment carboxyl-terminal est aussi essentiel pour le processing intracellulaire et la sécrétion de la PTH intacte (Lim SK 1992).

La région de la PTH impliquée dans la liaison avec le récepteur C-PTH et dans la signalisation du second messenger ne sont pas connues. Récemment, il a été rapporté que

la région (69-84) de la PTH est essentielle pour la liaison avec le récepteur C-PTH (Takasu H 1996). Le système de second messenger du récepteur C-PTH n'est pas encore bien défini. Les différences observées dans plusieurs études entre la PTH(1-84) et la PTH(1-34) sur différentes cellules *in-vitro* suggèrent que les fragments carboxyl-terminaux pourraient agir via le calcium intracellulaire (Erdmann S 1996, Massry SG 1994, Massry SG 1995a).

Régulation de l'expression du récepteur C-PTH

L'expression du récepteur C-PTH a été augmentée dans les cellules ostéoblastiques, ROS 17/2.8, par la PTH(1-84), la PTH(1-34) ou les analogues de l'AMPC. Cette augmentation n'a pas été observée dans les cellules PT-r3 (Inomata N 1995). Récemment, il a été démontré que ces récepteurs étaient exprimés abondamment dans les ostéocytes de souris «*knock-out*» pour le récepteur PTH/PTHrP (Divieti D 2001), et que ces cellules pouvaient être une cible pour la PTH intacte et ses fragments carboxyl-terminaux. Dans cette étude *in-vitro*, utilisant des ostéocytes qui exprimaient seulement le récepteur C-PTH, les auteurs ont démontré deux processus cellulaires influencés par le récepteur C-PTH, la communication intercellulaire et la survie cellulaire. En effet, ils ont noté un changement rapide de l'expression d'une protéine de la *gap-junction*, (C_x43) impliquée dans la communication cellulaire, de même qu'une augmentation de l'apoptose des ostéocytes.

CHAPITRE 3

ÉTUDES EXPÉRIMENTALES

PRÉMISSSES

- ◆ L'immunohétérogénéité de la PTH circulante s'explique par la présence en circulation d'une grande quantité de fragments carboxyl-terminaux considérés biologiquement inactifs et par une plus petite quantité de PTH intacte biologiquement active.
- ◆ La majorité des dosages de PTH intacte réagissent avec de gros fragments carboxyl-terminaux ayant une structure amino-terminale partiellement conservée, aussi appelés *non(1-84)PTH*. Leur origine n'a pas été étudiée.
- ◆ L'immunohétérogénéité de la PTH circulante est régulée de façon aiguë par la calcémie et de façon plus chronique par les besoins en PTH, le status en vitamine D et la calcémie.
- ◆ Des effets biologiques spécifiques de différents fragments carboxyl-terminaux ont été démontrés *in-vitro* en utilisant des cellules ostéblastiques ou cartilagineuses.
- ◆ L'existence d'un récepteur carboxyl-terminal de la PTH, différent du récepteur classique PTH/PTHrP, a été démontré.
- ◆ Il a été suggéré que le récepteur C-PTH serait responsable de différences observées entre la PTH(1-34)PTH et la PTH (1-84) en ce qui trait à la distribution et la spécificité tissulaire, et à certains aspects de l'activité biologique. Ce récepteur serait aussi responsable de l'activité biologique des fragments carboxyl-terminaux de la PTH dans divers systèmes.

HYPOTHÈSES

◆ La première partie de notre projet vise à étudier l'origine de la forme *non(1-84)*PTH détectée par les dosages d'hormone intacte. L'origine périphérique est étudiée *in-vivo* chez le rat normal via le métabolisme périphérique de la hPTH(1-84) administrée par voie intraveineuse. L'influence de l'insuffisance rénale aiguë sur ce phénomène est étudiée chez le rat néphrectomisé. L'origine glandulaire est étudiée *in-vitro* via l'analyse des formes moléculaires de PTH sécrétées par les cellules parathyroïdiennes humaines obtenues à partir d'adénomes parathyroïdiens provenant de patients avec hyperparathyroïdie primaire. Les formes sécrétées sont étudiées en parallèle avec les formes sériques obtenues chez des patients avec la même maladie.

◆ Dans la deuxième partie, nous avons étudié l'influence de certains fragments carboxyl-terminaux sur l'activité biologique de la PTH *in-vivo*. L'étude a consisté à étudier les effets biologiques classiques de la PTH, en présence ou en absence de fragments carboxyl-terminaux utilisés à différentes concentrations chez le rat anesthésié et parathyroïdectomisé.

RÉSULTATS

INTRODUCTION

La PTH circulante est composée principalement de fragments carboxyl-terminaux (C-PTH) et d'une petite quantité de PTH(1-84). Des études récentes ont démontré que la majorité des dosages de PTH intacte (I-PTH) réagissaient avec de gros fragments carboxyl-terminaux ayant une structure amino-terminale partiellement préservée aussi appelés *non(1-84)* PTH. Ces fragments ont un intérêt particulier de par la possibilité qu'ils auraient de réagir avec le récepteur PTH/PTHrP et d'interferer avec l'activité biologique de la hPTH(1-84). La *non-(1-84)*PTH s'accumule en insuffisance rénale et finit par représenter 40-50% de l'immunoréactivité de la I-PTH par rapport à seulement 15-20% chez l'individu normal. L'interprétation des niveaux circulants d'hormone intacte et de ses fragments via le ratio C-PTH/I-PTH nous démontre que l'immunoréactivité est un phénomène dynamique influencé par la calcémie. Plusieurs études ont démontré que les fragments carboxyl-terminaux trouvés en circulation proviennent à la fois d'une sécrétion par les parathyroïdes et du métabolisme périphérique de la PTH(1-84). Nous avons voulu vérifier si ces notions s'appliquaient aussi à la *non(1-84)*.

L'origine périphérique de la *non(1-84)*PTH a été étudiée au cours de l'administration intraveineuse de hPTH(1-84) chez le rat normal. Les formes générées par le métabolisme périphérique de la hPTH(1-84) injectée ont été fractionnées par HPLC et analysées par planimétrie. L'influence de l'insuffisance rénale sur ce phénomène a été étudiée chez le rat néphrectomisé.

L'origine glandulaire de la *non(1-84)PTH* a été étudiée au moyen de préparations cellulaires obtenues à partir d'adénomes parathyroïdiens humains. La sécrétion a été étudiée à court terme à la calcémie originale de chaque patient, et ce en parallèle avec l'étude des formes circulantes de PTH dans leur sérum. Les sérums et les milieux contenant les formes sécrétées ont été analysés de la même façon que dans l'étude *in-vivo* chez le rat.

Les résultats obtenus lors de cette étude sont présentés dans l'article suivant.

**ORIGIN OF PARATHYROID HORMONE (PTH) FRAGMENTS
DETECTED BY INTACT-PTH ASSAYS**

LOAN NGUYEN-YAMAMOTO, LOUISE ROUSSEAU,
JEAN-HUGUES BROSSARD, RAYMOND LEPAGE⁺ AND PIERRE D'AMOUR

Centre de recherche, Centre hospitalier de l'Université de Montréal - Hôpital Saint-Luc

and

Departments of Medicine and Biochemistry⁺

Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Abbreviated title: Origin of non-(1-84)PTH

European journal of endocrinology 2002 in press

ABSTRACT**Origin of parathyroid hormone (PTH) fragments detected by intact-PTH assays**

Background: Intact parathyroid hormone (I-PTH) assays react with non-(1-84) PTH, large carboxyl-terminal (C) fragments with a partially preserved amino-terminal (N) structure. They account for up to 50% of I-PTH in renal failure and may be implicated in PTH resistance. We wanted to know if they were secreted by the parathyroid glands and generated by peripheral metabolism of PTH (1-84).

Methods: Anesthetized normal (N) and nephrectomized (NPX) rats were injected IV with 1.5 μ g of hPTH(1-84). Blood was obtained from 8 rats at 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48 and 96 min. I-PTH (Allegro I-PTH) was measured in all samples. Pools of serum were fractionated by HPLC at each time point and the fractions assayed to quantitate hPTH(1-84) and non-(1-84)PTH. Secretion studies were performed with dispersed cells from 5 parathyroid adenomas. The serum of 10 patients with primary hyperparathyroidism and cell supernatants were fractionated by HPLC and were analyzed as just described.

Results: hPTH(1-84) disappeared from serum biexponentially. The half-life of the first exponential was similar in N (2.08 min) and NPX (1.94 min) rats, while that of the second was longer in NPX rats (32.4 vs 20.9 min). The residual quantity of hPTH(1-84) under the curve was greater in NPX (6964 ± 2392 pmol) than in N rats (3229 ± 561 pmol ; $p < 0.001$). Non-(1-84)PTH concentration was maximal at 8 min in both groups and higher in NPX (92.8 ± 13.8 pmol/L) than in N rats (38.8 ± 7.2 pmol/L ; $p < 0.01$). The area under the curve

of non-(1-84)PTH was also greater in NPX (1904 ± 405 pmol) than in N rats (664 ± 168 pmol ; $p < 0.001$). All parathyroid adenomas secreted non-(1-84)PTH. It represented $21.1 \pm 3.9\%$ of secreted and $32.5 \pm 1.3\%$ of circulating I-PTH in primary hyperparathyroidism.

Conclusions: Non-(1-84)PTH, like other C-PTH fragments, originates from both the peripheral metabolism of hPTH(1-84) and from parathyroid gland secretion. Renal failure influences its concentration by increasing the amount of substrate available and by reducing non-(1-84)PTH clearance. Its higher proportion in serum relative to cell supernatants in primary hyperparathyroidism reflects the added role of peripheral metabolism and the longer half-life of fragments.

Index words: Parathyroid hormone, calcium, renal failure, parathyroid glands.

INTRODUCTION

The existence of circulating carboxyl-terminal (C) fragment(s) of parathyroid hormone (PTH) with a partially preserved amino-terminal (N) structure is a relatively recent finding (1-3). These fragments are of particular interest because, at least theoretically, they could interact with the classic PTH/PTHrP receptor to modify some aspects of PTH(1-84) bioactivity. They were first identified by analyzing HPLC-fractionated sera with Nichol's I-PTH radioimmunoassay (1). This assay and other similar assays do not react with hPTH(1-34) or C-fragments without a partially preserved N-structure (4-5) but they do react with hPTH(7-84), a prototype of these circulating C-fragments (1-3). Such is the cause because most antisera raised against N-PTH have their epitopes in region 15-34 of the PTH structure (6) and rarely in region 1-12. These fragments behave like other C-PTH fragments. Their concentration relative to that of hPTH(1-84) increases in hypercalcemia and decreases in hypocalcemia (1,2). They also accumulate in renal failure to account for 40-50% of I-PTH immunoreactivity while representing only 15-20% in normals (1-3).

Recent data suggest that synthetic hPTH(7-84) alone decreases ionized calcium concentration in thyroparathyroidectomised rats (7,8) and antagonizes the calcemic effect of hPTH(1-84) (8,9) and hPTH(1-34) (8) in the same animals, raising the possibility that circulating C-fragments with a partially preserved N-structure could do the same. This could implicate them in the PTH resistance of renal failure (7).

We were thus interested to see how these fragments were generated *in vivo* and how acute renal failure affected their concentration. We wanted to know if, like other C-PTH fragments, they had a dual origin from both peripheral metabolism (9,10) and secretion by the parathyroid glands (11-14). The data to be presented here suggest a similar origin and behavior to other C-PTH fragments.

MATERIALS AND METHODS

Metabolism of hPTH(1-84) in normal and acutely nephrectomized rats:

Experimental protocol

This study was performed in male Sprague-Dawley rats weighing 275-300 g, under general anesthesia (Somnotol 6 mg/100 g). Half the rats were nephrectomized bilaterally via a posterior surgical approach prior to injection. hPTH(1-84) (Bachem, Torrance, CA, USA) was dissolved in barbital buffer, 0.05 M, pH 8.6, containing 15% normal rat serum, at a concentration of 1.5 µg/500 µl, and injected in a jugular vein. Four groups of 8 normal (N) or nephrectomized (NPX) rats were studied at the following time points: group 1, 2 and 4 min, group 2, 6 and 8 min, group 3, 12 and 24 min, group 4, 48 and 96 min. Blood was collected through a jugular vein at the first time point and through exsanguination via the abdominal aorta at the second time point. Serum was stored at -75°C in aliquots until processed further or analyzed. The protocol was approved by the Animal Care Committee of our centre in compliance with Canadian Council on Animal Care guidelines.

Processing and analysis of samples

I-PTH was measured in serum samples from all groups by a commercial I-PTH radioimmunoassay which is non-reactive to endogenous rat PTH (Allegro I-PTH, Nichol's Institute, San Juan Capistrano, CA, USA). This assay has been demonstrated to

react in an equimolar fashion with hPTH(1-84) and hPTH(7-84) (2,3). It also reacts with circulating C-fragments having a partially preserved N-structure, also called non-(1-84) PTH in prior publications (2,3). A pool of serum from 8 rats of each group at each time point was extracted in Sep-Pak Plus C₁₈ μ cartridges (Waters, Chromatographic Division, Wilford, MA, USA) (15) and eluted with 3 ml of 80% acetonitrile in 0.1% trifluoroacetic acid (TFA). Acetonitrile was evaporated, and the residual volume freeze-dried. The samples were reconstituted in 0.6 ml of 0.1% TFA for HPLC analysis. Each sample was loaded on a C₁₈ μ Bondapak analytical column of 3.9 x 300 mm (Waters), and eluted with a non-continuous linear gradient of acetonitrile 15 to 50% in 0.1% TFA, delivered at 1.5 ml/min for 65 min by BioRad Model 2700 HPLC (Richmond, CA, USA). 1.5-ml fractions were collected in polypropylene tubes precoated with 0.1% BSA in water. The acetonitrile present in each fraction was evaporated and the residual volume freeze-dried. Each fraction was reconstituted to 1 ml with 0.7% BSA in water, and appropriate volumes assayed for I-PTH. PTH recovery during all these procedures was 84.2 \pm 12.2% (N=10). hPTH(1-84) and hPTH(7-84) (Bachem) processed in rat serum, as described, eluted as single peaks at the expected positions, demonstrating no degradation during the above procedures.

Secretion of PTH by parathyroid cells from human parathyroid adenomas

Experimental protocol

Parathyroid tissue (230-500 mg) was obtained from 5 parathyroid adenomas in patients operated for primary hyperparathyroidism. Blood was also obtained from 10 similar patients prior to surgery to study I-PTH molecular forms present in the circulation.

Processing and analysis

Parathyroid glands were trimmed of exogenous tissue, sliced and dispersed with collagenase-DNase, according to Brown *et al.* (16,17), at 37°C for 45-60 min. The cell suspension was filtered through 200 µm mesh and washed 3 times with culture medium to be described. Cell viability, assessed by the trypan blue exclusion technique, was >95%.

Parathyroid cells were incubated in DMEM F₁₂ medium without NaHCO₃ and buffered with 0.015 M HEPES, pH 7.4, 5% FBS and 0.2% BSA at a concentration of 200,000 to 300,000 cells/ml of medium. Calcium concentration was adjusted with CaCl₂ to the original patient serum calcium concentration. Secretion was studied over 1 to 2 h in a humidified incubator at 37°C. After incubation, the cells were centrifuged in a pellet, and the supernatant was collected for further analysis. Storage and processing of sera and supernatants for HPLC analysis were similar to the preceding project in rats. Recovery of I-PTH immunoreactivity during these procedures was 103.4±17.2% (N=10). The same I-PTH assay described previously was used to analyse all HPLC profiles.

Statistical analysis

The results are means \pm S.D. Comparisons were made on logarithmic concentrations by a two way repeated measures ANOVA followed by a Tukey test. Planimetric evaluation of HPLC profiles was undertaken with the Origin 4.1 (Microcal Software, Northampton, MA, USA). Percentages of hPTH(1-84) and non-(1-84)PTH were obtained in each case and applied to total I-PTH data for proper quantitation of both molecular forms at each time point and for each rat. The same software was used to study the kinetics of hPTH(1-84) disappearance in both groups, employing a standard formula for half-life ($t_{1/2}$) and the elimination constant (K_e). hPTH(1-84) and non-(1-84)PTH were also quantitated similarly in the serum of patients with primary hyperparathyroidism and in the supernatant of cells incubation.

RESULTS

Metabolism of hPTH(1-84) in N and NPX rats

Figure 1 illustrates the disappearance of injected hPTH(1-84) in N and NPX rats. Each point represents the mean \pm SD for 8 rats. In both groups, I-PTH immunoreactivity decayed biexponentially with a rapid first component over the first 10 min and a slower second one over the rest of the study. Mean I-PTH concentrations were significantly higher at 2 min ($p < 0.05$) and from 4 to 96 min ($p < 0.001$) in NPX rats. These decay curves were separated into their components, hPTH(1-84) and non-(1-84)PTH, by HPLC analysis of a pool of sera at each time-point. The fractions were assayed with I-PTH, and peaks were quantitated by planimetry. This is illustrated for both groups at 8, 24 and 48 min in Figure 2. Only hPTH(1-84) was identified at 2 and 4 min at position 52 min. Large fragments with a partially preserved N-structure were clearly identified as a shoulder to the hPTH(1-84) peak at 6 and 8 min at position 50 min.. Their concentration was maximal 8 min after the injection of hPTH(1-84) in both groups and higher in NPX (92.8 ± 13.8 pmol/L) than in N rats (38.8 ± 7.2 pmol/L; $p < 0.001$). They reached % maximum at 24 min where they represented 40% of I-PTH immunoreactivity in both groups. On all HPLC profiles, more fragments and hPTH(1-84) were observed in NPX rats than in N rats. The HPLC percentages of hPTH(1-84) and fragments at each time point were next applied to individual rat values of Figure 1 to obtain Figure 3. The half-life of the first exponential

of hPTH(1-84) decay ($N=2.08$ min; $NPX = 1.94$ min) was similar in both groups. The half-life of the second exponential was shorter in N (20.9 min) than in NPX (32.4 min). This caused the residual quantity of hPTH(1-84) under the curve to be more than twice as large in NPX (6964 ± 2392 pmol) compared to N rats (3229 ± 561 pmol; $p < 0.001$). The quantity of non-(1-84)PTH under the curve was three times as large in NPX (1904 ± 405 pmol) than in N rats (664 ± 168 pmol; $p < 0.001$).

Secretion of PTH by parathyroid cells from human parathyroid adenoma

Figure 4 illustrates the HPLC profiles of immunoreactive PTH in the serum of patients with primary hyperparathyroidism. Ten patients were assessed by I-PTH assay, and 2 peaks were identified in all patients with 3 in some patients. The major peak, at position 52, co-migrated with hPTH(1-84) and represented $67.8 \pm 1.4\%$ of the immunoreactivity. The second peak migrated slightly in front of hPTH(1-84) at positions 48-50 and represented $27.7 \pm 1.8\%$ of I-PTH immunoreactivity. This peak migrated similarly to non-(1-84)PTH, identified during the peripheral metabolism of hPTH(1-84) in rats. A third minor peak was also present in front of the last one, at positions 42-46, mainly in patients with higher basal PTH levels, and represented $4.5 \pm 1.7\%$ of immunoreactivity. Figure 5 illustrates similar results for supernatants of parathyroid cells obtained from parathyroid adenomas. Again, with I-PTH assay, 3 peaks were identified. Within 1 position, these peaks eluted similarly to those described for serum and represented respectively, position 52, $78.9 \pm 4\%$, position 48-50, $18.2 \pm 3.8\%$, and position 42-46, $2.9 \pm 0.6\%$. The amount of fragments identified in

cell supernatants was significantly less than the amount observed in serum (21.1 ± 3.9 vs 32.5 ± 1.3 ; $p < 0.001$). When synthetic hPTH(1-84) was processed in hypoparathyroid serum a single peak, migrating at position 52, was identified.

DISCUSSION

This study was designed to examine the origin of non-(1-84)PTH, large C-fragments of PTH with a partially preserved N-structure (1-3). These fragments could theoretically activate the protein kinase-C domain of the classical PTH/PTHrP receptor (18-22), modulate hPTH(1-84) biological effects (7,8,22) or react with the less well-defined C-PTH receptor (23-26).

To study the origin of these fragments, we used different experimental models. Rats, either N or NPX, have served extensively to understand the metabolism of various PTH(1-84) preparations (9,10,27,28), and they still appear to be the best model to examine the generation of fragments from injected hPTH(1-84). Parathyroid adenomas obtained at surgery have also been used to study the secretion of C-PTH fragments by the parathyroid glands (11,12). To ensure that the glandular secretory products were relevant to those found in the circulation, we also looked at circulating molecular forms of PTH in patients with primary hyperparathyroidism.

Intravenously (IV) injected hPTH(1-84), like other PTH preparations injected IV into rats (9,10,27,28), disappeared from serum biexponentially, first with a rapid and then with a second slower component. As expected, more I-PTH immunoreactivity was present in serum at each time point in NPX animals, reflecting decreased clearance in the absence of

the kidneys (27,28). This has been observed in prior studies dealing with the peripheral metabolism of ^{125}I -hPTH(1-84) or ^{125}I -bPTH(39-84) (9,10,27,28). HPLC fractionation of total I-PTH, at each time point, disclosed exclusively hPTH(1-84) at the 2 earliest time points, and a second peak in front of hPTH(1-84) at all other time points. This second peak first appeared as a shoulder to hPTH(1-84) at 6 and 8 min, and as a distinct peak later on, with maximum % expression at 24 min where it represented 40% of total I-PTH immunoreactivity in both groups of rats. This is similar to what has been described for ^{125}I C-fragments of ^{125}I -bPTH(1-84) in N and NPX rats (9,10,27,28). The elution positions of this fragment peak and of hPTH(1-84) in rats were also similar to our findings in humans (1-3). The application of HPLC planimetric data to total I-PTH values permitted us to construct a true disappearance curve for hPTH(1-84) and a mixed curve (generation + clearance) for non-(1-84)PTH. Kinetic analysis of hPTH(1-84) disclosed a similar half-life for early exponential decay in both groups, but longer half-life for the second component in NPX animals. Again, this is similar to prior reports (27,28) with the exception of a shorter half-life for the second component in both groups of our study. The difference from prior results is probably best explained by the fact that the hPTH(1-84) preparation used here was biologically active while ^{125}I -bPTH(1-84) used previously was not (9,10,27,28) because of chloramine-T iodination. Prior studies have demonstrated a slightly different tissue distribution (more in the liver, less in the kidneys) of bioactive ^{125}I -bPTH(1-84) (29) and of bioactive internally-labeled bPTH(1-84) with a somehow shorter half-life (30). Finally, more PTH fragments were observed in NPX rats at all time points reflecting the absence of kidney clearance and increased production in the presence of more available

substrate. Again, this is similar to what has been described for other C-fragments of PTH (27,28). In the end, one may wonder why non-(1-84)PTH was not identified previously in experiments dealing with the metabolism of ^{125}I -bPTH(1-84) or internally-labeled bPTH(1-84). In the first case, gel chromatography was used and was probably unable to separate these large ^{125}I -PTH fragments from ^{125}I -bPTH(1-84), and/or ^{125}I -PTH fragments were not sequenced long enough to identify ^{125}I -non(1-84) PTH (9,10,28). In the second case (30), HPLC was performed on gel chromatography fractions and not on untouched samples, leading to the same conclusion.

The second part of our study dealt with the secretion of non-(1-84)PTH by parathyroid adenomas. The HPLC profiles of PTH in sera from 10 patients with primary hyperparathyroidism were first investigated to make sure that parathyroid gland secretory products were compatible with the circulating PTH molecular forms. hPTH(1-84) and a fragment peak corresponding to circulating non(1-84) PTH were identified in all patients and a third fragment peak, not identified before, was also seen in some patient sera. These 3 peaks were also identified as secretory products of parathyroid cell incubations. The smaller third peak was more apparent when high PTH levels were used for HPLC. These non-(1-84)PTH peaks represented 32.5% of the immunoreactivity in serum, slightly more than in normal individuals [1-3], but less than what is seen in advanced renal failure [2,3]. They also represented 21.1% of parathyroid gland secretory products. Thus, like other C-fragments, non-(1-84)PTH is also secreted by the parathyroid glands (11-14). The higher proportion of non-(1-84)PTH in sera than in cell supernatants reflects both the longer half-

life of C-fragments in serum relative to hPTH(1-84) (27) and the contribution of peripheral metabolism to circulating non(1-84) PTH. Earlier studies (14,31,32), performed with porcine, bovine and human parathyroid cells, indicated that apart from fragments starting at positions 34, 37 and 43, these glands also secreted fragment starting at positions 24- and 28. These 2 secreted products could contribute to what we describe as non-(1-84)PTH HPLC peaks.

In conclusion, we can say that non-(1-84)PTH, like other C-fragments of PTH, has a dual origin from both the peripheral metabolism of hPTH(1-84) and the secretory process of parathyroid cells. In renal failure, more non-(1-84)PTH is observed in relation to the decreased renal clearance of these and other C-fragments. These findings in renal failure may be important to explain PTH resistance in that situation (7,8).

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by grant MOP-7643 from Canadian Institutes of Health Research. The authors thank Manon Livernois for typing this manuscript and Ovid Da Silva, Éditeur/Rédacteur of the Research Support Office, CHUM Research Centre, for editing it.

LEGENDS TO FIGURES

Fig. 1. Decay curves of injected hPTH(1-84) in normal (●——●) and nephrectomized (■-----■) rats. Each point represents mean \pm S.D. of 8 rats. Logarithmic values statistically different from normal rats by a two way ANOVA for repeated measurements followed by a Tukey test at given time points : *, $p < 0.05$; **, $p < 0.001$.

Fig. 2. HPLC profiles (left) of circulating PTH in normal (—) and nephrectomized (-----) rats at 8, 24 and 48 min after the injection of hPTH(1-84). The respective elution positions of hPTH(7-84) and hPTH(1-84) are indicated by arrows from left to right. Planimetric analysis (right) of HPLC peaks at each time point for normal (A) and nephrectomized rats (B). Data are expressed as % of total I-PTH immunoreactivity measured for hPTH(1-84) (●——●) and recognized fragments (■-----■) in the 2 groups.

Fig. 3. Application of planimetric analysis result at each time point (Fig. 2) to circulating I-PTH levels at the same time point (Fig. 1) in normal (●——●) and nephrectomized rats (■-----■).

Results are means \pm S.D. The fate of hPTH(1-84) and of non-(1-84)PTH are shown. Values of N and NPX rats were analysed using a logarithmic transformation of the data and a two way ANOVA for repeated measurements followed by a Tukey test: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.001$.

Fig. 4. HPLC profiles of I-PTH present in serum of patients with primary hyperparathyroidism. Arrows indicate the elution positions of hPTH(7-84) and hPTH(1-84) from left to right respectively. Results are expressed as absolute values on the left and as % of total immunoreactivity on the right. N= 10 patients (A, B), mean of 10 patients (C, D), standard hPTH(1-84) processed in hypoparathyroid serum (E,F). hPTH(1-84) and 2 more fragment peaks were recognized by I-PTH assay in serum (A,B,C,D) while only hPTH(1-84) in E,F.

Fig. 5 HPLC profiles of I-PTH present in the supernatant of parathyroid cells from parathyroid adenomas studied over 2 hours. Arrows indicate the elution positions of hPTH(7-84) and hPTH(1-84) from left to right respectively. Results are expressed as absolute values on the left and as % of total immunoreactivity on the right. N= 5 adenomas (A, B), mean of 5 adenomas (C, D). hPTH(1-84) and 2 more fragment peaks were recognized by I-PTH assay.

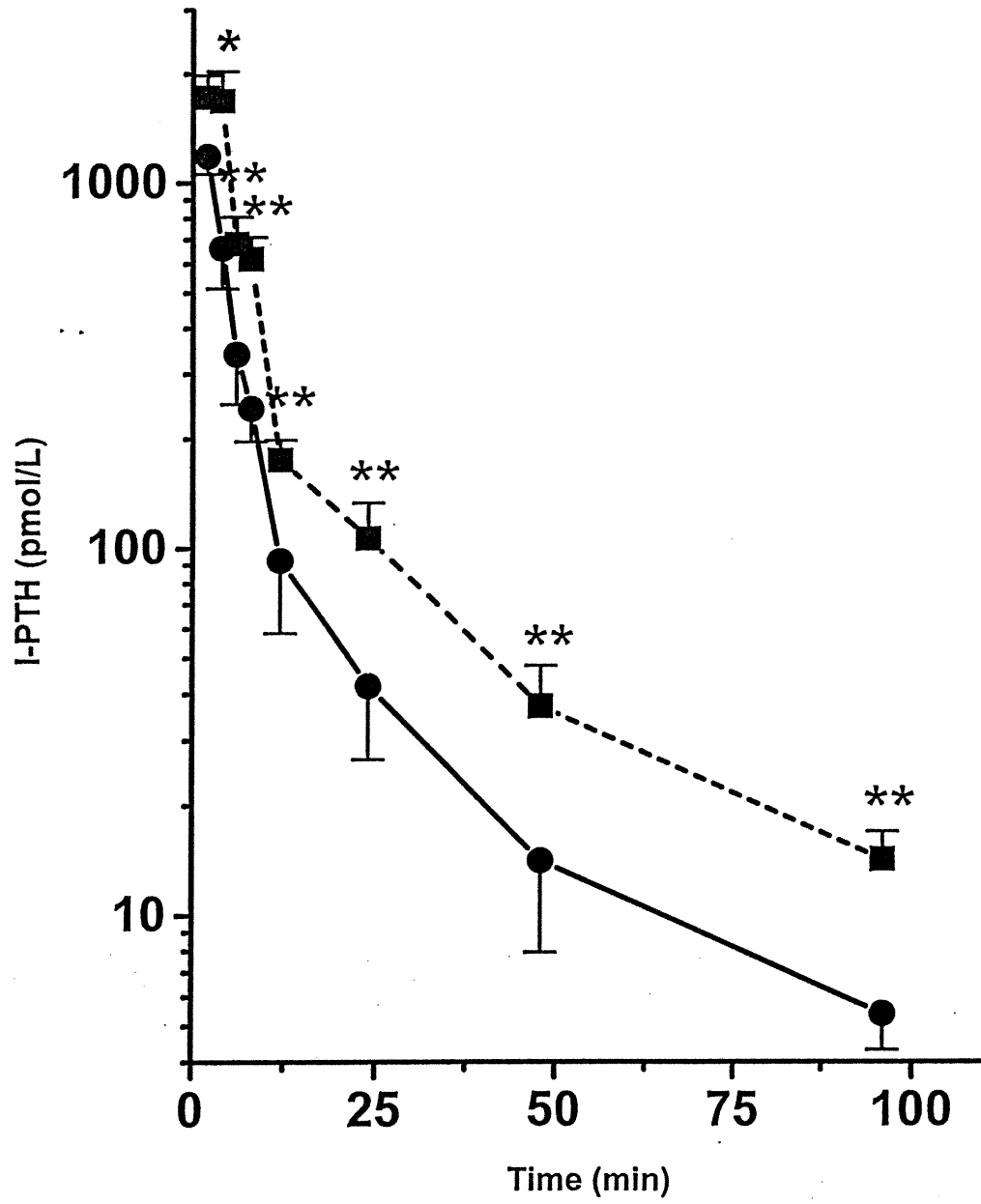
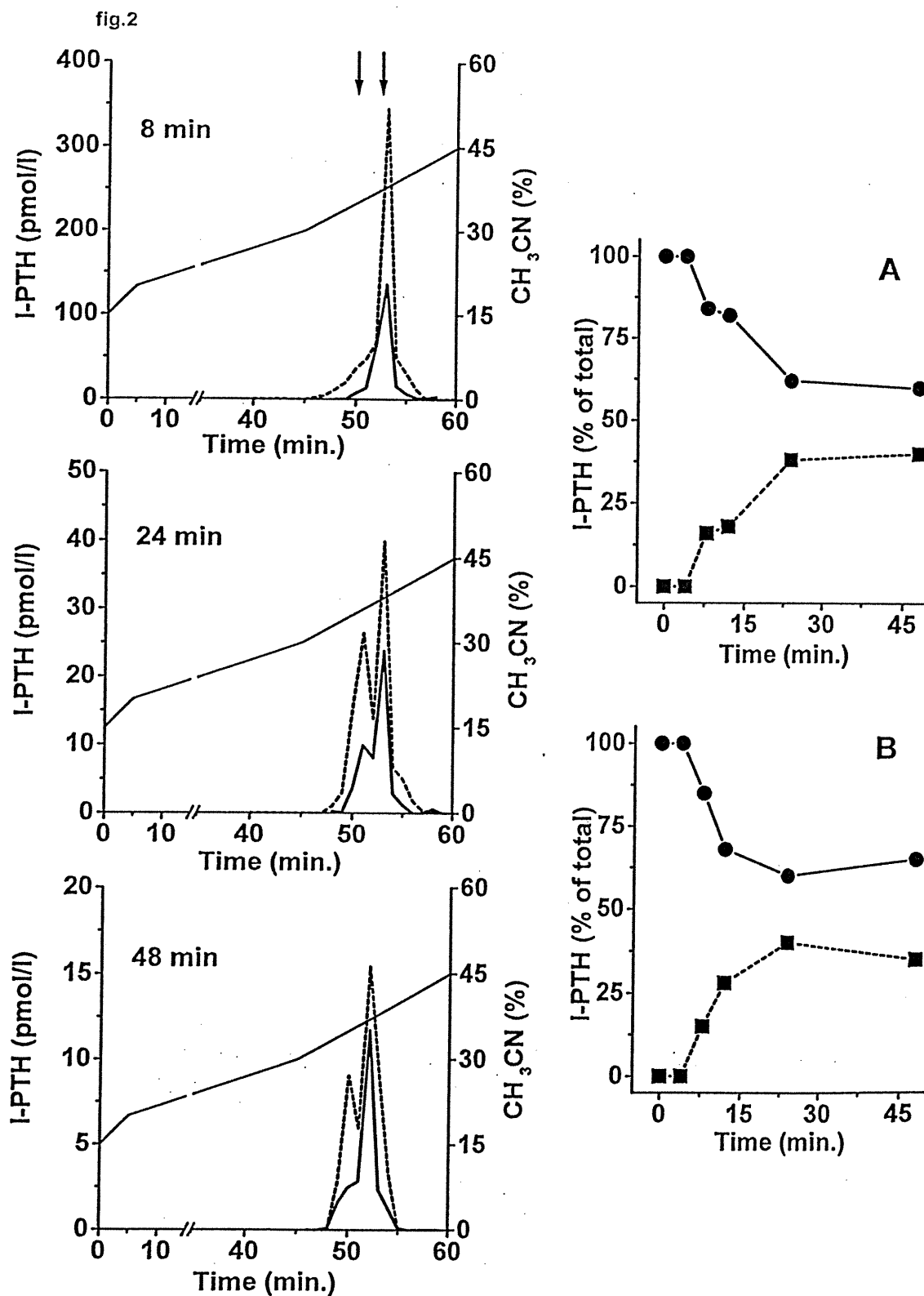


fig. 1



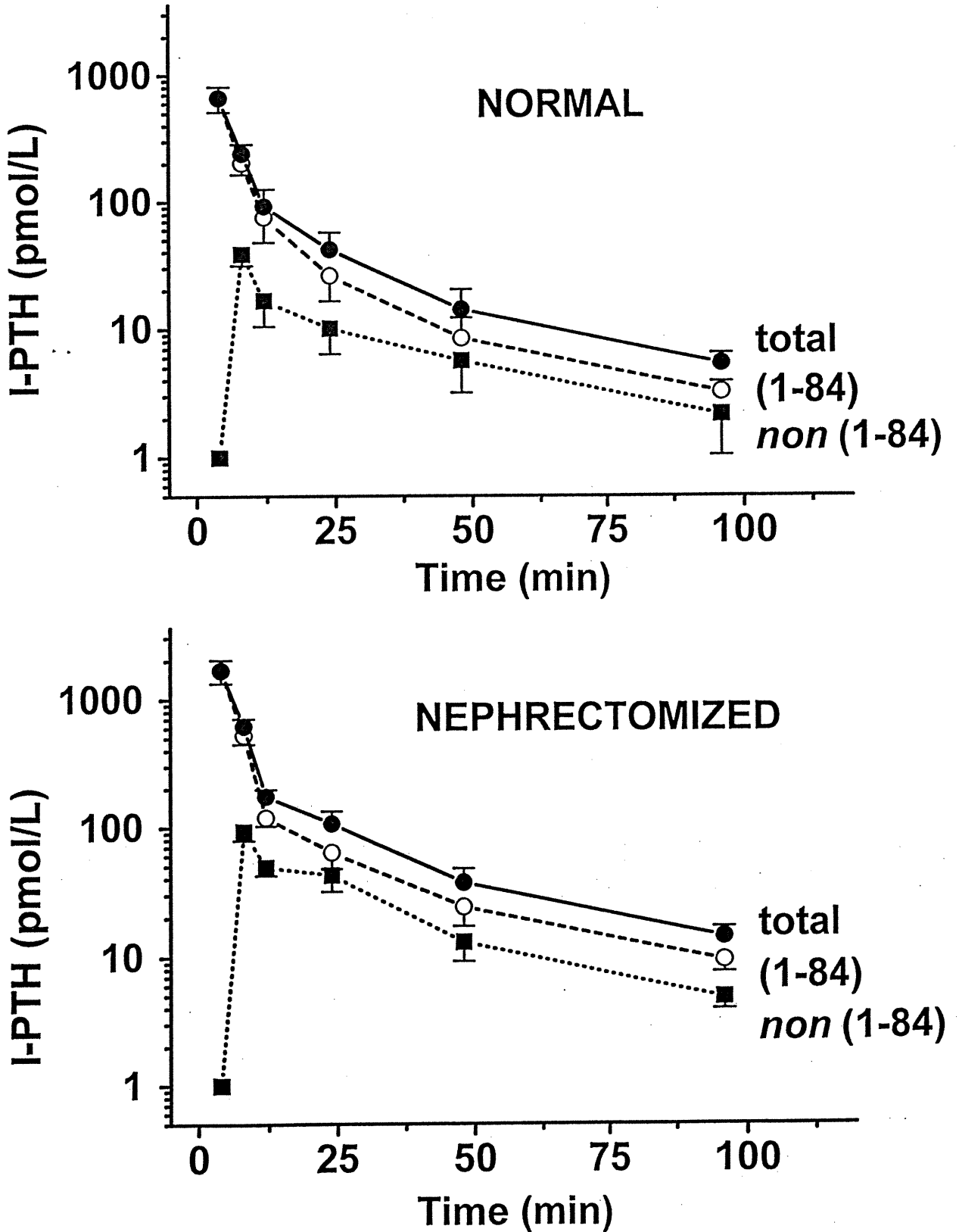
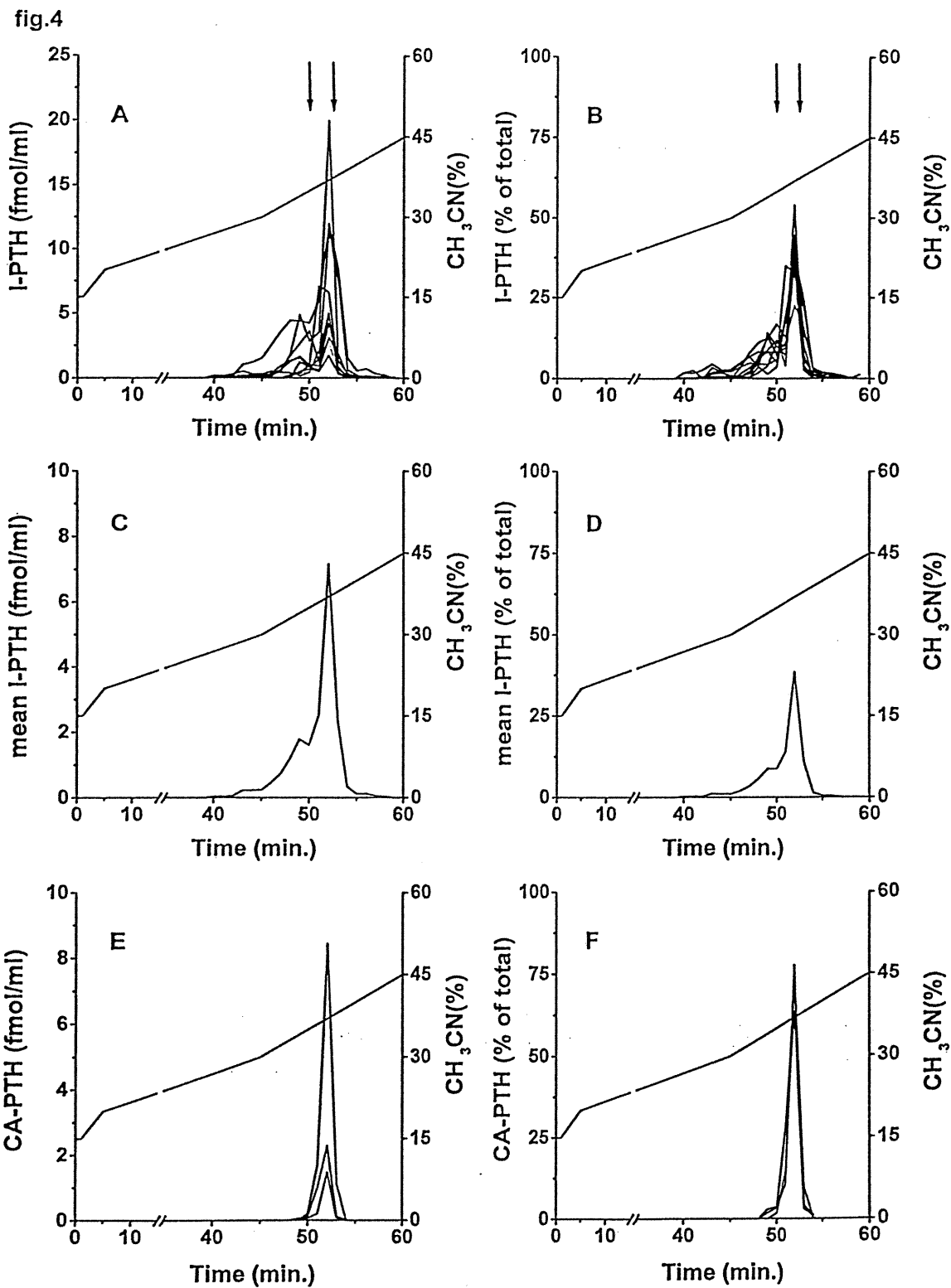
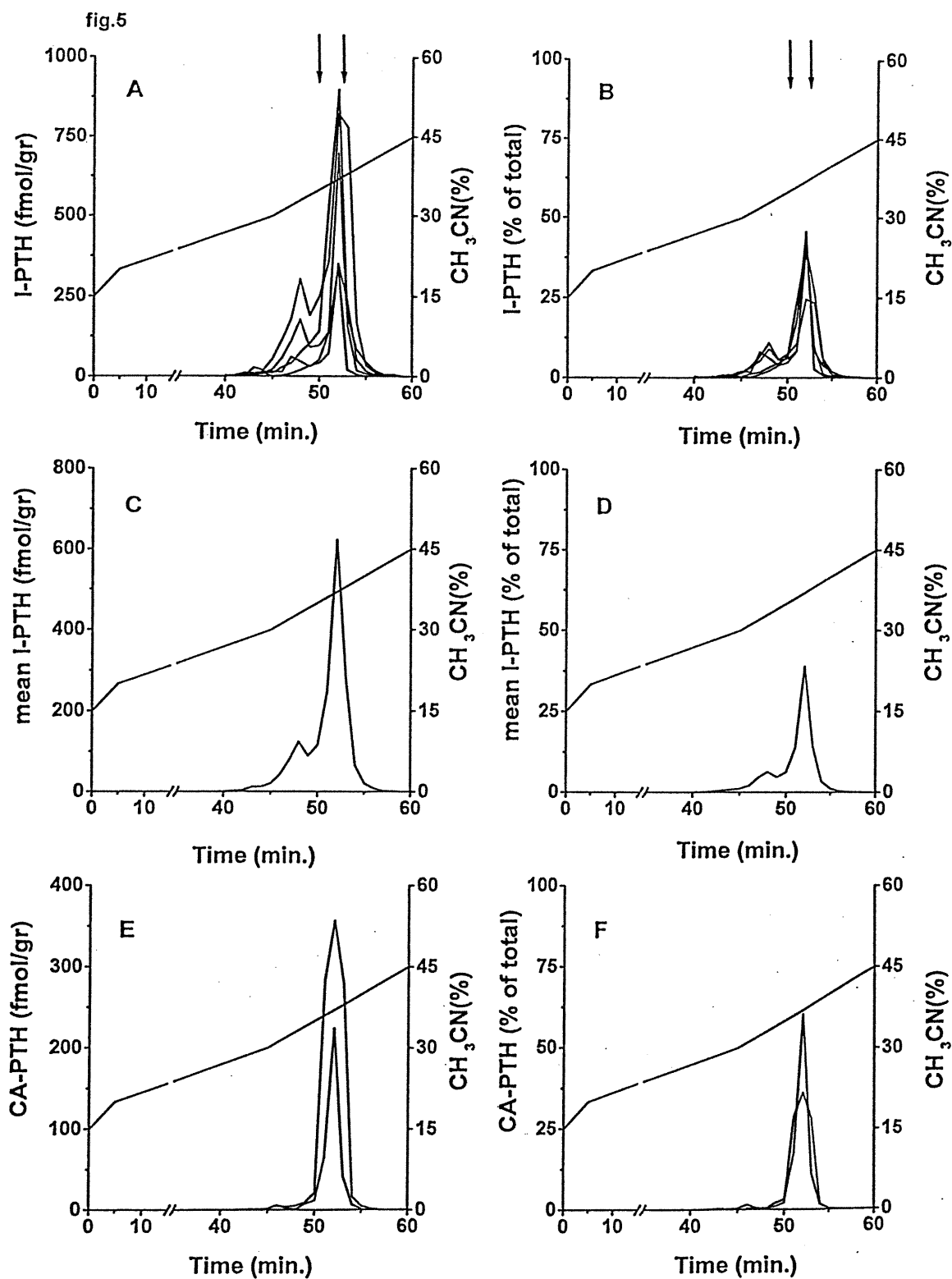


fig 3





REFERENCES

1. Brossard JH, Whittom S, Lepage R, D'Amour P. Carboxyl-terminal fragments of parathyroid hormone are not secreted preferentially in primary hyperparathyroidism as they are in other hypercalcemic conditions. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1993 **77** 413-419.
2. Brossard JH, Cloutier M, Roy L, Lepage R, Gascon-Barré M, D'Amour P. Accumulation of a non-(1-84) molecular form of parathyroid hormone (PTH) detected by intact PTH assay in renal failure: Importance in the interpretation of PTH values. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1996 **81** 3923-3929.
3. Lepage R, Roy L, Brossard JH, Rousseau L, Dorais C, Lazure C, D'Amour P. A non-(1-84) circulating parathyroid hormone (PTH) fragment interferes significantly with intact PTH commercial assay measurements in uremic samples. *Clinical Chemistry* 1998 **44** 805-809.
4. Nussbaum SR, Zahradnik RJ, Lavine JR, Brennan GL, Nozawa-Ung K, Kim LY *et al.* Highly sensitive two-site immunoradiometric assay of parathyrin, and its clinical utility in evaluating patients with hypercalcemia. *Clinical Chemistry* 1987 **33** 1364-1367.
5. Ratcliffe WA, Heath DA, Ryan M, Jones SR. Performance and diagnostic application of a two-site immunoradiometric assay for parathyrin in serum. *Clinical Chemistry* 1989 **35** 1957-1961.

6. Segre GV, Tregear G, Potts JR Jr. Development and application of sequence-specific radioimmunoassays for analysis of the metabolism of parathyroid hormone. In *Methods in Enzymology*, vol XXXVII:38-66. Eds O'Malley BW & Hardman JG. New York: Academic Press, 1975.
7. Slatopolsky E, Finch J, Clay P, Marlin D, Sicard G, Singer G *et al.* A novel mechanism for skeletal resistance in uremia. *Kidney International* 2000 **58** 753-761.
8. Nguyen-Yamamoto L, Rousseau L, Brossard JH, Lepage R, D'Amour P. Synthetic carboxyl-terminal fragments of parathyroid hormone (PTH) decrease ionized calcium concentration in rats by acting on a receptor different from the PTH/PTH-related peptide receptor. *Endocrinology* 2001 **142** 1386-1392.
9. D'Amour P, Segre GV, Roth SI, Potts JT Jr. Analysis of parathyroid hormone and its fragments in rat tissues: Chemical identification and microscopical localization. *Journal of Clinical Investigation* 1979 **63** 89-98.
10. Segre GV, D'Amour P, Potts JT Jr. Metabolism of radioiodinated bovine parathyroid hormone in the rat. *Endocrinology* 1976 **99** 1645-1652.
11. Flueck JA, Di Bella FP, Edis AJ, Kehrwald JM, Arnaud CD. Immunoheterogeneity of parathyroid hormone in venous effluent serum from hyperfunctioning parathyroid glands. *Journal of Clinical Investigation* 1977 **60** 1367-1375.
12. Hanley DA, Takatsuki K, Sultan JM, Schneider AB, Sherwood LM. Direct release of parathyroid hormone fragments from functioning bovine parathyroid glands *in vitro*. *Journal of Clinical Investigation* 1978 **62** 1247-1254.

13. Mayer GP, Keaton JA, Hurst JG, Habaner JF. Effect of plasma calcium concentration on the relative proportion of hormone and carboxylterminal fragments in parathyroid venous blood. *Endocrinology* 1979 **104** 1778-1784.
14. Morrissey JJ, Hamilton JW, MacGregor RR, Cohn DV. The secretion of parathormone fragments 34-84 and 37-84 by dispersed porcine parathyroid cells. *Endocrinology* 1980 **107** 164-170.
15. Bennett HPJ, Solomon S, Goltzman D. Isolation and analysis of human parathyrin in parathyroid tissue and plasma. *Biochemistry Journal* 1981 **197** 391-400.
16. Brown EM, Hurwitz S, Aurbach GD. Preparation of viable isolated bovine parathyroid cells. *Endocrinology* 1976 **99** 1582-1588.
17. Brown EM, Murray FB, Hurwitz S, Windeck R, Marx SJ, Spiegel AM *et al.* Dispersed cells prepared from human parathyroid glands: Distinct calcium sensitivity of adenomatous vs primary hyperplasia. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1978 **46** 267-275.
18. Jüppner H, Abou-Samra AB, Freeman MW, Kong XF, Schipani S, Richards J *et al.* A G protein-linked receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide. *Science* 1991 **254** 1024-1026.
19. Abou-Samra AB, Jüppner H, Force T, Freeman MW, Kong XF, Schipani E *et al.* Expression cloning of a common receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide from rat osteoblast-like cells: A single receptor simulates intracellular accumulation of both cAMP and inositol triphosphates and

increases intracellular free calcium. *Proceedings of the National Academy of Science (USA)* 1992 **89** 2732-2736.

20. Jouishomme H, Whitfield JF, Chakravarthy B, Durkin JP, Gagnon L, Isaacs RJ *et al.* The protein kinase-C activation domain of the parathyroid hormone. *Endocrinology* 1992 **130** 53-60.

21. Jouishomme H, Whitfield JF, Gagnon L, MacLean S, Isaacs R, Chakravarthy B *et al.* Further definition of the protein kinase C activation domain of the parathyroid hormone. *Journal of Bone and Mineral Research* 1994 **9** 943-949.

22. D'Amour P, Dorais C, Rousseau L, Roy L, JH Brossard. Synthetic hPTH(7-84) enhance the cAMP response to hPTH(1-84) in dexamethasone treated ROS 17/2.8 clonal cells. *Journal of Bone and Mineral Research* 1997 **12** 318 (abst. F369).

23. Inomata N, Akiyama M, Kubota N, Jüppner H. Characterization of a novel PTH-receptor with specificity for the carboxylterminal region of PTH(1-84). *Endocrinology* 1995 **136** 4732-4740.

24. Orloff JJ, Stewart AF. The carboxy-terminus of parathyroid hormone inert or invaluable? *Endocrinology* 1995 **136** 4729-4731.

25. Takasu H, Baba H, Inomata N, Uchiyama Y, Kubota N, Kumaki K *et al.* The 69-84 amino acid region of the parathyroid hormone molecule is essential for the interaction of the hormone with the binding sites with carboxyl-terminal specificity. *Endocrinology* 1996 **137** 5537-5543.

26. Murray TM, Rao LG, Rizzoli RE. Interactions of parathyroid hormone, parathyroid hormone related-protein, and their fragments with conventional and non

conventional receptor sites. In *The Parathyroids*, pp 195-211. Eds Bilezikian JP, Levine MA & Marcus R. New York: Raven Press, 1994.

27. D'Amour P, Lazure C, Labelle F. Metabolism of radioiodination carboxylterminal fragments of bovine parathyroid hormone in normal and anephric rats. *Endocrinology* 1985 **117** 127-134.

28. Segre GV, D'Amour P, Hultman A, Potts JT, Jr. Effects of hepatectomy, nephrectomy and nephrectomy/uremia on the metabolism of parathyroid hormone in the rat. *Journal of Clinical Investigation* 1981 **67** 439-448.

29. Teitelbaum AP, Schneider N, Neuman WF. On the relation between peripheral cleavage of parathyroid hormone and its biological activity in kidney. *Metabolic Bone Diseases Related Research* 1979 **2** 25-31.

30. Bringhurst FR, Stern AM, Yotts M, Mizrahi N, Segre GV, Potts JT, Jr. Peripheral metabolism of PTH: Fate of the biologically active amino terminus *in vivo*. *American Journal of Physiology* 1988 **255** E886-893.

31. MacGregor RR, Jilkoo RI, Hamilton JW. Formation and secretion of fragments of parathormone. *Journal of Biological Chemistry* 1986 **261** 1929-1934.

32. MacGregor RR, McGregor DH, Lee SH, Hamilton JW. Structural analyzed parathyroid fragments elaborated by cells cultured from a hyperplastic human parathyroid gland. *Bone and Mineral* 1985 **1** 41-50.

COMMENTAIRE

Les résultats obtenus dans cette étude démontrent que les formes non(1-84)PTH détectées par les dosages de PTH intacte sont formées durant le métabolisme périphérique de la hPTH(1-84) chez le rat normal. La disparition de la hPTH(1-84) se fait de façon biexponentielle. Ces exponentielles s'expliquent par deux phénomènes, la clairance de la hPTH(1-84) et l'apparition et la clairance de la non(1-84)PTH. Ces exponentielles sont modifiées chez le rat néphrectomisé par l'augmentation du substrat disponible en relation avec la diminution de la clairance rénale, résultant en une augmentation de la quantité de hPTH(1-84) résiduelle et une plus longue demi-vie de la deuxième exponentielle. La non(1-84)PTH est également sécrétée par tous les adénomes étudiés. Les analyses HPLC montrent un profil similaire des formes circulantes comparées à celles sécrétées par les adénomes. La non(1-84)PTH représente 21.1% de la I-PTH sécrétée et 32 % de la I-PTH circulante. Ces résultats nous suggèrent une similitude d'origine entre les formes non(1-84)PTH et les autres fragments carboxyl-terminaux. Leur taux circulants élevés en insuffisance rénale confirment le rôle majeur du rein dans leur clairance.

La présence de ces fragments en circulation en quantité importante justifie l'étude de leur rôle possible sur l'activité biologique de l'hormone intacte *in-vivo*. Cette hypothèse sera étudiée dans la prochaine étude.

INTRODUCTION

De longue date, les fragments carboxyl-terminaux de la PTH ont été considérés comme un produit biologiquement inactif du métabolisme de l'hormone intacte. Plus récemment, différentes études ont permis de mettre en évidence un récepteur rénal et osseux carboxyl-spécifique, le récepteur C-PTH, des effets directs des fragments carboxyl-terminaux synthétiques sur les cellules osseuses, via le même récepteur et, une régulation par la calcémie du ratio C-PTH/I-PTH chez l'individu normal et dans les maladies de la parathyroïde. Dans l'article précédent, nous avons démontré que la *non*(1-84)PTH, provenait de la sécrétion glandulaire des parathyroïdes et du métabolisme périphérique de la hPTH(1-84). Ces trouvailles étaient similaires à celles décrites pour les autres fragments carboxyl-terminaux de la PTH. De plus, l'accumulation de la *non*(1-84)PTH était accentuée par insuffisance rénale. Pour vérifier l'hypothèse selon laquelle l'activité biologique de la PTH intacte pourrait être influencée par les fragments carboxyl-terminaux de PTH circulants, nous avons étudié l'effet de fragments synthétiques sur la réponse calcique à la PTH(1-34) et à la hPTH(1-84) *in-vivo*. L'étude a été effectuée chez le rat parathyroïdectomisé et anesthésié pour éliminer l'influence de la PTH endogène de rat dans le tableau. La hPTH(1-34) et la hPTH(1-84) ont été infusées avec ou sans fragments carboxyl-terminaux de différentes longueurs, [hPTH(7-84), (39-84) et (53-84)], et ce à différentes doses. Les fragments carboxyl-terminaux ont aussi été infusés seuls. Le mécanisme d'action des fragments carboxyl-terminaux a été étudié au moyen du déplacement de traceurs sur les cellules ROS17/2.8 *in-vitro*. Ces dernières expriment à la

fois le récepteur classique, PTH/PTHrP ainsi que le récepteur carboxyl-terminal de la PTH. Une voie de signalisation a été étudiée au moyen de la production d'AMPc. Les résultats obtenus dans cette étude sont présentés dans l'article suivant

**SYNTHETIC CARBOXYLTERMINAL FRAGMENTS OF PTH DECREASE
IONIZED CALCIUM CONCENTRATION IN RATS BY ACTING ON
A RECEPTOR DIFFERENT FROM THE PTH/PTHrP RECEPTOR**

LOAN NGUYEN-YAMAMOTO, LOUISE ROUSSEAU,
JEAN-HUGUES BROSSARD, RAYMOND LEPAGE⁺ and PIERRE D'AMOUR

Centre de recherche, Centre hospitalier de l'Université de Montréal - Hôpital Saint-Luc
et Départements de médecine et biochimie⁺ Université de Montréal,
Montréal, Québec, Canada

Abbreviated title: Calcemic response to PTH *in vivo*

Key words: Calcium, parathyroid hormone, hyperparathyroidism

ABSTRACT

Even if the carboxylterminal (C)- fragments/intact (I)-parathyroid hormone (PTH) ratio is tightly regulated by ionized calcium (Ca^{++}) concentration in humans and animals, in health and in disease, the physiological roles of C-PTH fragments and of the C-PTH receptor remain elusive. To explore these issues, we studied the influence of synthetic C-PTH peptides of various length on Ca^{++} concentration and on the calcemic response to hPTH(1-34) and hPTH(1-84) in anesthetized thyroparathyroidectomized (TPTX) rats. We also looked at the capacity of these PTH preparations to react with the PTH/PTHrP receptor and with a receptor for the carboxyl (C)-terminal portion of PTH (C-PTH receptor) in rat osteosarcoma cells, ROS 17/2.8. Ca^{++} concentration was reduced by 0.19 ± 0.03 mmol/L over 2 h in all TPTX groups. Infusion of solvent over 2 more h had no further effect on Ca^{++} concentration (-0.01 ± 0.01 mmol/L) while infusion of hPTH(7-84) or fragment mixture (10% hPTH(7-84) and 45% each of hPTH(39-84) and hPTH(53-84)), 10 nmol/h, further decreased Ca^{++} concentration by 0.18 ± 0.02 ($p < 0.001$) and 0.07 ± 0.04 mmol/L ($p < 0.001$) respectively. Infusion of hPTH(1-84) or hPTH(1-34), 1 nmol/h, increased Ca^{++} concentration by 0.16 ± 0.03 ($p < 0.001$) and 0.19 ± 0.03 mmol/L ($p < 0.001$) respectively. Adding hPTH(7-84), 10 nmol/h, to these preparations prevented the calcemic response and maintained Ca^{++} concentrations equal to or below levels observed in TPTX animals infused with solvent alone. Adding the fragment mixture, 10 nmol/h, to hPTH(1-84) did not prevent a normal calcemic response but partially blocked the response to hPTH(1-34), and more than 3 nmol/h hPTH(7-84) prevented it. Both hPTH(1-84) and hPTH(1-34)

stimulated cyclic AMP production in ROS 17/2.8 clonal cells, while hPTH(7-84) was ineffective in this respect. Both hPTH(1-84) and hPTH(1-34) displaced ^{125}I -[nle^{8,18}, tyr³⁴] hPTH(1-34) amide from the PTH/PTHrP receptor while hPTH(7-84) had no such influence. Both hPTH(1-84) and hPTH(7-84) displaced ^{125}I -[tyr³⁴] hPTH(19-84) from the C-PTH receptor, the former preparation being more potent on a molar basis, while hPTH(1-34) had no effect. These results suggest that C-PTH fragments, and particularly hPTH(7-84), can influence Ca^{++} concentration negatively *in vivo* and limit in such a way the calcemic response to hPTH(1-84) and hPTH(1-34) by interacting with a receptor different from the PTH/PTHrP receptor, possibly a C-PTH receptor.

INTRODUCTION

Various lines of evidence suggest that circulating carboxylterminal (C)- fragments of parathyroid hormone (PTH) have more physiological relevance than currently thought. First, their concentration, relative to that of intact (I-)PTH, estimated through the C-PTH/I-PTH ratio, is regulated by Ca^{++} concentration in healthy individuals (1-3) and patients with parathyroid diseases (4-10). Acutely, hypercalcemia suppresses I-PTH more efficiently than C-PTH and elevates the C-PTH/I-PTH ratio while hypocalcemia increases I-PTH more efficiently than C-PTH and decreases the C-PTH/I-PTH ratio (1-3). Chronic stimulation or inhibition of the parathyroid glands enhances these acute effects of Ca^{++} concentration on the C-PTH/I-PTH ratio (4, 5, 7-10). This tight regulation of the C-PTH/I-PTH ratio suggests physiological implications. Second, a receptor for the carboxyl (C)-terminal portion of PTH (C-PTH receptor) has been demonstrated in bone and kidney cells during binding studies (11-15) and specific actions of synthetic C-PTH peptides have been observed on bone cells (16-21) and chondrocytes (22, 23). Thus, synthetic C-PTH peptides elevate alkaline phosphatase activity and osteocalcin mRNA in osteoblast-like cells (16-19), stimulate osteoclast-like cell formation and osteoclastic activity (20) as well as alkaline phosphatase activity in mouse embryo tooth germ (21). These peptides also influence collagen expression in chondrocytes by modulating intracellular Ca^{++} concentration (22, 23). Finally, a different cellular distribution of PTH(1-84) and PTH(1-34) (24-27) and different biological effects of these 2 molecules on urinary Ca excretion *in vivo* (27), on the

volume of pancreatic secretion (28), and on intracellular Ca concentration in various cells and tissues *in vitro* (29, 30), if explained by PTH(1-84) binding to the C-PTH receptor, suggest wide presence of this receptor and its physiological importance. To confirm this hypothesis, we studied the influence of synthetic C-PTH peptides of various lengths on the biological effects of hPTH(1-84) and hPTH(1-34) in thyroparathyroidectomized (TPTX) rats. Our results are described hereafter and suggest a negative influence of C-fragments on Ca⁺⁺ concentration.

MATERIALS AND METHODS

PTH peptides

hPTH(1-84), hPTH(1-34), hPTH(7-84), hPTH(39-84), hPTH(53-84) and [nle^{8,18}, tyr³⁴] hPTH(1-34) were purchased from BACHEM (Torrance, CA). [tyr³⁴] hPTH(19-84) was generously provided by Dr. Harald Jüppner from the Endocrine Unit of the Massachusetts General Hospital in Boston, U.S.A. (14). The homogeneity of each PTH preparation was verified by HPLC. Five to ten µg were loaded in 0.1% TFA on a C_{18u} Bondapak analytical column and eluted with a non-continuous linear gradient of acetonitrile, 15-50% in 0.1% TFA, delivered at 1.5 ml/min for 65 min by a Bio-Rad Model 2700 solvent delivery system (Richmond, CA, U.S.A.). All preparations appeared homogenous by optical density monitoring at 220 nm. All peptides were first dissolved in 0.1 M acetic acid, 1 µg dry weight/µl, aliquoted and stored at -70°C until used. For infusion, they were further dissolved at the appropriate concentrations in 0.9% NaCl, 2.5% sucrose and 2% BSA.

In vivo experimentation in rats

Experimental protocol

Male Sprague-Dawley rats, weighing 225-250 g, were fed a normal diet until experimentation. They were kept in cages according to the guidelines of the Canadian Council on Animal Care. The protocol was approved by the Animal Care Committee of our

center for study of groups of 6-8 rats. Under anesthesia with isoflurane delivered in N₂O:O₂ (4:1), TPTX was performed in all except 1 group (sham-operated). Catheters were installed in the right femoral vein for IV infusion, and in the bladder for urine collection. Solvent was infused at 50 µl/min over the first 2 h in all groups and continued for another 2 h in the sham-operated control group and one TPTX group while all other TPTX groups were infused for 2 h with the following preparations: hPTH(1-84) or hPTH(1-34), 1 nmol/h; hPTH(1-84) or hPTH(1-34), 1 nmol/h, with hPTH(7-84), 1, 3 or 10 nmol/h, or with hPTH(39-84), 10 nmol/h, or with a mixture of synthetic C-fragments (10% hPTH(7-84), 45% each of hPTH(39-84) and hPTH(53-84)), 1 or 10 nmol/h. hPTH(7-84) and the C-fragment mixture, 10 nmol/h, were also infused alone. Blood was obtained from the tail vein to measure Ca⁺⁺ at 0, 1, 2, 3 and 4 h. The rats were sacrificed by exsanguination through the abdominal aorta at 4 h, and total calcium, phosphate and creatinine were also measured. Urine was collected during the last h of the 4-h experimentation period. All samples were aliquoted and stored at -75°C until assayed.

Methods

Ca⁺⁺ was analyzed on total blood using an ICA-2 analyzer (Radiometer, Copenhagen, Denmark). The interassay coefficients of variation for 38 determinations at concentrations of 0.77 and 1.75 mmol/L were 3.3% and 2.7%, respectively. Serum total calcium, phosphate, creatinine and urinary phosphate and creatinine were measured by an automated colorimetric method. Urinary calcium was quantitated by atomic absorption spectrometry.

Statistical analysis

The results are means \pm S.D. The data were analyzed by Student's "t" test or a one way ANOVA followed by a Student Newman-Keuls test for 2 by 2 comparisons. Serum and urinary parameter results were not available for all time points except at 4 h, when most group differences were analyzed.

Experimentation in vitro with ROS 17/2.8 clonal cells

Cell culture

Rat osteosarcoma cells, ROS 17/2.8, were maintained in 75 cm² flasks containing DMEM-F12 medium supplemented with 28 mMol NaHCO₃, pH 7.4, 1% penicillin-streptomycin (Gibco-BRL, Grand Island, NY, U.S.A.) and 10% fetal serum (Hyclone, Logan, UT, U.S.A.). They were maintained in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO₂ for 5 days. Confluent cells were removed from the culture flasks with 0.25% trypsin-1 mM EDTA (Gibco-BRL) and suspended in the same medium supplemented with 100 nM dexamethasone (ICN Biomedical, Costa Mesa, CA, U.S.A.) to enhance the cyclic AMP response to PTH (31). They were then plated onto 12-well sterile plates at a density of 2×10^4 cells/cm² and grown in the same medium for 5 days, with a medium change on the third day. The cells were finally used for cyclic AMP stimulation as well as for binding experiments. Mean cell density/well at day 5 is 235,000 \pm 18,141 cells (mean \pm S.E.M. n=23).

PTH bioassay

One ml of [³H]-adenine (Amersham, Oakville, Ont., Canada), 1 μCi/ml, in DMEM-F12 and 2% fetal serum, was added to each well for 2 h at 37°C. The wells were then washed twice with 1 ml medium and incubated for 10 min with 250 μl medium containing 1 mM IBMX (ICN Biomedical) to prevent cyclic AMP breakdown (31). PTH preparations were then added in 250 μl medium, and incubation was allowed to continue for 5 more min at room temperature. After washing each well twice with 1 ml 5% cold PBS, the reaction was stopped with 1 ml 5% TCA. Each well and plate was re-incubated for a minimum of 2 h. [¹⁴C]-cyclic AMP (Amersham), 2,000 cpm, was then added to each well. TCA extracts were eluted through Dowex (Bio-Rad, Mississauga, Ont., Canada) and alumina (Fisher, Nepean, Ont., Canada) columns to collect ³H- and ¹⁴C-cyclic AMP counts, as described by Salomon *et al.* (32) and modified by Meeker and Harden (33). Radioactivity was counted in 10 ml Scintisafe (Fisher) in a Beckman S-1801 scintillation counter. Synthetic hPTH(1-84), hPTH(7-84) and hPTH(1-34) were bioassayed at concentrations ranging from 5 x 10⁻⁷ to 10⁻¹¹ M.

Binding studies

Synthetic [nle^{8,18}, tyr³⁴] hPTH(1-34) and [tyr³⁴] hPTH(19-84) were iodinated by the chloramine T method, using Na ¹²⁵Iodine (Amersham), and purified by HPLC. Each well was rinsed twice with 1 ml binding buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.7], 100 mM NaCl, 5

mM KCl, 2 mM CaCl₂, 0.5% BSA, 10% hypoparathyroid dog serum) and then incubated for 4 h at 16°C with 2 x 10⁵ cpm of ¹²⁵I-tracer, with or without various molar concentrations of cold PTH preparations in a final volume of 500 µl. The unbound radioligand was removed, and the cell monolayers were rinsed twice with 1 ml of cold PBS. The cells were lysed with 500 µl of 1 M NaOH, and the lysates counted in an LKB-1277 gammacounter. hPTH(1-84), hPTH(1-34) and hPTH(7-84) concentrations were similar to those described previously for PTH bioassay.

Statistical analysis

Results are means ± S.D. Results obtained with the various PTH preparations were analyzed by a one way ANOVA followed by a Student Newman-Keuls test for 2 by 2 comparisons.

RESULTS

Table 1 summarizes the evolution of serum parameters of calcium and phosphate homeostasis over 2 h after TPTX in rats as well as change of the same parameters in sham-operated control rats. Ionized calcium (Ca^{++}) decreased by 0.19 ± 0.03 mmol/L ($p < 0.0001$), total calcium by 0.40 ± 0.17 mmol/L ($p < 0.0001$) while serum phosphate increased by 0.26 ± 0.40 mmol/L ($p < 0.0001$) in TPTX animals, all very significant differences. Serum creatinine also decreased slightly, by 2.6 ± 5.7 $\mu\text{mol/L}$ ($p < 0.001$), as an indication of volume expansion. There was no changes in these serum measurements in sham-operated control rats over the same time period. Serum creatinine also tended to decrease by 4.1 ± 7.3 $\mu\text{mol/L}$ in these rats but this did not reach statistical significance in this smaller group.

Figure 1 summarizes calcemic responses observed during 2-h infusion of various PTH preparations or solvent alone in TPTX rats as well as the effect of infusion of solvent alone in sham-operated control rats. In these animals, Ca^{++} concentration remained normal and unchanged during the 2-h infusion. In TPTX animals infused with solvent alone, Ca^{++} concentration remained low at 1.10 mmol/L and did not change over the time course of the experiment. hPTH(7-84), 10 nmol/h, caused a Ca^{++} concentration decrease of 0.18 ± 0.02 mmol/L while fragment mixture, 10 nmol/h, reduced it by only 0.07 ± 0.04 mmol/L over the same time period, both results being significantly different ($p < 0.001$) from TPTX solvent alone rats. hPTH(1-84), 1 nmol/h, increased ionized calcium by 0.16 ± 0.03

mmol/L ($p < 0.001$). When hPTH(1-84), 1 nmol/h, was infused with hPTH(7-84), 10 nmol/h, Ca^{++} did not increase and remained stable at the concentration observed in TPTX animals infused with solvent alone. Fragment mixture, 10 nmol/h did not inhibit and, in fact slightly enhanced the calcemic effect of hPTH(1-84), 1 nmol/h. hPTH(1-34), 1 nmol/h, increased ionized calcium values by 0.19 ± 0.03 mmol/L ($p < 0.001$) over 2 h. Rats infused with hPTH(7-84), 10 nmol/h, with hPTH(1-34), 1 nmol/h, maintained a lower Ca^{++} concentration than TPTX animals infused with solvent alone but higher than values obtained with hPTH(7-84), 10 nmol/h alone. hPTH(7-84), 3 nmol/h, with hPTH(1-34), 1 nmol/h, resulted in Ca^{++} values higher than those found in TPTX animals infused with solvent alone but lower than those observed with hPTH(1-34), 1 nmol/h alone. The fragment mixture, 10 nmol/h, with hPTH(1-34), 1 nmol/h, was slightly more potent than hPTH(7-84), 3 nmol/h, in limiting the calcemic response to hPTH(1-34).

Figure 2 summarizes differences in Ca^{++} and PO_4 concentration obtained over 2-h infusion of the same PTH preparations. The differences for Ca^{++} concentration are similar to those just described. hPTH(7-84) alone, 10 nmol/h, reduced phosphate concentration by 0.10 ± 0.25 mmol/L ($p < 0.05$) while solvent alone increased it by 0.35 ± 0.33 mmol/L in TPTX rats. Infusion of hPTH(1-84) or hPTH(1-34), 1 nmol/h, did not cause a significant decrease in serum phosphate concentration compared to TPTX animals on solvent alone. In contrast, all groups infused with hPTH(7-84) together with hPTH(1-84) or hPTH(1-34) and those infused with the fragment mixture together with hPTH(1-34) had significant reduction of serum phosphate compared to TPTX rats infused with hPTH (1-84) or hPTH(1-34) alone.

Table II summarizes the influence of 2-h infusion of the same PTH preparations on urinary calcium and phosphate excretion. TPTX reduced urinary phosphate excretion in all groups not treated with hPTH(1-84) or hPTH(1-34) while treatment with hPTH(1-84) or hPTH(1-34) increased phosphaturia above levels observed in sham-operated control rats. hPTH(7-84), infused with hPTH(1-84) or hPTH(1-34), tended to decrease phosphaturia but the results remained non-significant due to large variances. TPTX also tended to reduce calciuria but the influence of the various PTH infusion regimens on urinary calcium were less evident.

Figure 3 illustrates the data obtained in ROS 17/2.8 clonal cells. hPTH(1-84) and hPTH(1-34) both increased cyclic AMP production in a dose-dependent manner. hPTH(1-34) was slightly more efficient on a molar basis than hPTH(1-84). hPTH(7-84) alone had no influence on cyclic AMP production and did not reduce the response to hPTH(1-84) or hPTH(1-34) (not illustrated). hPTH(1-84) and hPTH(1-34) both displaced the ^{125}I -[nle^{8,18}, tyr³⁴] hPTH(1-34) tracer from the PTH/PTHrP receptor, hPTH(1-84) being slightly more efficient on a molar basis. hPTH(7-84), at the same molar concentrations, could not displace this tracer. Similar experiments were performed with ^{125}I -[tyr³⁴] hPTH(19-84) tracer. Binding this time was specific for the C-PTH receptor. hPTH(1-84) displaced the tracer from the receptor while hPTH(1-34) could not. hPTH(7-84) was also able to displace the tracer but was less potent on a molar basis than hPTH(1-84).

DISCUSSION

This study was performed to establish if synthetic C-fragments of PTH, similar to those found in the circulation of humans and animals, could influence the classic biological effects of PTH(1-84) or PTH(1-34) on serum and urinary calcium and phosphate. We decided to use TPTX rats to remove the influence of endogenous molecular forms of rPTH on the results. We also made sure that anesthesia and fluid shifts did not influence calcium concentration by using appropriate sham-operated control rats. hPTH(7-84) was used as the only commercially available representative of non(1-84) PTH, large C-fragments with a partially preserved aminoterminal structure identified on serum HPLC profiles by I-PTH assays in humans and dogs (4, 5, 10). hPTH(39-84) was taken as an example of large C-fragments generated during the peripheral metabolism of PTH(1-84) in rats (34, 35) while hPTH(53-84) served as an example of a smaller C-fragment (36). In some experiments, PTH(7-84) was used alone while in others it was administered in a mixture with hPTH(39-84) and hPTH(53-84), where it represented 10% of the total. The composition of this mixture was derived from HPLC studies performed in normal humans where non(1-84) PTH represented 20% of I-PTH, and C-PTH, 80% of total PTH (4). The doses of hPTH(1-84) and hPTH(1-34) to be used were derived from the existing *in vivo* literature in rats (37). The doses of hPTH(7-84) and of mixture up to 10 times higher than either hPTH(1-84) or hPTH(1-34) were derived from our studies on the composition of circulating PTH (4, 5). To date, few studies have dealt with the modulatory influence of C-fragments on hPTH(1-84) and hPTH(1-34) biological effects *in vivo*. PTH(53-84), when used alone, can

stimulate alkaline phosphatase activity in ROS 17/2.8 clonal cells via a C-receptor, but this effect is abolished in the presence of hPTH(1-34) and/or hPTH(1-84) which decrease alkaline phosphatase activity via the classic PTH/PTHrP receptor (11,16-18). PTH(3-84), but not PTH(8-84), has been a potent inhibitor of hPTH(1-84) bioactivity in renal cytochemical bioassay (38). Furthermore, synthetic C-fragments have been demonstrated to elicit a late response in the same system (39). bPTH(3-84), 10 nmol/h, infused with bPTH(1-84), 1 nmol/h, did not suppress the calcemic response to bPTH(1-84) in TPTX rats but enhanced urinary cyclic AMP and PO₄ excretions relative to hPTH(1-84) alone (37).

Finally, more recently, hPTH(7-84) has been demonstrated to inhibit the calcemic response to hPTH(1-84) in TPTX rats maintained on a 0.02 % calcium diet (40). It is difficult to reach specific conclusions from these results other than to say that C-fragments can sometimes modulate PTH biological effects via 1 of the 2 known PTH receptors.

Our data demonstrate that C-PTH fragments exert negative control on Ca⁺⁺ concentration, and hPTH(1-84) or hPTH(1-34), a positive control. This is mainly illustrated by the capacity of hPTH(7-84) or of the fragment mixture, 10 nmol/h, infused alone to further reduce Ca⁺⁺ concentration in TPTX rats (negative control), and of hPTH(1-84) or of hPTH(1-34), 1 nmol/h, to restore Ca⁺⁺ concentration to normal in the same rats (positive control). hPTH(7-84) or the fragment mixture infused with hPTH(1-84) or hPTH(1-34) at the same concentrations, in a 10/1 molar ratio, gave intermediate Ca⁺⁺ concentrations (positive hPTH(1-84) or hPTH(1-34) calcemic influence minus negative hPTH(7-84) or fragment mixture calcemic effect). These results and those obtained with an intermediate dose of hPTH(7-84), 3 nmol/h, with hPTH(1-34), 1 nmol/h, clearly indicate that hPTH(7-

84) exerts negative control on Ca^{++} concentration. The fragment mixture, 10 nmol/h, which contains hPTH(7-84), 1 nmol/h, and other fragments 9 nmol/h, produced a greater anticalcemic effect than hPTH(7-84), 3 nmol/h, when infused with hPTH(1-34), 1 nmol/h, indicating that 9 nmol/h smaller fragments (45 % hPTH(39-84) + 45 % hPTH(53-84)) exerted a greater anticalcemic action than 2 nmol/h hPTH(7-84) in the presence of 1 nmol/h of PTH(7-84). This suggests that smaller C-PTH fragments can potentiate the effect of a larger fragment. This the first time that an anticalcemic effect of several C-fragments is clearly illustrated *in vivo*. Our results are similar to those obtained in a recent study where an hypocalcemic effect of hPTH(7-84) alone was demonstrated as well as an inhibitory effect of the same molecule on hPTH(1-84) induced calcium increase in TPTX rats maintained on a 0.02 % calcium diet (40). A molar ratio of hPTH(1-84) to hPTH(7-84) of 1:1 was used in that study, much lower than in our study, but PTH preparations were also injected intra-peritoneally rather than intravenously making any direct comparison difficult.

Clear effects of C-fragments on other aspects of PTH physiology were less evident. Infusion of hPTH(7-84) alone or with hPTH(1-84) or hPTH(1-34), or of the fragment mixture with hPTH(1-34), reduced serum phosphate concentration more than hPTH(1-84) or hPTH(1-34) alone indicating that the anticalcemic effect of C-PTH fragments was observed simultaneously with a decrease in serum phosphate. Phosphaturia was diminished in TPTX animals and greatly increased in all groups treated with either hPTH(1-84) or hPTH(1-34). There was a tendency for hPTH(7-84) to reduce the phosphaturic effect of hPTH(1-34) in particular, but the results did not reach statistical

significance due to large variances. The recent study already mentioned above suggested a similar antiphosphaturic action of hPTH(7-84) injected with hPTH(1-84) (40). Specific effects on calciuria were not evident other than a tendency to decrease in all TPTX groups. To better understand how hPTH(7-84) exerted its inhibitory influence, we studied its interaction with the classic PTH/PTHrP receptor and the C-PTH receptor, both present on ROS 17/2.8 clonal cells. Both hPTH(1-84) and hPTH(1-34) displaced the ^{125}I -[nle^{8,18},tyr³⁴] hPTH(1-34) tracer from the classic PTH/PTHrP receptor, while hPTH(7-84) was totally ineffective. Both hPTH(1-84) and hPTH(7-84) displaced the ^{125}I -[tyr³⁴] hPTH(19-84) recombinant tracer from the C-receptor, the former preparation being more effective on a molar basis, while hPTH(1-34) caused no displacement. Others have demonstrated that smaller C-PTH fragments do not react with the PTH/PTHrP receptor and that region 69-84 has to be intact to react with the C-PTH receptor (15). Both hPTH(1-84) and hPTH(1-34), in this study as in others, increased cyclic AMP production by ROS 17/2.8 clonal cells (16, 17, 19) while hPTH(7-84) was totally ineffective. This last point was also demonstrated in a recent study (40). These results, combined with the effect of hPTH(39-84) and hPTH(53-84) in the mixture, suggest that the anticalcemic effect of C-PTH fragments may be mediated via the C-PTH receptor. This receptor exists both on osteoblasts (11, 14) and osteocytes (41), and it is possible that C-fragments could act by inhibiting osteocytic osteolysis and/or by increasing calcium accretion. The latter point is further sustained by the reduced phosphate levels in serum induced by C-fragments simultaneously with unchanged or slightly decreased phosphaturia compared to hPTH(1-84) or hPTH(1-34) alone. These results differ from those obtained with hPTH(7-34), another PTH inhibitor.

The anticalcemic and antiphosphaturic effects of this PTH peptide *in vivo* were demonstrated at higher molar concentrations and were mediated by an inhibition of hPTH(1-34) binding to the PTH/PTHrP receptor and of ligand-induced cyclic AMP production (43, 44). This, combined with our results, illustrated that it is possible to inhibit the biological actions of PTH(1-84) by blocking its activity at two of the known PTH receptors. While hPTH(7-34) appears to exert its inhibitory action by influencing the PTH/PTHrP receptor, hPTH(7-84) appears mainly to influence the C-PTH receptor. hPTH(7-84) and the C-PTH fragments mixture inhibited the calcemic effect of hPTH(1-34) more readily than that of hPTH(1-84). This may be related to the fact that hPTH(1-34) can only interact with the PTH/PTHrP receptor while hPTH(1-84) can react also with the C-PTH receptor. The C-PTH receptor binds hPTH(1-84) and could limit the quantity of hormone available to react with the PTH/PTHrP receptor. This is suggested by the fact that the fragment mixture, infused with hPTH(1-84), caused a greater calcemic response than hPTH(1-84) alone, possibly by displacing some hPTH(1-84) from the C-PTH receptor. In this particular case, the fragment mixture weaker anticalcemic effect was also masked by binding of hPTH(1-84) to the C-PTH receptor. Our results are limited by the fact that we used synthetic hPTH fragments which are not identical to those found in the circulation, and obviously we will have to demonstrate that they apply to circulating fragments once their exact nature is known. Nonetheless, our data suggest both positive and negative control of Ca^{++} concentration via hPTH(1-84) and the PTH/PTHrP receptor, and C-PTH fragments and possibly the C-PTH receptor. This dual control of Ca^{++} concentration would make sense if one looks at the regulation of PTH molecular forms in the circulation by Ca^{++}

concentration. Hypocalcemia favors a low C-PTH/I-PTH ratio and thus the positive effects on Ca^{++} concentration while hypercalcemia favors a high C-PTH/I-PTH ratio and negative effects on Ca^{++} concentration (1, 5).

The clinical implications of these findings may be important in primary and secondary hyperparathyroidism. In renal failure, non(1-84) PTH and other C-PTH fragments accumulate and account for a larger proportion of circulating PTH (4,42). This would enhance the inhibitory effect of these fragments on Ca^{++} concentration and stimulate the secretion of more PTH to restore Ca^{++} concentration. Similarly, the amount of non(1-84) PTH secreted relative to hPTH(1-84) could be important to explain why comparable Ca^{++} concentrations are often observed with quite different PTH concentrations (6) in patients with primary hyperparathyroidism. More studies are required to elucidate these issues.

TABLE I

Influence of thyroparathyroidectomy on serum parameters of calcium and phosphate homeostasis

TEST	GROUPS	TIME (h)		
		0	2	▲
Ionized Ca (mmol/L)	Control	1.29 ± 0.02	1.29 ± 0.02	-0.005 ± 0.011
	TPTX	1.28 ± 0.02	1.09 ± 0.03 ^{ac}	-0.19 ± 0.03 ^c
Total Ca (mmol/L)	Control	2.21 ± 0.12	2.16 ± 0.06	-0.051 ± 0.143
	TPTX	2.20 ± 0.14	1.79 ± 0.13 ^{ac}	-0.40 ± -0.17 ^c
Serum PO₄ (mmol/L)	Control	2.66 ± 0.09	2.64 ± 0.14	-0.01 ± 0.17
	TPTX	2.49 ± 0.32	2.73 ± 0.35 ^a	0.26 ± 0.40
Creatinine (μmol/L)	Control	31.4 ± 4.7	27.2 ± 5.7	-4.1 ± 7.3
	TPTX	33.6 ± 6.2	31 ± 6.5 ^b	-2.6 ± 5.7

Results are means ±SD. Control = sham-operated rats, n = 8; TPTX = thyroparathyroidectomized rats, n = 64. Statistical analysis by paired and unpaired Student's T test. Different from time 0 : a, p < 0.0001; b, p < 0.001. Different from controls: c, p < 0.0001.

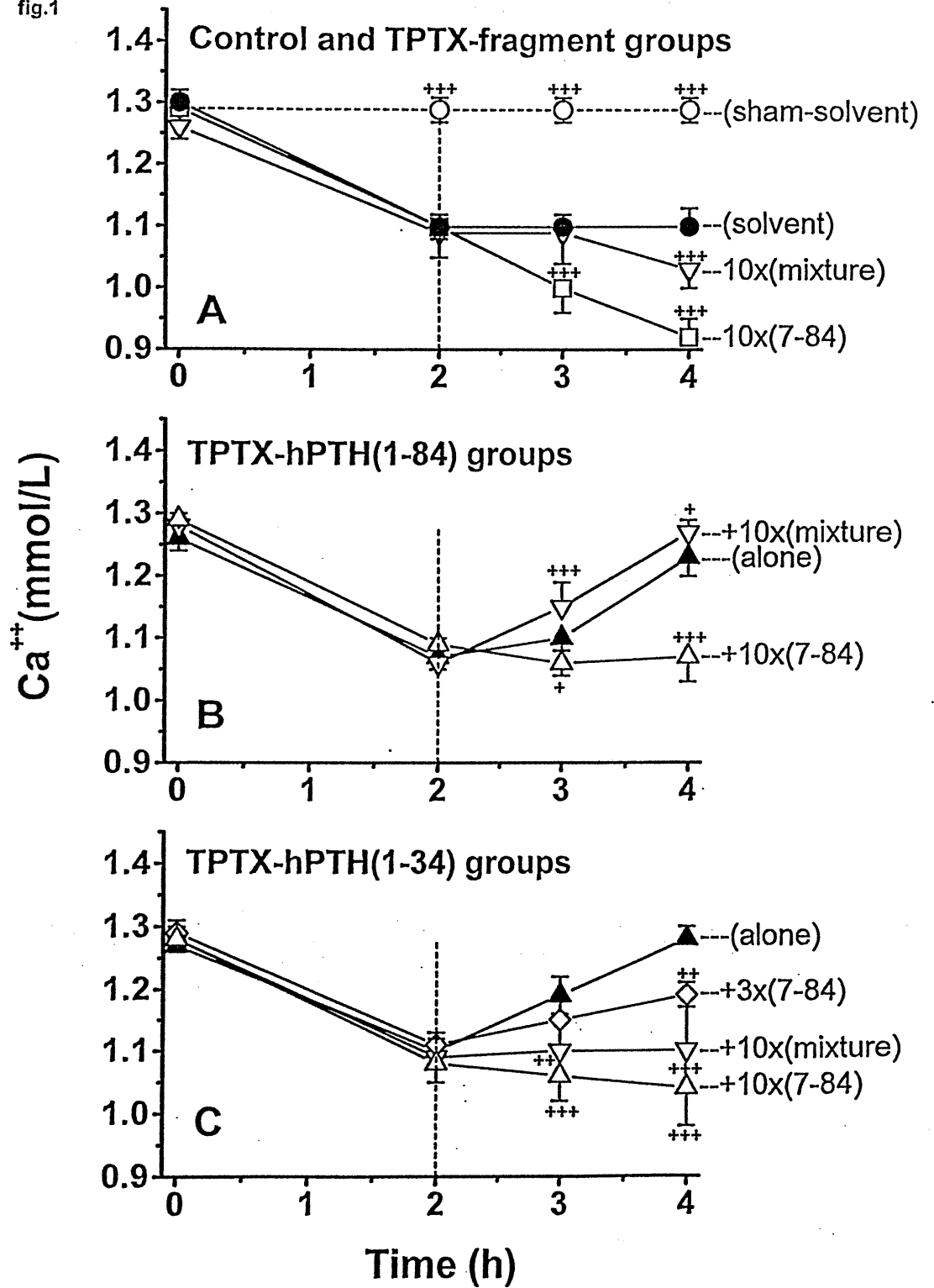
TABLE II

**Influence of various PTH infusion regimens
on urinary calcium and phosphate excretion in TPTX rats**

GROUPS	No.	PO ₄ U (μmol/μmol creat.)	Ca U (μmol/μmol creat.)
CONTROL			
<i>Sham-solvent</i>	8	6.91 ± 3.11	0.12 ± 0.04
TPTX			
Solvent	6	0.07 ± 0.03 ^a	0.08 ± 0.03
10X (mixture)	6	0.09 ± 0.04 ^a	0.08 ± 0.02
10X (7-84)	6	0.04 ± 0.02 ^a	0.08 ± 0.02
<i>hPTH(1-84)</i>			
1X alone	6	20.1 ± 5.6 ^{ad}	0.09 ± 0.04 ^c
+10X (7-84)	6	15.4 ± 4.7 ^{bd}	0.07 ± 0.02 ^c
+10X (mixture)	6	24.6 ± 3.6 ^{ad}	0.07 ± 0.01 ^b
<i>hPTH(1-34)</i>			
1X alone	6	18.6 ± 13.3 ^{cd}	0.09 ± 0.03
+3X (7-84)	6	11.5 ± 5.14 ^d	0.07 ± 0.01 ^c
+10X (7-84)	6	11.7 ± 7.4 ^d	0.07 ± 0.01 ^c
+10X (mixture)	5	21.5 ± 9.2 ^{bd}	0.08 ± 0.01
+10X (39-84)	6	21.4 ± 9.2 ^{bd}	0.11 ± 0.06

Results are means ±SD. 1X,3X,10X = 1,3 and 10 nmol/h; (7-84), (39-84) = hPTH(7-84), hPTH(39-84); (mixture) = 10% hPTH(7-84) and 45% each of hPTH(39-84) and hPTH(53-84). Statistical analysis by one way ANOVA followed by a Student Newman-Keuls test. Compared to sham-solvent control rats: a, p <0.001; b, <0.01; c, p <0.05. Compared to TPTX-solvent rats: d, p <0.001.

fig.1



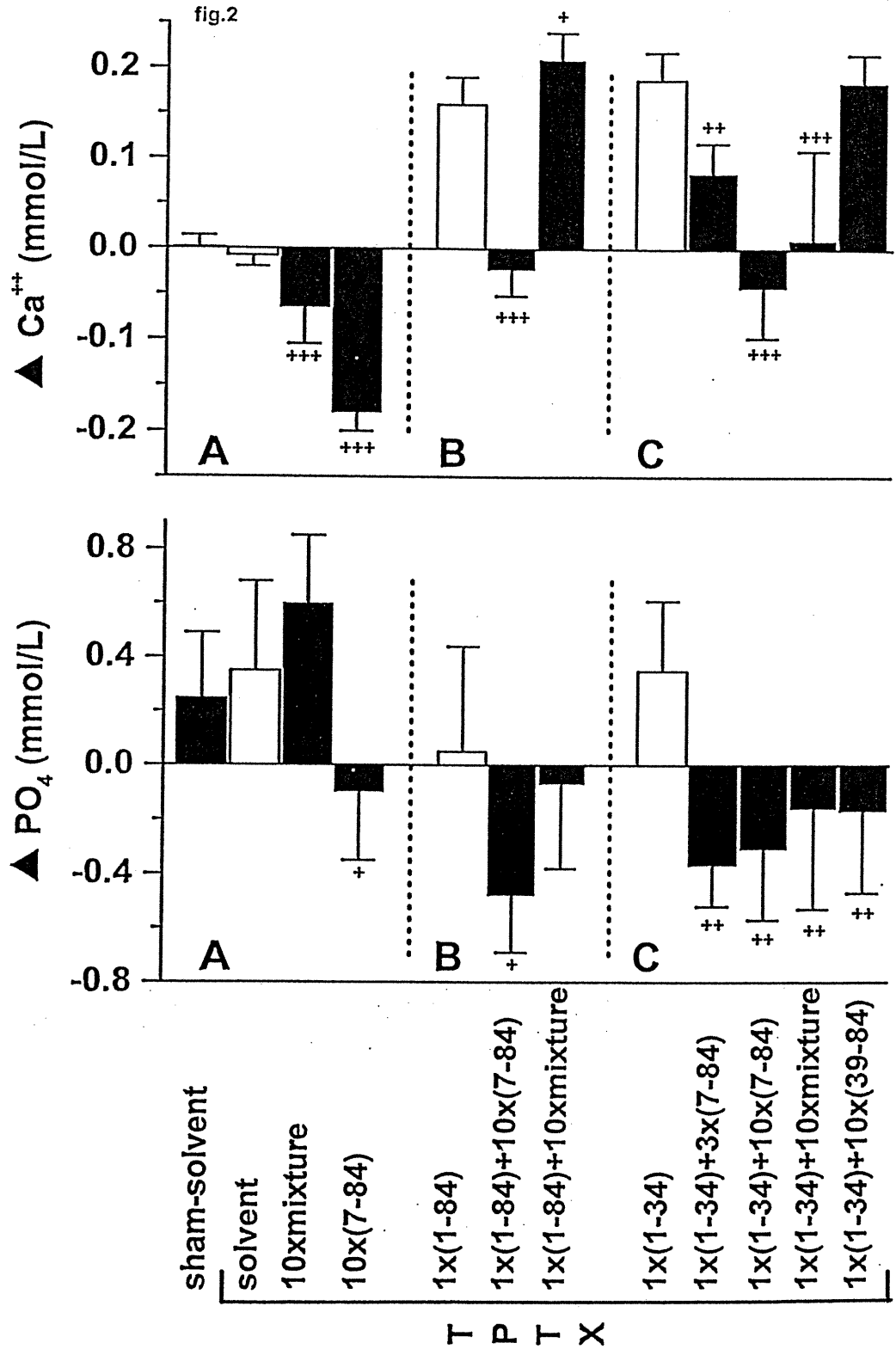
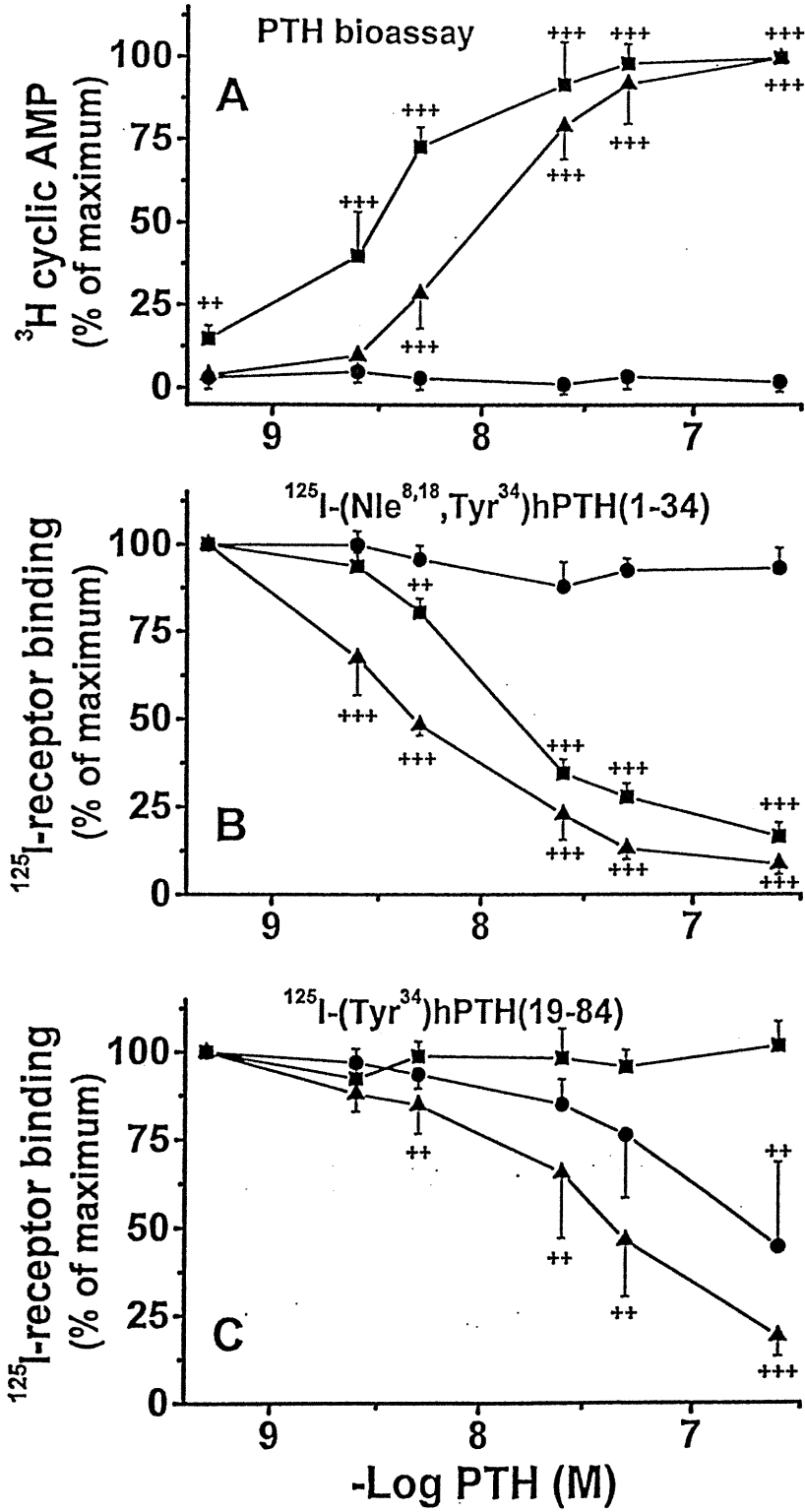


fig.3



REFERENCES

1. **D'Amour P, Labelle F, Lecavalier L, Plourde V, Harvey D** 1986 Influence of serum Ca concentration on circulating molecular forms of PTH in three species. *Am J Physiol* 251:E680-687
2. **D'Amour P, Palardy J, Bashali G, Malette LE, Delean A, Lepage R** 1992 Modulation of circulating parathyroid hormone immunoheterogeneity in man by ionized calcium concentration. *J Clin Endocrinol Metab* 75:525-532
3. **Cloutier M, Rousseau L, Gascon-Barré M, D'Amour P** 1993 Immunological evidences for post-translational control of the parathyroid function by ionized calcium in dogs. *Bone Miner* 22:197-207
4. **Brossard JH, Cloutier M, Roy L, Lepage R, Gascon-Barré M, D'Amour P** 1996 Accumulation of non-(1-84) molecular form of parathyroid hormone (PTH) detected by intact PTH in renal failure: Importance in the interpretation of PTH values. *J Clin Endocrinol Metab* 81:3923-3929
5. **Brossard JH, Whittom S, Lepage R, D'Amour P** 1993 Carboxyl-terminal fragments of parathyroid hormone are not secreted preferentially in primary hyperparathyroidism as they are in other causes of hypercalcemia. *J Clin Endocrinol Metab* 77:413-419
6. **D'Amour P, Weisnagel J, Brossard JH, Ste-Marie LG, Rousseau L, Lepage R** 1998 Functional evidence for two types of parathyroid adenoma. *Clin Endocrinol* 48:593-601

7. **Cloutier M, D'Amour P, Gascon-Barré M, Hamel L** 1990 Low calcium diet in dogs causes a greater increase in parathyroid hormone measured with an intact hormone than with a carboxylterminal assay. *Bone Miner* 9:179-188
8. **Cloutier M, Gascon-Barré M, D'Amour P** 1992 Chronic adaptation of dog parathyroid function to a low calcium, high sodium, vitamin D deficient diet. *J Bone Miner Res* 7:1021-1028
9. **Cloutier M, Brossard JH, Gascon-Barré M, D'Amour P** 1994 Lack of involution of hyperplastic parathyroid glands in dogs. Adaptation via a decrease in the calcium stimulation set point and a change in secretion profile. *J Bone Miner Res* 9:621-629
10. **Cloutier M, Gagnon Y, Gascon-Barré M, Brossard JH, D'Amour P** 1997 Adaptation of parathyroid function to intravenous 1,25-dihydroxyvitamin D₃ or partial parathyroidectomy in normal dogs. *J Endocrinol* 155:133-141
11. **Rao LG, Murray TM** 1985 Binding of intact parathyroid to rat osteosarcoma cells: major contribution of binding sites for the carboxyl-terminal region of the hormone. *Endocrinology* 117:1632-1638
12. **McKee MD, Murray TM** 1985 Binding of intact parathyroid hormone to chicken renal plasma membranes: evidence for a second binding site with carboxyl-terminal specificity. *Endocrinology* 117:1930-1939
13. **DeMay M, Mitchell J, Goltzman D** 1985 Comparison of renal and osseous binding of parathyroid hormone and hormonal fragments. *Am J Physiol* 249:E437-E446

14. **Inomata N, Akiyama M, Kubota N, Jüppner H** 1995 Characterization of a novel PTH-receptor with specificity for the carboxyl-terminal region of PTH(1-84). *Endocrinology* 136:4732-4740
15. **Takasu H, Baba H, Inomata N, Uchiyama Y, Kubota N, Kumaki K, Matsumoto K, Nakajima K, Kimura T, Sakakibara S, Fujita T, Chihara K, Nagai I** 1996 The 69-84 amino acid region of the parathyroid hormone molecule is essential for the interaction of the hormone with the binding sites with carboxyl-terminal specificity. *Endocrinology* 137:5537-5543
16. **Murray TM, Rao LG, Muzaffar SA, Ly H** 1988 Human parathyroid hormone carboxylterminal peptide (53-84) stimulates alkaline phosphatase activity in dexamethasone-treated rat osteosarcoma cell *in vitro*. *Endocrinology* 124:1097-1099
17. **Murray TM, Rao LG, Muzaffar SA** 1991 Dexamethasone-treated ROS 17/2.8 rat osteosarcoma cells are responsive to human carboxylterminal parathyroid hormone peptide hPTH(53-84): stimulation of alkaline phosphatase. *Calcif Tissue Int* 49:120-123
18. **Sutherland MK, Rao LG, Wylie JN, Gupta A, Ly H, Sodek J, Murray TM** 1994 Carboxyl-terminal parathyroid hormone peptide (53-84) elevates alkaline phosphatase and osteocalcin mRNA levels in SaOS-2 cells. *J Bone Miner Res* 9:453-458
19. **Nakamoto C, Baba H, Fukase M, Nakajima K, Kimura T, Sakakibara S, Fujita T, Chihara K** 1993 Individual and combined effects of intact PTH, amino-terminal, and a series of truncated carboxylterminal PTH fragments on alkaline

phosphatase activity in dexamethasone-treated rat osteoblastic osteosarcoma cells, ROS 17/2.8. *Acta Endocrinol* 128:367-372

20. **Kaji H, Sugimoto T, Kanatani M, Miyauchi A, Kimura T, Sakakibara S, Fukase M, Chihara K** 1994 Carboxyl-terminal parathyroid hormone fragments stimulate osteoclast-like cell formation and osteoclastic activity. *Endocrinology* 134:1897-1904

21. **Tsuboi T, Togari A** 1998 Comparison of the effects of carboxylterminal parathyroid hormone peptide (53-84) and aminoterminal peptide (1-34) on mouse tooth germ *in vitro*. *Arch Oral Biol* 43:335-339

22. **Erdmann S, Müller W, Bahrami S, Vornehm SI, Mayer H, Bruckner P, von der Mark K, Burkhardt H** 1996 Differential effects of parathyroid hormone fragments on collagen gene expression in chondrocytes. *J Cell Biol* 135:1179-1191

23. **Erdmann S, Burkhardt H, von der Mark K, Müller W** 1998 Mapping of a carboxyl-terminal active site of parathyroid hormone by calcium-imaging. *Cell Calcium* 23:413-421

24. **Rouleau MF, Warshawsky H, Goltzman D** 1986 Parathyroid hormone binding *in vivo* to renal, hepatic, and skeletal tissues of the rat using a radioautographic approach. *Endocrinology* 118:919-931

25. **Zull JE, Chuang J** 1980 Kidney membrane bindings of native parathyroid hormone compared to binding of its synthetic 1-34 fragment. *J Receptor Res* 1:69-89

26. **Garcia JC, McConkey CL, Martin KJ** 1989 Separate binding sites for intact PTH 1-84 and synthetic PTH 1-34 in canine kidney. *Calcif Tissue Int* 44: 214-219

27. **Puschett JB, McGowan J, Fragola J, Chen TC, Keutmann H, Rosenblatt M** 1984 Difference between 1-84 parathyroid hormone and the 1-34 fragment on renal tubular calcium transport in the dog. *Miner Electrolyte Metab* 10:271-274
28. **El-Shahawy, MA, Fadda GZ, Wisner JR, Renner IG, Omachi H, Massry SG** 1991 Acute administration of intact parathyroid hormone but not its amino terminal fragment stimulates the volume of pancreatic secretion. *Nephron* 57: 69-71
29. **Massry SG, Smogorzewski M** 1994 Mechanisms through which parathyroid hormone mediates the deleterious effects on organ function in uremia. *Semin Nephrol* 14:219-231
30. **Massry SG, Smogorgewski M** 1995 The mechanisms responsible for PTH-induced rise in cytosolic calcium in various cells are not uniform. *Miner Electrolyte Metab* 21:13-28
31. **Rodan SB, Fisher MK, Egan JJ, Epstein PM, Rodan GA** 1984 The effect of dexamethasone on parathyroid hormone stimulation of adenylate cyclase in ROS 17/2.8 cells. *Endocrinology* 115:951-958
32. **Salomon Y, Londos C, Robdell M** 1974 A highly sensitive adenylate cyclase assay. *Ann Biochem* 58:541-548
33. **Meeker RB, Harden TK** 1982 Muscarinic cholinergic receptor-mediated activation of phosphodiesterase. *Mol Pharmacol* 22:310-319
34. **Segre GV, D'Amour P, Potts JT Jr** 1976 Metabolism of radioionated bovine parathyroid hormone in the rat. *Endocrinology* 99:1645-1652

35. **D'Amour P, Segre GV, Roth S, Potts JT Jr** 1979 Analysis of parathyroid hormone and its fragments in rat tissues: chemical identification and microscopical localization. *Clin Invest* 63:89-98
36. **D'Amour P, Labelle F, Wolde-Ghiogis R, Hamel L** 1989 Immunological evidences for the presence of small late carboxylterminal fragment(s) of human parathyroid hormone (PTH) in circulation in man. *J Immunoassay* 10:191-205
37. **Rabbani SA, Kraiser SM, Henderson JE, Bernier SM, Mouland AJ, Roy DR, Zahab DM, Sung WL, Goltzman D, Hendy GN** 1990 Synthesis and characterization of extended and deleted recombinant analogues of parathyroid hormone-(1-84): correlation of peptide structure with function. *Biochemistry* 29:10080-10089.
38. **Born W, Loveridge N, Petermann JB, Kronenberg HM, Potts JT Jr, Fischer JA** 1988 Inhibition of parathyroid hormone bioactivity by human parathyroid hormone (PTH)-(3-84) and PTH-(8-84) synthesized in *Escherichia coli*. *Endocrinology* 123:1848-1853
39. **Arber CE, Zanelli JM, Persons JA, Bitensky L, Chayen J** 1980 Comparison of the bioactivity of highly purified human parathyroid hormone and of synthetic amino- and carboxyl-region fragments. *J Endocrinol* 85:55
40. **Slatopolsky E, Finch J, Clay P, Martin D, Sicard G, Singer G, Gao P, Cantor T, Dusso A.** 2000 A novel mechanism for skeletal resistance in uremia. *Kidney Int* 58:753-761

41. **Divieti P, Juppner H, Bringhurst FR** 2000 Ligand determinants of binding to skeletal receptors specific for the carboxyl-terminus of Intact PTH (1-84). *J Bone Miner Res* 15:S444 (abstract)
42. **Horiuchi N, Holick MF, Potts JT Jr, Rosenblatt M** 1986 A parathyroid hormone inhibitor *in vivo*: design and biological evaluation of a hormone analog. *Science* 220: 1053-1055
43. **Doppelt SH, Neer RM, Nussbaum SR, Federico P, Potts JT Jr, Rosenblatt M** 1986 Inhibition of the *in vivo* parathyroid hormone-mediated calcemic response in rats by a synthetic hormone antagonist. *Proc Nat Acad Sci (USA)* 83:7557-7560
44. **Brossard JH, Lepage R, Cardinal H, Roy L, Rousseau L, Dorais C, D'Amour P** 2000 Influence of glomerular filtration rate on non-(1-84) parathyroid hormone (PTH) detected by intact PTH assays. *Clin Chem* 46:697-703

CAPTION TO FIGURE 1

Calcemic response to various PTH infusion regimens or to solvent alone infusion in TPTX rats (—) and to solvent alone infusion in sham-operated control rats (----). In A, the two solvent alone groups and the two fragment alone groups are illustrated and comparisons are made with the TPTX- solvent group (black symbols). In B and C, all groups infused with hPTH(1-84) or hPTH (1-34), 1 nmol/h, respectively are illustrated and comparisons are made with the hPTH(1-84) or hPTH (1-34) alone group (black symbols). Results are means \pm SD. Statistical analysis by a one way ANOVA followed by a Student Newman-Keuls test: +, $p < 0.05$; ++, $p < 0.01$; +++, $p < 0.001$. 3X, 10X = 3, 10 nmol/h; (7-84) = hPTH (7-84); mixture = 10 % of hPTH(7-84) and 45% each of hPTH(39-84) and hPTH(53-84).

CAPTION TO FIGURE 2

Differences in serum calcium and phosphate concentration induced by various PTH infusion regimens or by solvent alone infusion over 2 h in TPTX rats and by solvent alone infusion in sham-operated control rats (1st group to the left). In A, the two solvent alone groups and the two fragment alone group are illustrated and comparisons are made with the TPTX solvent group (clear box). In B and C, all groups infused with hPTH (1-84) or hPTH (1-34) respectively are illustrated and comparisons are made with the hPTH (1-84) or (1-34) alone group (clear box). Results are means \pm SD. Statistical analysis by a one

way ANOVA followed by a Student Newman-Keuls test: +, $p < 0.05$; ++, $p < 0.01$; +++, $p < 0.001$. 1X, 3X, 10X = 1, 3, 10 nmol/h; (7-84), (1-84), (1-34) = hPTH(7-84), hPTH(1-84), hPTH(1-34); mixture = 10 % of hPTH(7-84) and 45% each of hPTH(39-84) and hPTH(53-84).

CAPTION TO FIGURE 3

Influence of hPTH(1-84) (▲), hPTH(1-34) (■) and hPTH(7-84) (●) on cyclic AMP production (A) and on displacement of ^{125}I -[nle^{8,18} tyr³⁴] hPTH (1-34) tracer from the PTH/PTHrP receptor (B) and of ^{125}I -[tyr³⁴] hPTH(19-84) tracer from the carboxyl-PTH receptor (C) in ROS17-2.8 clonal cells. Results are means \pm S.D. of 4-5 (A) or 2 (B, C) different experiments in triplicate. Statistical analysis by a one way ANOVA followed by a Student Newman-Keuls test: in A, results obtained with hPTH (7-84) are compared with those of the 2 other PTH preparations; in B, again, results with hPTH (7-84) are compared to those of the 2 other PTH preparations; in C, results obtained with hPTH(1-34) are compared to those of the 2 other PTH preparations. ; ++, $p < 0.01$; +++, $p < 0.01$.

COMMENTAIRE

Jusqu'à présent, la plupart des études portant sur l'activité biologique des fragments carboxyl-terminaux de la PTH ont été réalisés *in-vitro* avec des préparations cellulaires ou membranaires. Nos résultats sont parmi les premiers à démontrer un effet inhibiteur des fragments carboxyl-terminaux sur l'activité biologique de la PTH *in-vivo*.

L'étude que nous avons effectuée démontre que la hPTH(7-84), un prototype de *non*-PTH(1-84), et que d'autres fragments représentatifs de ceux retrouvés en circulation, ont des effets biologiques distincts *in-vivo*. L'effet le plus important est un effet hypocalcémiant qui s'exerce au delà de l'effet d'une parathyroïdectomie et donc du retrait de l'effet biologique de la rPTH(1-84) sur le récepteur PTH/PTHrP. Cet effet apparaît aussi indépendant de celui de la PTH(1-34) ou de la PTH(1-84) sur le récepteur classique dans la mesure où la calcémie mesurée lors d'infusion mixte [hPTH(1-84) ou hPTH(1-34) avec hPTH(7-84) ou mixture] semble refléter la somme de l'effet positif de la hPTH(1-84) ou hPTH(1-34) sur le récepteur PTH/PTHrP et l'effet négatif de la hPTH(7-84) ou de la mixture sur le récepteur carboxyl-terminal de la PTH. La réduction de la phosphaturie est observée mais statistiquement non concluante. Selon les études de déplacement effectuées chez les cellules ROS 17/2.8 utilisant les traceurs spécifiques pour les deux types de récepteurs, l'effet de la hPTH(7-84) serait par le récepteur C-PTH et n'effectue pas la production de l'AMPC. Ces résultats suggèrent que la hPTH(7-84), avec sa région aminotermine partiellement conservée, est le plus puissant des fragments carboxyl-terminaux étudiés. Son effet biologique sur la calcémie serait potentialisé par l'addition d'autres fragments dans un mélange.

L'effet inhibiteur complet de la hPTH(7-84) et partiel du mélange de fragments sur la réponse calcique induite par la PTH biologiquement active renforce l'hypothèse étudiée selon laquelle l'interaction de ces fragments avec le récepteur C-PTH serait responsable des résultats obtenus.

PTH Metabolites in Renal Failure: Bioactivity and Clinical Implications

Jean-Hugues Brossard, Loan Nguyen Yamamoto, Pierre D'Amour

Centre de recherche, Centre hospitalier de l'Université de Montréal - Hôpital Saint-Luc

et Départements de médecine Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

Keywords:

parathyroid hormone, non-(1-84)PTH, renal failure, secondary
hyperparathyroidism, calcium

Short title:

Non-(1-84)PTH

Abstract

Non-(1-84)PTH are large circulating carboxyl-terminal (C)-PTH fragments with a partially preserved amino-terminal (N)-structure. They were discovered during HPLC analysis of circulating PTH molecular forms detected by an Intact (I)-PTH assay. Like other C-PTH fragments, they accumulate in blood in renal failure to account for up to 50% of I-PTH. They are secreted by the parathyroid glands in humans, and are generated by the peripheral metabolism of hPTH(1-84) in rats.

The exact structure of non-(1-84)PTH fragments is not known. To study the possible role of non-(1-84) in PTH biology, hPTH(7-84) has been used as a surrogate, being the only large C-fragment available on the market. In anesthetized, thyroparathyroidectomized rats, hPTH(7-84) caused hypocalcemia beyond that induced by surgery. It also blocked the calcemic response to hPTH(1-84) or hPTH(1-34). Other smaller C-PTH fragments, such as hPTH(39-84) and hPTH(53-84), were synergetic to hPTH(7-84) effects. hPTH(7-84) did not bind to the PTH/PTHrP receptor but only to the C-PTH receptor in ROS 17/2.8 clonal cells, and did not stimulate cAMP production by the same cells, suggesting that its hypocalcemic action was mediated via a receptor different from the PTH/PTHrP receptor, and that the calcium concentration measured resulted from the sum of the positive effect of hPTH(1-84) on the PTH/PTHrP receptor and of the negative effect of hPTH(7-84) and of C-PTH fragments on the C-PTH receptor. These data will change our understanding of circulating calcium regulation, which must now

be viewed as the end result of opposite actions on two PTH receptors. PTH immunoheterogeneity, a highly-regulated phenomenon, contributes to this dual biological effect, generating an agonist for the two different receptors. Clinically, these results could have some implications in our knowledge of the PTH resistance of renal failure, of renal osteodystrophy and of certain aspects of the uremic syndrome.

PTH metabolites

The existence of PTH metabolites or PTH fragments in the circulation has been known since the early days of PTH assay [1]. These PTH fragments, made up of the carboxyl-terminal (C) structure of PTH [2-5], are secreted by the parathyroid glands [6-12] and also generated by the peripheral metabolism of PTH(1-84) in the liver [13-15]. Secretion of C-PTH fragments by the parathyroid glands is a calcium-regulated process [8,12]. Hypercalcemia reduces overall PTH secretion and favors C-PTH fragments release while hypocalcemia stimulates overall PTH secretion and favors PTH(1-84) release. The formation of C-PTH fragments by the liver, on the other hand, appears more substrate-dependent and unregulated by calcium [16]. The main fragments generated by these processes start at positions 34, 37 and 39 of the PTH structure [9,14]. In a normal individual, C-PTH fragments represent 80%, and PTH(1-84) 20%, of circulating C-PTH [17-19]. These numbers are modified to 90% and 10% respectively in hypercalcemia, and to 70 and 30% in hypocalcemia [17-19]. So far, little of PTH biological activity has been associated with C-PTH fragments because they do not react with the PTH/PTHrP receptor responsible for most known PTH actions [20]. But some PTH biological effects on bone have been associated with synthetic C-PTH fragments, possibly via a carboxyl-terminal PTH receptor [21].

PTH metabolites in renal failure

C-PTH fragments have been more of a clinical problem in renal failure. They are normally cleared by the kidney [15,22] and, thus, accumulate in the circulation of renal failure patients. This has made the evaluation of PTH concentration in renal failure more difficult with C-PTH and mid C-PTH assays, often requiring a different range of normal values [23,24]. C-PTH fragments represent more than 95% of circulating C-PTH under any calcemic condition [19] in terminal renal failure. The situation of PTH assays was improved in 1987 when the Intact-PTH radioimmunoassay was developed [25]. This assay reacted only with hPTH(1-84), the biologically active form of the hormone on the PTH/PTHrP receptor [20], and not with amino- or C-terminal synthetic PTH fragments [25,26]. The assay thus became an ideal tool in renal failure patients. Many studies were performed on PTH levels and on parathyroid function in these patients which improved our knowledge of PTH in renal failure [24,27-29]. In 1993 [30], while studying the modulation of PTH molecular forms in the circulation by Ca in normal individuals, we used HPLC to separate PTH molecular forms and several PTH assays to reveal them. We noted for the first time that Nichol's Intact-PTH assay reacted with molecular forms of PTH other than PTH(1-84). The story of these PTH molecular forms (also called non-(1-84) PTH) and of their impact on PTH physiology will now be reviewed.

Discovery of non-(1-84)PTH

Non-(1-84)PTH are large carboxyl-terminal (C)-PTH fragments with a partially preserved amino-terminal (N)-structure. They were first described in 1993 in normal individuals during HPLC analysis of circulating PTH molecular forms detected by Nichol's intact (I)-PTH assay [30]. This assay recognized a major circulating PTH peak co-migrating with hPTH(1-84), but also a minor peak migrating in front of hPTH(1-84). The latter represented 12% to 25% of I-PTH immunoreactivity and 2.5% to 4.2% of C-PTH immunoreactivity [19], depending on calcemic conditions. Regulation of non-(1-84)PTH by Ca^{++} concentration appeared similar to that of other C-PTH fragments with a lesser decrease in hypercalcemia compared to hPTH(1-84) and a lesser increase in hypocalcemia, leading to an elevated non-(1-84)PTH/hPTH(1-84) ratio in the former condition and a lower ratio in the latter condition [17-19].

Since Nichol's I-PTH assay did not react to hPTH(1-34) (as it was not recognized by the C-PTH-directed capture antibody) nor to C-PTH fragments like hPTH(39-84) or hPTH(53-84) (as they did not react to the N-directed ^{125}I -labelled antibody [25]) we postulated that this non-(1-84)PTH peak was composed of large C-PTH fragments with a sufficiently preserved N-structure to allow interaction with the revealing antibody. Since most I-PTH assays revealing antibodies have their antigenic determinant in region (15-34) of the PTH structure [31,32], we postulated that this region or even a larger one was preserved within non-(1-84)PTH

molecules. Experiments with hPTH(7-84), when it became available, indirectly demonstrated the latter point. This molecule reacted like hPTH(1-84) in Nichol's I-PTH assay and behaved like non-(1-84)PTH upon HPLC separation [33]. These similarities of non-(1-84)PTH with very large PTH fragments raised the possibility that non-(1-84)PTH could interact with the PTH/PTHrP receptor to inhibit or influence some PTH(1-84) biological effects in the same way that certain analogues of hPTH(1-34) do [34,35]. There is also a possibility of interaction with the less well-characterized C-PTH receptor [36,37].

Non-(1-84)PTH in renal failure

Non-(1-84)PTH represents only 12-25% of I-PTH in normal individuals [19], but accumulates in renal failure just as C-PTH fragments do [15,22]. In hemodialysed patients with various degrees of secondary hyperparathyroidism (Figure 1) non-(1-84)PTH represented 35 to 55% of I-PTH immunoreactivity (depending on calcemic conditions) but only 1.1 to 1.8% of C-PTH immunoreactivity in the same circumstances [19]. The increased level of non-(1-84)PTH and of other C-PTH fragments in the circulation was proportional to the degree of renal failure [38]. A new PTH assay [32] which reacts only with hPTH(1-84) and not with hPTH(7-84) has allowed indirect measurement of non-(1-84)PTH by assessing the difference between I-PTH and the new assay results, without the need for HPLC separation. This new technique has confirmed our previous HPLC based findings on non-(1-84)PTH in renal failure patients [39].

Origin of non-(1-84)PTH

Non-(1-84)PTH has an origin similar to other C-PTH fragments: parathyroid gland secretion and peripheral PTH(1-84) metabolism. In normal rats, non-(1-84)PTH is generated from peripheral metabolism of hPTH(1-84) [40]. The amount of non-(1-84) PTH is increased when they are acutely-nephrectomized because the amount of residual substrate is increased and renal clearance of non-(1-84)PTH is abolished. Non-(1-84)PTH is also secreted by parathyroid cells isolated from parathyroid adenoma [40].

Biological effects of non-(1-84)PTH

The biological activity of non-(1-84)PTH can not be addressed directly because the exact nature of non-(1-84)PTH remained unknown. hPTH(7-84), the only available large C-fragment representative of non-(1-84)PTH on the market, was used to study the biological activity of such fragments. We worked with an *in vivo* model where rats were anesthetized and acutely parathyroidectomized to remove the influence of endogenous rat PTH. Two hours after parathyroidectomy, when calcium had stabilized 0.2 mmol/L lower than initially, the rats were infused I.V. for 2 hours with either hPTH(1-34), hPTH(1-84), hPTH(7-84) or a mixture of fragments (10% hPTH(7-84) and 45% each of hPTH(39-84) and hPTH(53-84) mimicking the *in vivo* situation) alone, or with hPTH(1-34) or hPTH(1-84) to which hPTH(7-84) or the mixture of fragments had been added at 3- to 10-fold the molar concentration of the former two. These results are illustrated in Figure 2 [41]. The

mixture and hPTH(7-84) alone were able to reduce Ca^{++} concentration below the level observed in parathyroidectomized control rats. The decrease induced by hPTH(7-84) was as significant as that induced by acute parathyroidectomy. A 10-fold molar excess of hPTH(7-84) also prevented a calcemic response to hPTH(1-84), but a 10-fold molar excess of mixture did not. Various concentrations of hPTH(7-84) exerted a proportional degree of inhibition on the calcemic response to hPTH(1-34), and in this case, the mixture also had an inhibitory effect. hPTH(7-84) alone or with hPTH(1-34) or hPTH(1-84) reduced serum phosphate and phosphaturia. Similar results have been obtained by two other groups. In the first case, thyroparathyroidectomized rats on a low-calcium diet were given hPTH(7-84) and hPTH(1-84) by repeated I.P. injections [42]. In the second case, hPTH(7-84) and hPTH(1-84) were infused S.C. via implanted osmotic mini-pumps in parathyroidectomized and nephrectomized rats [43]

Using ROS 17/2.8 clonal cells and appropriate tracers specific for the PTH/PTHrP or C-PTH receptor, we demonstrated that hPTH(7-84) did not react with the PTH/PTHrP receptor but only with the C-PTH receptor, while hPTH(1-34) reacted with the PTH/PTHrP receptor only, and hPTH(1-84) with both receptors [41]. hPTH(7-84) did not stimulate cAMP production in these cells, nor did it prevent the cAMP response induced by hPTH(1-84) or hPTH(1-34) [41,42], suggesting that the effect of hPTH(7-84) was exerted via a receptor different from the PTH/PTHrP receptor. This means that the experimental Ca^{++} concentration

measured when co-infusing hPTH(1-34) and hPTH(7-84) is the sum of the positive influence of hPTH(1-34) on the PTH/PTHrP receptor and of the negative action of hPTH(7-84) on the C-PTH receptor.

Since the C-PTH receptor exists on osteoblasts [44] and osteocytes [45], we proposed that the effect of hPTH(7-84) could have been to inhibit osteocytic osteolysis and possibly also to promote accretion of calcium and phosphate into bone. Inhibition of ^{45}Ca release from murine calvarial bone by hPTH(7-84) has since been demonstrated in vitro [46]. hPTH(7-84) also inhibited agonist-induced bone resorption caused by a variety of agents, including PTH(1-84), PTH(1-34), $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, prostaglandin E_2 and Interleukin-II in the same system [46]. In the same study, hPTH(7-84) also reduced, by 65%, $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ -induced TRAP-positive cell formation in murine marrow culture. hPTH(7-84) has also been demonstrated recently to inhibit hPTH(1-84)-induced bone turnover in parathyroidectomized-nephrectomized rats [43].

Implications

The first implication of these findings is a different appreciation of serum calcium regulation. One must now view the possibility of a negative control of serum calcium concentration via non-(1-84)PTH, C-PTH fragments and the C-PTH receptor [41,42]. This would make a lot of sense in the view of what we know about PTH molecular forms regulation by calcium [17-19]. Acutely, a low calcium concentration favors a high hPTH(1-84) level (and both low non-(1-

84)PTH/hPTH(1-84) and C-PTH/I-PTH ratios), which maximizes the hypercalcemic effect of hPTH(1-84) through the PTH/PTHrP receptor. A high calcium concentration favors a low hPTH(1-84) level (and both high non-(1-84)PTH/hPTH(1-84) and C-PTH/I-PTH ratios), which maximizes the hypocalcemic action of non-(1-84)PTH and of other C-PTH fragments through the C-PTH receptor. Further modulation of these events can be observed in a variety of chronic experimental conditions where more or less PTH is needed to achieve a normal calcium concentration. When hypocalcemia tends to prevail or PTH need increases, the C-PTH/I-PTH ratio decreases further with time to maximize hPTH(1-84) effects [47-49]. When PTH need decreases or calcium rises, the C-PTH/I-PTH ratio increases further with time to maximize C-PTH fragment effects [49,50]. This is summarized in Figure 3.

The second implication derives from the first. Circulating PTH immunoheterogeneity no longer be considered an inactive process leading to the formation of biologically-inactive C-PTH fragments. The formation of these fragments is a highly-regulated process, at least at the level of the parathyroid glands [8,12]. This is probably so because these fragments have biological effects distinct from those of hPTH(1-84) [41,42]. PTH must now be considered a polyhormone with different molecular forms acting on different receptors to produce different, sometimes opposite biological actions [41].

The clinical role of non-(1-84)PTH and of other C-PTH fragments is more difficult to evaluate. From previous results [41,42], it is tempting to implicate non-(1-84)PTH in the PTH resistance of renal failure [41,42], but one must be careful when doing so. Experiments with hPTH(7-84) are not necessarily experiments with non-(1-84)PTH, and until the exact structure of non-(1-84)PTH molecular forms is known and studies repeated with these natural molecules, prudence should prevail. The non-(1-84)PTH concentration in renal failure is at best equal to that of hPTH(1-84), and investigations into hPTH(7-84) have generally required much higher levels of hPTH(7-84) than hPTH(1-84) to achieve biological effects [41]. In one case, equimolar concentrations were given I.P. but hPTH(7-84) was injected before hPTH(1-84) [42]. All this is to say that other C-PTH fragments, even if less biologically active, will probably be also important because they make up the bulk of circulating PTH in renal failure [19]. Experiments performed with a mixture of fragments, where hPTH(7-84) represented only 10% of the total, are of particular interest. They showed a biological effect of the fragment mixture while hPTH(7-84) alone, at the same concentration, had no impact [41]. Furthermore, if C-PTH fragments are implicated in the PTH resistance of renal failure and if higher levels of PTH(1-84) are required to achieve biological effects on bone [28], one should be able to demonstrate that as PTH levels increase, the non-(1-84)PTH/hPTH(1-84) or the C-PTH/I-PTH ratio values decrease to maximize the hypercalcemic outcome of hPTH(1-84). This is indeed the case, as patients with low basal I-PTH levels have higher C-PTH/I-PTH or non-(1-84)PTH/hPTH(1-

84) ratios at any calcium concentration than patients with high basal I-PTH levels [19,51]. Although this does not prove that C-PTH fragments cause PTH resistance, it shows adaptation of parathyroid function compatible with the concept.

The possible implication of non-(1-84)PTH and of other C-PTH fragments in renal osteodystrophy is suggested by recent studies dealing with the bone effects of hPTH(7-84) in vivo in rats [43] and in murine bone marrow culture in vitro [46] as well as by a study in renal failure patients where low hPTH(1-84) levels with a low hPTH(1-84)/non-(1-84)PTH ratio was associated with low turnover bone disease [51]. In the two rat studies, hPTH(7-84) reduced hPTH(1-84)-induced bone turnover and decreased the number of 1,25 (OH)₂ D-induced TRAP-positive cells in murine marrow culture, suggesting that high non-(1-84)PTH levels could be associated with reduced bone turnover. However, this is not necessarily the case in patients because higher PTH levels were found with lower C-PTH/I-PTH or non-(1-84)PTH/hPTH(1-84) ratios [19,51], and lower levels of non-(1-84)PTH relative to hPTH(1-84). Patients with severe secondary hyperparathyroidism usually have the highest hPTH(1-84) and non-(1-84)PTH levels but also the lowest non-(1-84)PTH/hPTH(1-84) or C-PTH/I-PTH ratios observed in renal failure [19,51]. Patients with suppressed hPTH(1-84) levels have low non-(1-84)PTH levels but high non-(1-84)PTH/hPTH(1-84) or C-PTH/I-PTH ratios [19,51].

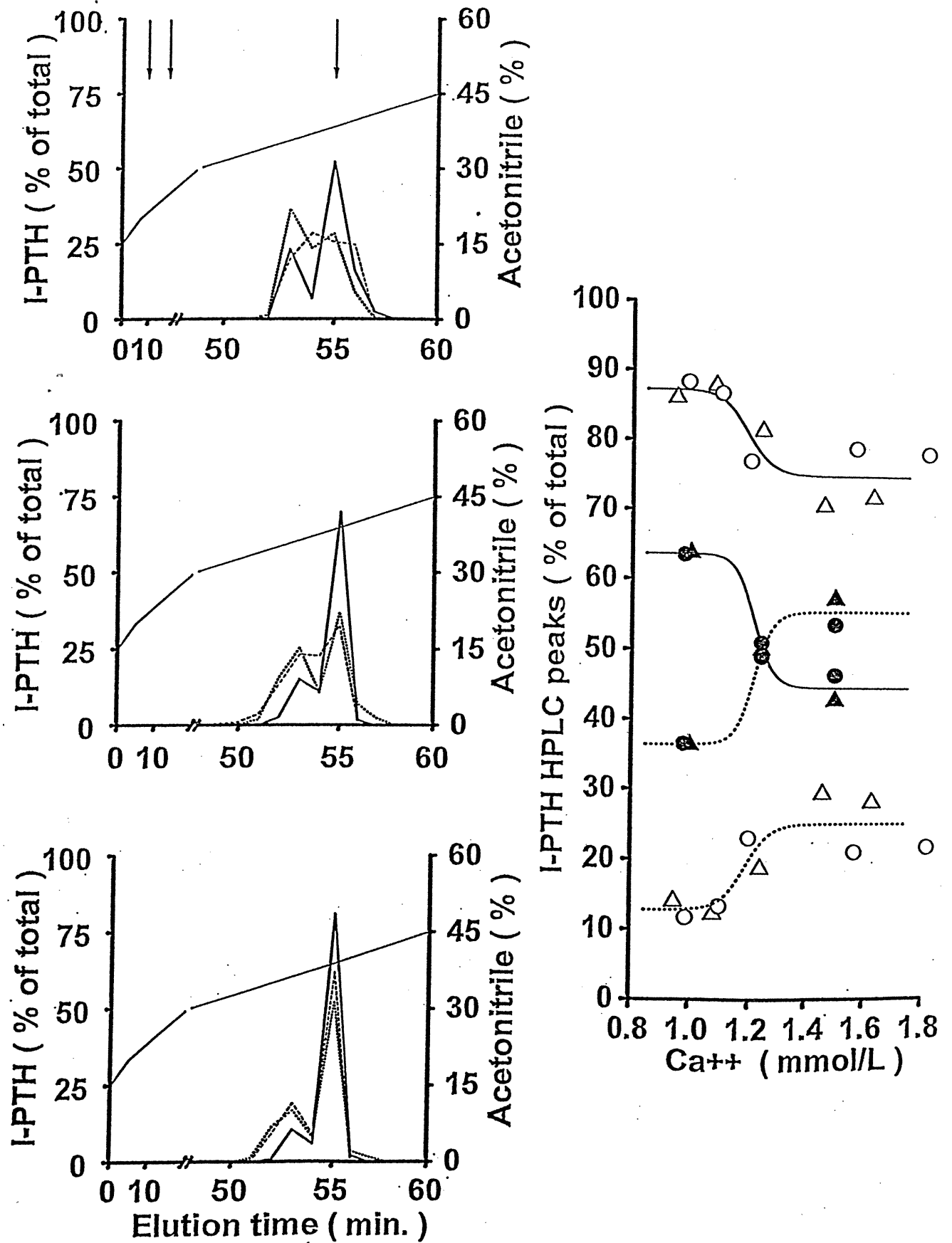
The ratio of non-(1-84)PTH/hPTH(1-84) and/or the ratio of C-PTH/I-PTH will probably prove to be as important as hPTH(1-84) levels in evaluating bone turnover in terminal renal failure. Already there are suggestions from older literature that severe secondary hyperparathyroidism is associated with high I-PTH levels and lower C-PTH/I-PTH ratios [23,24], and low turnover bone disease, with low I-PTH levels and higher C-PTH/I-PTH ratios. Since the regulation of non-(1-84)PTH is similar to that of other C-PTH fragments, it is unlikely that measurement of the non-(1-84)PTH/hPTH(1-84) ratio will offer better prediction of bone biopsy results than the C-PTH/I-PTH ratio.

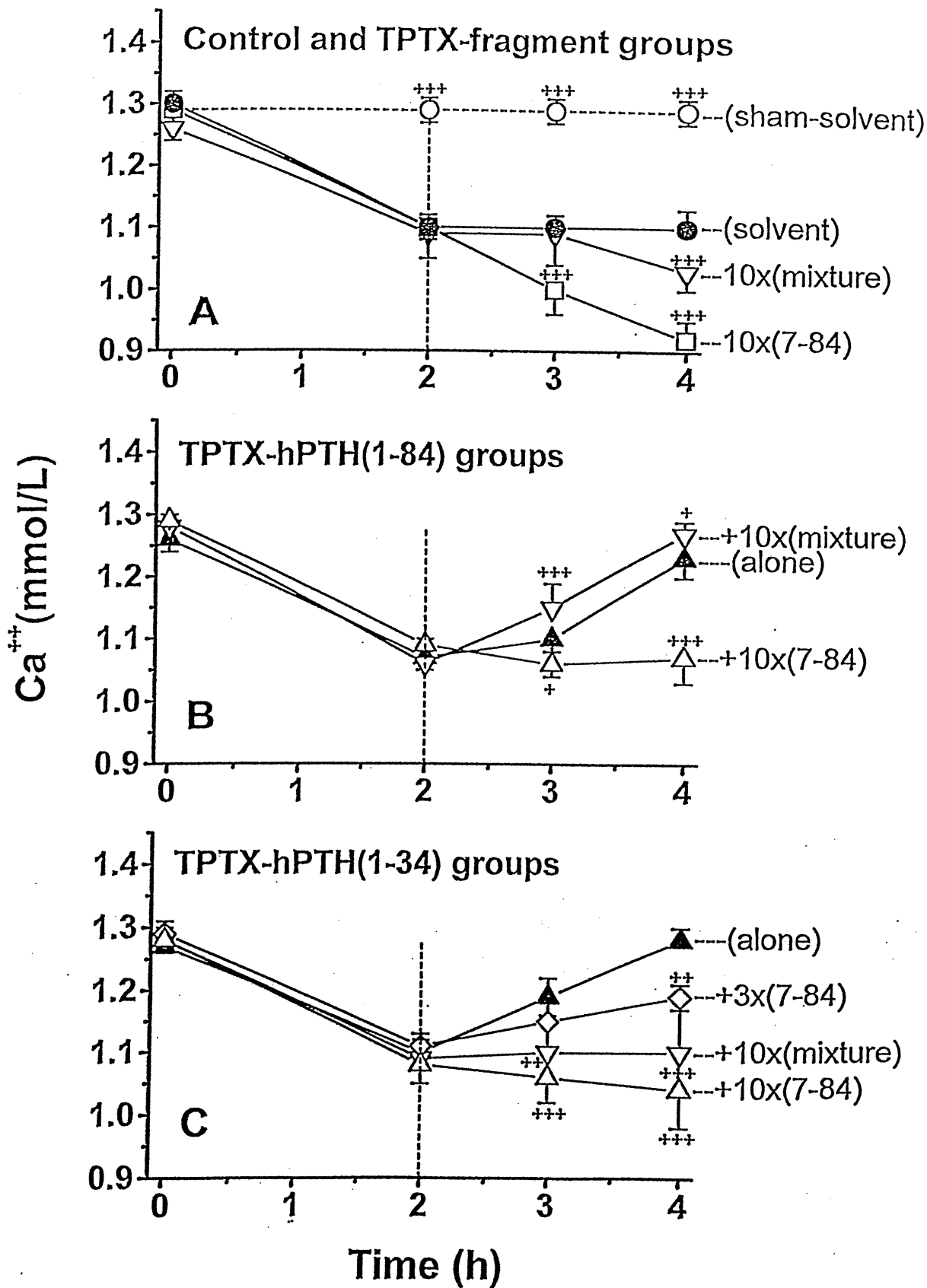
The last point to be dealt with is the possible role of non-(1-84)PTH and of other C-PTH fragments in the uremic syndrome. This problem was addressed extensively in the past by Massry and his colleagues [52,53], who suggested that the difference observed between hPTH(1-84) and hPTH(1-34) on intracellular calcium concentration in several *in vivo* and *in vitro* systems [52,53] could be related to the interaction of the former with the C-PTH receptor. If this is true, non-(1-84)PTH and other C-PTH fragments could indeed be toxic in renal failure patients and could explain several aspects of the uremic syndrome. More experiments need to be done with hPTH(7-84) and other C-PTH fragments to verify this hypothesis.

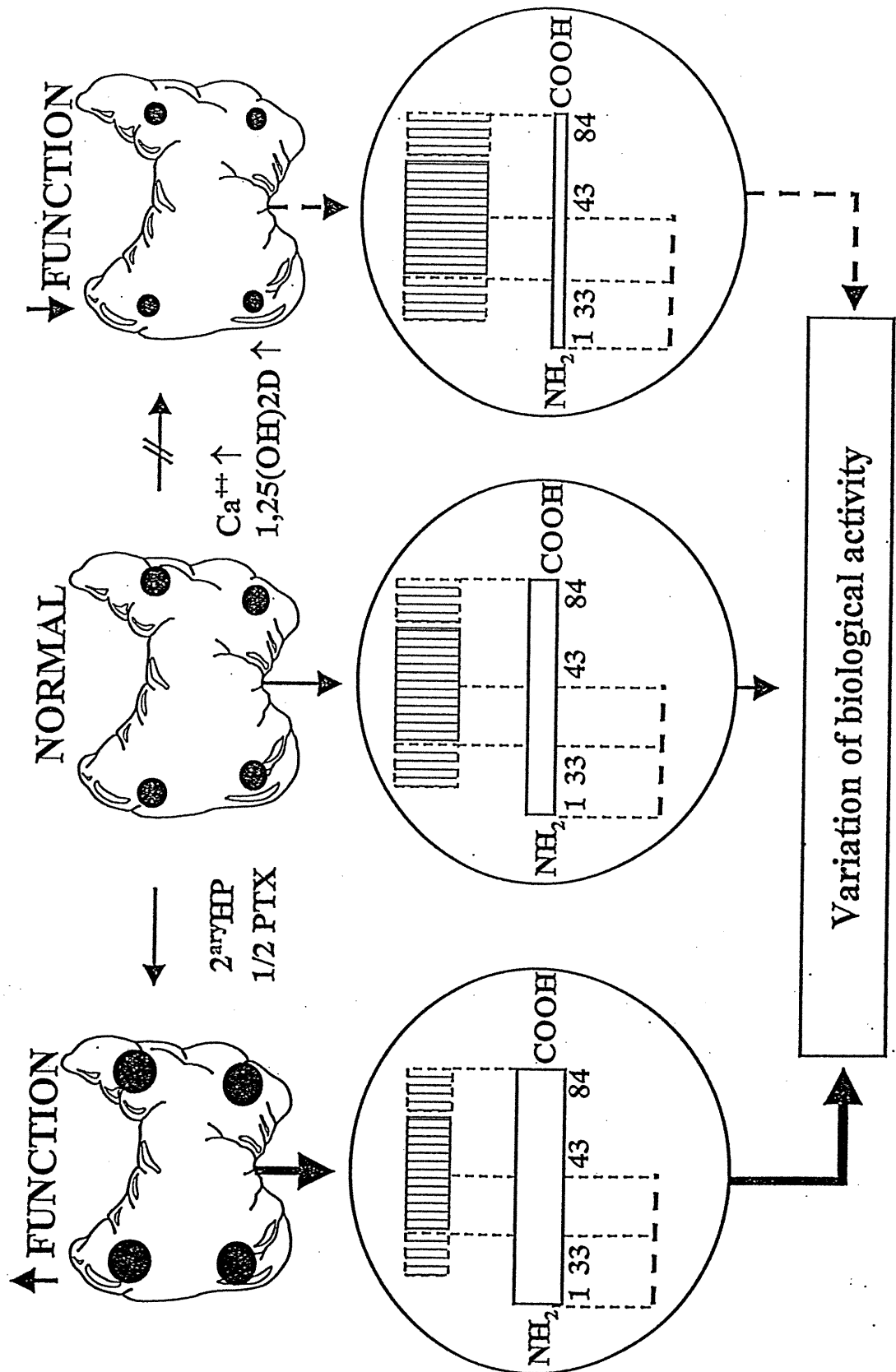
Overall, we can conclude that the discovery of non-(1-84)PTH has opened a new field of research regarding C-PTH fragments and their biological effects in human health and disease. It has also permitted new developments in the PTH assay field of research.

Acknowledgments

The work presented in this review was supported by Grant MOP 7643 from the Canadian Institutes of Health Research. The authors thank Martine Campeau and Manon Livernois for typing this manuscript and Ovid DaSilva for editing it.







References

1. Berson SA, Yalow RS: Immunochemical heterogeneity of parathyroid hormone in plasma. *J Clin Endocrinol* 28:1037-1047, 1968
2. Canterbury JM, Reiss E: Multiple immunoreactive forms of parathyroid hormone in human serum. *Proc Soc Exp Biol Med* 140:1393-1398, 1972
3. Segre GV, Habener JF, Powell D, Tregear GW, Potts JT Jr: Parathyroid hormone in human plasma. Immunochemical characterization and biological implications. *J Clin Invest* 51:3163-3172, 1972
4. Goldsmith RS, Furszyfer J, Johnson WJ, et al: Etiology of hyperparathyroidism and bone disease during chronic hemodialysis. III. Evaluation of parathyroid suppressibility. *J Clin Invest* 52:173-180, 1973
5. Silverman R, Yalow RS: Heterogeneity of parathyroid hormone. Clinical and physiological implications. *J Clin Invest* 52:1958-1971, 1973
6. Hanley DA, Takatsuki K, Sultan JM, et al: Direct release of parathyroid hormone fragments from functioning bovine parathyroid glands in vitro. *J Clin Invest* 62:1247-1254, 1978
7. DiBella FP, Gilkenson JB, Arnaud CD: Carboxyl-terminal fragments of human parathyroid hormone in parathyroid tumors: unique new source of immunogens for the production of antisera potentially useful in the radioimmunoassay of parathyroid hormone in human serum. *J Clin Endocrinol Metab* 41:604-612, 1978
8. Mayer GP, Keaton JA, Hurst JG, Habener JF: Effect of plasma calcium

- concentration on the relative proportion of hormone and carboxyl fragments in parathyroid venous blood. *Endocrinology* 104:1778-1784, 1979
9. Morrissey JJ, Hamilton JW, MacGregor RR, Cohn DV: The secretion of parathormone fragments 34-84 and 37-84 by dispersed porcine parathyroid cells. *Endocrinology* 107:164-171, 1980
 10. MacGregor RR, Cohn DV, Hamilton JW: The content of carboxyl-terminal fragments of parathormone in extracts of fresh bovine parathyroids. *Endocrinology* 112:1019-1025, 1983
 11. MacGregor RR, Jilka RL, Hamilton JW: Formation and secretion of fragments of parathormone. Identification of cleavage sites. *J Biol Chem* 261:1929-1934, 1986
 12. Hanley DA, Axer LM: Calcium-dependent release of carboxyl-terminal fragments of parathyroid hormone by hyperplastic human parathyroid tissue in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 63:1075-1079, 1986
 13. Segre GV, D'Amour P, Potts JT Jr: Metabolism of radioiodinated bovine parathyroid hormone in the rat. *Endocrinology* 99:1645-1652, 1976
 14. D'Amour P, Segre GV, Roth S, Potts JT Jr: Analysis of parathyroid hormone and its fragments in rat tissues: chemical identification and microscopical localisation. *J Clin Invest* 63:89-98, 1979
 15. Segre GV, D'Amour P, Hultman A, Potts JT Jr: Effects of hepatectomy, nephrectomy and nephrectomy/uremia on the metabolism of parathyroid hormone in the rat. *J Clin Invest* 67:439-448, 1981

16. D'Amour P, Huet PM: Serum calcium does not influence the extraction of ¹²⁵I-bovine parathyroid hormone by the dog liver in vivo. *Clin Invest Med* 8:202-207, 1985
17. D'Amour P, Labelle F, Lecavalier L, et al: Influence of serum Ca concentration on circulating molecular forms of PTH in three species. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 251:E680-E687, 1986
18. D'Amour P, Palardy J, Bashali G, et al: Modulation of circulating parathyroid hormone immunoheterogeneity in man by ionized calcium concentration. *J Clin Endocrinol Metab* 75:525-532, 1992
19. Brossard JH, Cloutier M, Roy L, et al: Accumulation of non-(1-84) molecular form of parathyroid hormone (PTH) detected by intact PTH assay in renal failure: importance in the interpretation of PTH values. *J Clin Endocrinol Metab* 81:3923-3929, 1996
20. Pines M, Adams AE, Stueckle S, et al: Generation and characterization of human kidney cell lines stably expressing recombinant human PTH/PTHrP receptor: lack of interaction with a C-terminal human PTH peptide. *Endocrinology* 135:1713-1716, 1994
21. Murray TM, Rao LG, Rizzoli RE: Interactions of parathyroid hormone, parathyroid hormone-related protein, and their fragments with conventional and non conventional receptor sites. *In: The Parathyroids*. Bilezikian JP, Levine MA, Marcus R (eds). New York, Raven Press, pp 185-211, 1994

22. D'Amour P, Lazure C, Labelle F: Metabolism of radioiodinated carboxyl-terminal fragments of bovine parathyroid hormone in normal and anephric rats. *Endocrinology* 117:137-134, 1985
23. Cohen-Solal ME, Sebert JL, Boudailliez B, et al: Comparison of intact, midregion and carboxyl-terminal assays of parathyroid hormone for the diagnosis of bone disease in hemodialyzed patients. *J Clin Endocrinol Metab* 73:510-514, 1991
24. Coen G, Mazzaferro S, Ballanti P, et al: Two-site immunoradiometric intact parathyroid hormone assay versus C-terminal parathyroid hormone in predicting osteodystrophic bone lesions in predialysis chronic renal failure. *J Lab Clin Med* 122:103-109, 1993
25. Nussbaum SR, Zahradnik RJ, Lavigne JR, et al: Highly sensitive two-site immunoradiometric assay of parathyrin and its clinical utility in evaluating patients with hypercalcemia. *Clin Chem* 33:1364-1367, 1987
26. Ratcliffe WA, Heath DA, Ryan M, Jones SR: Performance and diagnostic application of a two-site immunoradiometric assay for parathyrin in serum. *Clin Chem* 35:1957-1961, 1989
27. Felsenfeld AJ, Llach F: Parathyroid gland function in chronic renal failure. *Kidney Int* 43:771-789, 1993
28. Quarles LD, Lobaugh B, Murphy G: Intact parathyroid hormone overestimates the presence and severity of parathyroid-mediated osseous abnormalities in uremia. *J Clin Endocrinol Metab* 75:145-150, 1992

29. Sherrard DJ, Hercz G, Pei Y: The spectrum of bone disease in end-stage renal failure. An evolving disorder. *Kidney Int* 43:436-442, 1993
30. Brossard JH, Whittom S, Lepage R, D'Amour P: Carboxyl-terminal fragments of parathyroid hormone are not secreted preferentially in primary hyperparathyroidism as they are in other causes of hypercalcemia. *J Clin Endocrinol Metab* 77:413-419, 1993
31. Segre GV, Tregear G, Potts JT Jr: Development and application of sequence-specific radioimmunoassays for analysis of the metabolism of parathyroid hormone, in *Methods in Enzymology* (Vol, 37), edited by O'Malley BW and Hardman JG, New York, Academic Press, 1975, pp. 38-66
32. John MR, Coolman WG, Gao P, et al: A novel immunoradiometric assay detects full-length human PTH but not amino-terminally truncated fragments: implications for PTH measurements in renal failure. *J Clin Endocrinol Metab* 84:4287-4290, 1999
33. Lepage R, Roy L, Brossard JH, et al: A non-(1-84) circulating parathyroid hormone (PTH) fragment interferes significantly with intact PTH commercial assay measurements in uremic samples. *Clin Chem* 44:805-809, 1998
34. Horiuchi N, Houck MF, Potts JT Jr, et al: A parathyroid hormone inhibitor in vivo: design and biological evaluation of a hormone analog. *Science* 220:1053-1055, 1983
35. Doppelt SH, Neer R, Nussbaum SR, et al: Inhibition of the in vivo parathyroid hormone-mediated calcemic response in rats by a synthetic hormone

- antagonist. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:7557-7560, 1986
36. Rao LG, Murray TM: Binding of intact parathyroid to rat osteosarcoma cells: major contribution of binding sites for the carboxyl-terminal region of the hormone. *Endocrinology* 117:1632-1638, 1985
 37. McKee MD, Murray TM: Binding of intact parathyroid hormone to chicken renal plasma membranes: evidence for a second binding site with carboxyl-terminal specificity. *Endocrinology* 117:1930-1939, 1985
 38. Brossard JH, Cardinal H, Roy L, et al: Influence of glomerular filtration rate on intact parathyroid hormone levels in renal failure patients: role of non-(1-84)PTH detected by intact PTH assays. *Clin Chem* 46:697-703, 2000
 39. Lepage R, Rousseau L, Gao P, et al: Evaluation of the non-(1-84) fraction of PTH in renal failure using two IRMA PTH assays from Scantibodies with different specificities. *J Bone Miner Res* 15:S505, 2000
 40. Nguyen-Yamamoto L, Rousseau L, Brossard JH, et al: Dual origin of non-(1-84) PTH detected by intact PTH assays. Role of peripheral metabolism and of parathyroid gland secretion. 82nd Annual Meeting of the Endocrine Society. Program & Abstracts, p.410(1693), 2000
 41. Nguyen-Yamamoto L, Rousseau L, Brossard JH, et al: Synthetic carboxyl-terminal fragments of PTH decrease ionized calcium concentration in rats by acting on a receptor different from the PTH/PTHrP receptor. *Endocrinology* 142:1386-1392, 2001

42. Slatopolsky E, Finch J, Clay P, et al: A novel mechanism for skeletal resistance in uremia. *Kidney Int* 58:753-761, 2000
43. Faugère MC, Langup MC, Malluche HH: PTH(7-84) antagonizes the effects of PTH(1-84) on bone turnover in rats. *J Bone Miner Res* 16:S546, 2001
44. Inomata N, Akiyama M, Kubota N, Jüppner H: Characterization of a novel PTH-receptor with specificity for the carboxyl-terminal region of PTH(1-84). *Endocrinology* 136:4732-4740, 1995
45. Divieti P, Inomata N, Chapin K, et al: Receptors for the carboxyl-terminal region of PTH(1-84) are highly expressed in osteocytic cells. *Endocrinology* 142:916-925, 2001
46. Divieti P, Inomata N, Jüppner H, Bringhurst FR: In vitro inhibition of bone resorption by human PTH(7-84). *J Bone Miner Res* 16:S307, 2001
47. Cloutier M, D'Amour P, Gascon-Barré M, Hamel L: Low calcium diet in dogs causes a greater increase in parathyroid hormone measures with an intact hormone than with a carboxylterminal assay. *Bone Miner* 9:179-188, 1990
48. Cloutier M, Gascon-Barré M, D'Amour P: Chronic adaptation of dog parathyroid function to a low calcium high sodium, vitamin D deficient diet. *J Bone Miner Res* 7:1021-1028, 1992
49. Cloutier M, Gagnon Y, Brossard JH, et al: Adaption of parathyroid function to IV 1.25-dihydroxyvitamin D₃ or partial parathyroidectomy in normal dogs. *J Endocrinol* 155:133-141, 1997

50. Cloutier M, Brossard JH, Gascon-Barre M, D'Amour P: Lack of involution of hyperplastic parathyroid glands in dogs. Adaptation via a decrease in the calcium stimulation set point and a change in secretion profile. *J Bone Miner Res* 9:621-629, 1994
51. Monier-Faugere MC, Geng Z, Mawad H, et al: Improved assessment of bone turnover by the PTH-(1-84)/large C-PTH fragments ratio in ESRD patients. *Kidney Int* 60:1460-1468, 2001
52. Massry S, Smogorzewski M: Mechanisms through which parathyroid hormone mediates the deleterious effects on organ function in uremia. *Semin Nephrol* 14:219-231, 1994
53. Massry S, Smogorzewski M: The mechanisms responsible for PTH-induced rise in cytosolic calcium in various cells are not uniform. *Min Electrolyte Metab* 21:13-28, 1995

Caption to Figure 1

HPLC profiles of I-PTH for a pool of normal individuals (—) and for renal failure patients with low (····) and high (----) basal I-PTH concentration in hypercalcemia (*top left*), normocalcemia (*center left*), and hypocalcemia (*bottom left*). The elution positions of hPTH(39-68), hPTH(39-84), and hPTH(1-84) are indicated by *arrows from left to right*. On the *right*, a planimetric evaluation of the hPTH(1-84) peak (55 min: —) and the non-(1-84)PTH peak (53 min: ·····) is provided as a function of the Ca^{++} concentration for pooled sera from normal individuals (Δ), for a single normal individual (\circ), for pooled sera from renal failure patients with low basal I-PTH concentration (\bullet), and for a single renal failure patient with a high basal I-PTH value (\blacktriangle) in Brossard JH, et al: *J Clin Endocrinol Metab* 81:3923-3929, 1996.

Caption to Figure 2

Calcemic response to various PTH infusion regimens starting 2 hours after thyroparathyroidectomy (TPTX). Sham-operated control rats (----) and TPTX rats (—) are shown. A, The two solvent alone groups and the two fragment alone groups are illustrated, and comparisons are made with the TPTX solvent group (*black symbols*). B and C, All groups infused with hPTH(1-84) or hPTH(1-34) (1 nmol/h), respectively, are illustrated, and comparisons are made with the hPTH(1-84) or hPTH(1-34) alone group (*black symbols*). Results are means \pm SD. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA, followed by the Student-

Newman-Keuls test: +, $P < 0.05$; ++, $P < 0.001$; +++, $P < 0.001$. 3x, 10x= 3 and 10 nmol/h; (7-84), hPTH(7-84)= mixture= 10% of hPTH(7-84) and 45% each of hPTH(39-84) and hPTH(53-84) in Nguyen-Yamamoto L, et al: *Endocrinology* 142:1386-1392, 2001.

Caption to Figure 3

Chronic adaptation of parathyroid function to various experimental conditions in humans or dogs. In progressive secondary hyperparathyroidism or in situations where more PTH is required from a lesser number of cells (half parathyroidectomy), more I-PTH and less carboxyl-terminal (C)-PTH are secreted, leading to a lower C-PTH/I-PTH ratio. The reverse is true when the cause of secondary hyperparathyroidism is corrected, or when $1.25(\text{OH})_2\text{D}$ is administered to normal dogs without evoking hypercalcemia with a higher C-PTH/I-PTH ratio than observed originally. These changes are now believed to enhance the hPTH(1-84)-positive calcemic effect in the first case and to enhance the C-PTH fragment-negative calcemic effect in the latter.

DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION

Les deux études que nous avons réalisées ont produit des résultats et auront aussi des conséquences. D'une part, nous avons démontré que la *non*-(1-84)PTH, comme les autres fragments carboxyl-terminaux de la PTH, originait à la fois d'une sécrétion parathyroïdienne et du métabolisme périphérique de la hPTH(1-84) probablement par le foie (Nguyen-Yamamoto 2001; D'Amour 1979). Nous avons aussi démontré le rôle du rein dans la clairance de la *non*-(1-84)PTH et l'accumulation de *non*-(1-84)PTH en insuffisance rénale aigüe. Cette situation est similaire à celle observée pour les autres fragments carboxyl-terminaux de la PTH (D'Amour 1985).

L'hypothèse que nous avons soulevée initialement, à savoir que la *non*-(1-84)PTH pourrait interagir de par ses caractéristiques structurales avec le récepteur PTH/PTHrP pour altérer l'activité biologique de la PTH(1-84), s'est avérée fautive. Dans la mesure où la hPTH(7-84) peut-être considérée comme un prototype de *non*-(1-84)PTH, nous n'avons pas pu démontrer d'interaction de ce prototype avec le récepteur PTH/PTHrP mais seulement avec le récepteur carboxyl-terminal de la PTH sur les cellules ostéoblastiques ROS17/2.8. Sur ces mêmes cellules, la hPTH(1-84) pouvait interagir avec les deux récepteurs alors que la PTH(1-34) seulement avec le récepteur PTH/PTHrP. L'action de la hPTH(1-84) et de la hPTH(1-34) sur le récepteur classique de la PTH se traduisait par la production de cAMP. Cependant la production était moindre pour la hPTH(1-84) à toutes les concentrations étudiées en rapport avec une séquestration de l'hormone par le récepteur de la partie carboxyl-terminal de la PTH.

Nous n'avons pu à date identifier un second messager lié à ce dernier récepteur mais il est logique de penser, compte tenu des résultats obtenus antérieurement dans les chondrocytes (Erdmann S 1996), ou concernant les effets de la hPTH(1-84) vs la hPTH(1-34) dans différents systèmes cellulaires (Massry SG 1994, Massry SG 1995), que le Ca^{++} intracellulaire est un candidat de choix. Nous planifions déjà des études avec les cellules ROS17/2.8 pour étudier les effet de la hPTH(1-84), hPTH(1-34), hPTH(7-84) sur le Ca^{++} intracellulaire en présence et en absence d'un inhibiteur du récepteur PTH/PTHrP, le PTHrP(7-34).

Nous avons aussi démontré que l'effet principal de la hPTH(7-84), et à un moindre degré des autres fragments carboxyl-terminaux exercé via le récepteur carboxyl-terminal était une hypocalcémie. Cette hypocalcémie s'exerçait au delà de l'effet d'une parathyroïdectomie, qui elle avait aboli l'influence de la rPTH(1-84) sur le récepteur classique PTH/PTHrP et la résorption osseuse. Le fait que la phosphatémie et possiblement la phosphaturie diminuaient simultanément à l'hypocalcémie suggèrait une inhibition supplémentaire à l'effet de la parathyroïdectomie sur la résorption osseuse et/ou une accrétion osseuse accrue. Comme les ostéocytes renferment beaucoup de récepteurs carboxyl-terminaux (Divieti 2001a), l'ostéolyse ostéocytaire, qui est considérée comme un processus rapide, pourrait être impliquée dans ces résultats. Une inhibition de la résorption osseuse de ^{45}Ca (Divieti 2001b) induite par différents agents et de l'activité osseuse ostéoblastique (Faugere MC 2001) par la hPTH(7-84) ont été démontrés récemment. Il pourrait être intéressant de faire des études de cinétique du ^{45}Ca et du ^{32}P

chez le rat parathyroïdectomisé infusé avec la hPTH(1-84), la hPTH(1-34), la hPTH(7-84) seuls ou en combinaison afin de mieux cerner les effets de ces hormones via les deux récepteurs à la PTH. Couplée à l'autoradiographie osseuse, ces études permettraient de voir s'il y a non seulement d'inhibition de résorption mais aussi une stimulation de l'accrétion osseuse.

Avec nos résultats, la calcémie ne peut plus être considérée comme le résultat de l'influence positive de la hPTH(1-84) sur le récepteur PTH/PTHrP. Il faut maintenant aussi considérer une influence négative via la *non*-(1-84)PTH et les autres fragments carboxyl-terminaux sur le récepteur carboxyl-terminal de la PTH. La calcémie que nous mesurons est le résultat net de ces deux effets. Il va devenir important d'élucider la structure de la *non*-(1-84)PTH en circulation afin de démontrer que ses effets sont similaires à ceux de la hPTH(7-84). À cet effet, nous travaillons actuellement avec des cellules provenant d'adénomes parathyroïdiens obtenus lors de chirurgie pour hyperparathyroïdie primaire afin de marquer la parathormone et la *non*-(1-84)PTH produites en culture primaire avec des acides aminés marqués. Après purification par différentes méthodes chromatographiques suivies de chromatographie d'affinité et de HPLC nous espérons pouvoir séquencer la *non*-(1-84)PTH pour en déterminer la structure exacte. Ces peptides seront par la suite synthétiser pour être étudiés dans les mêmes systèmes biologiques utilisés pour la hPTH(7-84).

L'immunohétérogénéité de la PTH ne peut plus être considérée comme une simple processus d'inactivation de la hPTH(1-84). La formation de quantité plus ou moins grande de fragments carboxyl-terminaux ou de PTH(1-84) est hautement contrôlée par la calcémie et par d'autres facteurs tels la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, les besoins en PTH et ceci dans le but d'obtenir un meilleur contrôle de la calcémie. Dans le cas de besoins réduits en PTH (hypercalcémie non parathyroïdienne quelqu'en soit l'origine) des niveaux abaissés de PTH et un ratio fragments carboxyl-terminaux / hPTH(1-84) élevé tendent à protéger l'organisme de l'hypercalcémie. À l'inverse, lors d'une hyperparathyroïdie secondaire compensée ou non (hypocalcémie) une PTH élevée et un ratio diminué amènerait un effet hypercalcémiant maximum via le récepteur PTH/PTHrP. Quoique suggérées par nos résultats, ces hypothèses seraient démontrables dans un modèle expérimental de rat parathyroïdectomisé où la quantité de PTH(1-84) nécessaire pour maintenir une calcémie normale devrait dépendre de la quantité de fragments carboxyl-terminaux infusés simultanément et de la teneur en calcium de la diète si l'on tient compte de nos résultats antérieurs (Cloutier 1990, 1992). Cette dernière influençait le ratio fragments carboxyl-terminaux /hPTH(1-84) nécessaire pour maintenir une calcémie normale. Une diète à faible teneur en calcium nécessiterait un ratio bas pour maintenir une calcémie normale avec une PTH élevée et à l'inverse une diète à haute teneur en calcium, un ratio élevé avec une PTH(1-84) plutôt basse. Ces études sont à faire.

Le champs d'action clinique le plus susceptible d'être influencé par nos résultats est celui de l'insuffisance rénale. L'accumulation de fragments carboxyl-terminaux et de

non-(1-84)PTH très tôt dans cette condition pourraient amener une réévaluation de la pathogénèse de l'hyperparathyroïdie secondaire en débit d'une insuffisance rénale. On sait que la résistance à la PTH survient tôt dans cette condition (Evanson JM 1966, Llach F 1975), qu'elle est abolie par la parathyroïdectomie (Bover J 1994). Il est alors logique de penser que l'accumulation des fragments carboxyl-terminaux puisse jouer un rôle central dans cette résistance. Des niveaux plus élevés de hPTH(1-84) ou hPTH(1-34) seront nécessaires pour maintenir une calcémie normale. Il serait aussi possible que l'accumulation de fragments puisse influencer la synthèse rénale de 1,25(OH)₂D et contribuer à l'hyperparathyroïdie secondaire via la diminution de la 1,25(OH)₂D.

Finalement, dans la "*Trade-off*" hypothèse de la pathogénèse de l'hyperparathyroïdie secondaire, l'hyperphosphatémie qui cause une hypocalcémie est un phénomène central mais tardif. On peut se demander si l'accumulation précoce des fragments carboxyl-terminaux n'est pas responsable de l'hypocalcémie et des augmentations progressives de PTH, ce qui irait beaucoup mieux avec l'hypophosphatémie de l'insuffisance rénale modérée. À cet effet, il serait intéressant de démontrer que l'infusion de la hPTH(7-84) chez l'animal s'accompagne d'une élévation de la PTH(1-84) endogène de façon compensatoire. Malheureusement ceci est difficile à réaliser dans l'état actuel des dosages de PTH de rat qui réagissent avec la hPTH(7-84) et qui ne sont pas spécifiques pour la rPTH(1-84).

Certains aspects de l'ostéodystrophie de l'insuffisance rénale pourraient aussi être en relation avec les fragments carboxyl-terminaux et l'accumulation de non-(1-84)PTH. La maladie osseuse adynamique semble associée à des niveaux de PTH supprimés ou bas et à des ratios fragments carboxyl-terminaux /hPTH élevé (Coen G 1993, Cohen-Solal ME 1991). Un résumé récent suggère que l'infusion de hPTH(7-84) chez le rat parathyroïdectomisé avec insuffisance rénale amène une diminution de l'activité ostéoblastique induite par la PTH(1-84) (Faugère MC 2001). Des études expérimentales chez l'homme demeurent à faire pour expliquer la relation entre les différentes atteintes osseuses de l'insuffisance rénale et non seulement les niveaux de PTH mais surtout la proportion relative de fragments carboxyl-terminaux et d'hormone intacte.

D'autres champs d'action demeurent plus spéculatifs. Il est cependant logique de penser que les variations observées d'un patient à l'autre entre la calcémie et les niveaux de PTH dans l'hyperparathyroïdie primaire puisse s'expliquer par des quantités variables de fragments carboxyl-terminaux en circulation. Serait-il possible que ce ratio influence aussi le tableau clinique de ces patients ?

Finallement, même si les niveaux de PTH ne semblent pas impliqués dans l'ostéoporose, il serait intéressant d'évaluer le rôle possible du ratio fragments carboxyl-terminaux / hPTH(1-84) dans cette condition, particulièrement dans l'ostéoporose à bas niveau de remodelage. Comme on peut le voir, il reste beaucoup de pain sur la planche.

Nos travaux ont donc ouvert un champ d'intérêt nouveau pour les fragments carboxyl-terminaux de la PTH et leurs effets biologiques aussi bien en physiologie qu'en pathologie.

BIBLIOGRAPHIE

Abou-Samra AB, Goldsmith P, Xie Ly, Jüppner H, Spiegel AM, Serge Gv. Down - regulation of parathyroid PTH/PTHrP receptor immunoreactivity and PTH binding in opossum kidney cells by PTH and dexamethasone. *Endocrinol* 135 :2588-94. 1994

Abou-Samra AB, Jüppner H, Force T, Freeman MW, Kong XF, Schipani E, *et al.* Expression cloning of a common receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide from rat osteoblast-like cells: A single receptor stimulates intracellular accumulation of both cAMP and inositol triphosphates and increases intracellular free calcium. *Proc Natl Acad Sci (USA)*, 89: 2732-2736, 1992.

Arber CE, Zanelli JM, Parsons JA, Bitensky L, Chapman J, Comparison of the bioactivity of highly purified human parathyroid hormone and of synthetic amino and carboxy region fragments. *J Endocrinol* 85: 55-56.1980

Arnaud CD, Goldsmith RS, Bordier PJ, Sizemore GW, Larsen JA, Gilkinson J. Influence of immunoheterogeneity of circulating parathyroid hormone on results of radioimmunoassays in man. *Amer J Med*, 56:785-93, 1974.

Arnaud CD, Sizemore GW, Oldham SB, Fisher JA, Tsao HS, Littledike ET. Human parathyroid hormone: glandular and secreted molecular species. *Amer J Med*, 50:630-38, 1971.

- Arnaud CD, Tsao HS, Oldham SB. Native human parathyroid hormone: an immunochemical investigation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 67:415-22. 1970.
- Barrett PQ, Teitelbaum AP, Neuman WF. The heterogeneity of radioiodinated parathyroid hormone in rat plasma. *Metab Bone Dis Relat Res*, 1:263-67, 1978.
- Bergeron JJM, Tchervenkov S, Rouleau MF, Rosenblatt M, Goltzman D. *In vivo* demonstration of receptors in rat liver to the amino-terminal region of parathyroid hormone. *Endocrinology*, 109:1552-1559, 1981.
- Berson SA, Yalow RS. Immunochemical heterogeneity of parathyroid hormone in plasma. *J Clin Endocrinol*, 28:1037-47, 1968.
- Bover J, Rodriguez M, Trinidad P, Jara A, Martinez ME, Machado L, Llach F, Felsenfeld A. Factors in the development of secondary hyperparathyroidism during graded renal failure in the rat. *Kidney Int* 45:953-961. 1994
- Brewer HB Jr., Ronan R. Bovine parathyroid hormone: amino acid sequence. *Proc Nat Aca Sci (USA)*, 67:1862-1869, 1970.
- Bringhurst F R, Jüppner H, Guo J, Ureno P, Potts J T Jr, Kronenberg HM, Abou-Samra AB, Segre, GV. Cloned, stably expressed parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide

receptors activate multiple messenger systems and biological responses in LLC-PK1 kidney cells. *Endocrinology*, 132: 2090-2098, 1993.

Bringhurst FR, Segre GV, Lampamn GW, Potts JT Jr. Metabolism of parathyroid hormone by Kupffer cells: analysis by reverse-phase high performance liquid chromatography. *Biochemistry*, 21:4242-28, 1982.

Bringhurst FR, Stern AM, Yotts M, Mizrahi N, Segre GV, Potts JT Jr. Peripheral metabolism of PTH: fate of the biologically active amino terminus *in vivo*. *Am J Physiol*, 255:E886-93, 1988.

Bringhurst FR, Stern AM, Yotts M, Mizrahi N, Segre GV, Potts JT Jr. Peripheral metabolism of [³⁵S] parathyroid hormone *in vivo*: influence of alterations in calcium availability and parathyroid status. *J. Endocrinol*, 122:237-45, 1989.

Brookmann JJ, Farrow SM, Nicholson L, O'Riordan JLH, Hendy GN. Regulation by calcium of parathyroid hormone mRNA in cultured parathyroid tissue. *J Bone Mineral Res* 1:529-537. 1986.

Brossard JH, Cloutier M, Roy L, Lepage R, Gascon-Barré M, D'Amour P. Accumulation of non-(1-84) molecular form of parathyroid hormone (PTH) detected by intact PTH assay in renal failure: Importance in the interpretation of PTH values. *J Clin Endocrinol Metab*, 81:3923-3929, 1996.

Brossard JH, Whittom S, Lepage R and D'Amour, P. Carboxyl-terminal fragments of parathyroid hormone are not secreted preferentially in primary hyperparathyroidism as they are in other hypercalcemic conditions. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* **77**: 413-419, 1993.

Brown AJ, Ritter CR, Finch JL, et al. The noncalcemic analogue of vitamin D, 22-oxacalcitrol, suppresses parathyroid hormone synthesis and secretion. *J Clin Invest* **84**: 728-732. 1989.

Brown EM. A four parameter model of the sigmoidal relationship between PTH release and extracellular calcium concentration in normal and abnormal parathyroid tissue. *J. Clin. Endocrinol Metab* **56**: 572-581. 1983.

Calvo MS, Fryer MJ, Laakso KJ, Nissewson RA, Price PA, Murray TM, Heath H III. Structural requirements for parathyroid hormone action in mature bone. Effects on release of cyclic adenosine monophosphate and bone Y-carboxy glutamine acid-containing protein from perfused rat hindquarters. *J Clin Invest*, **76**:2348-2354, 1985.

Canterbury JM, Bricker LA, Levey GS, Kozlovskis PL, Ruiz E, Zull JE, Reiss E. Metabolism of bovine parathyroid hormone. Immunochemical and biological characteristics of fragments generated by liver perfusion. *J Clin Invest*, **55**:1245-1253, 1975.

Canterbury JM, Levey GS, Reiss E. Activation of renal cortical adenylate cyclase by circulating immunoreactive parathyroid hormone fragments. *J Clin Invest*, 52:524-27, 1973.

Canterbury JM, Reiss E. Multiple immunoreactive forms of parathyroid hormone in human serum. *Proc Soc Exp Biol Med*, 140:1393-98, 1972.

Chase LR, Aurbach GD. Parathyroid function and the renal excretion of 3'5' adenylic acid. *Proc Natl Acad Sci USA*, 58: 518-525. 1967.

Chase LR, Fedak SA, Aurbach GD. Activation of skeletal adenyl cyclase by parathyroid hormone in-vitro. *Endocrinology* 84: 761-768. 1969.

Chidambaram Ramachandran, Meanthan Chan and Michèle G. Brunette. Characterization of ATP-dependent Ca^{++} transport in the basolatéral membrane vesicles from proximal and distal tubules of the rabbit kidney. *Biochem. Cell Biol.* 69 : 109-114. 1990.

Chu LLH, MacGregor RR, Anast CS, Hamilton JW, Cohn DV. Studies on the biosynthesis of rat parathyroid hormone and proparathyroid hormone: adaptation of the parathyroid gland to dietary restriction of calcium. *Endocrinology*, 93:915-24, 1973.

Cloutier M, Brossard JH, Gascon-Barré M, D'Amour P Lack of involution of hyperplastic parathyroid glands in dogs. Adaptation via a decrease in the calcium stimulation set point and a change in secretion profile. *J Bone Miner Res* 9:621-629. 1994.

Cloutier, M., Gagnon, Y., Brossard, J. H., Gascon-Barré, M. and D'Amour, P. Adaptation of parathyroid function to IV 1,25-dihydroxyvitamin D₃ or partial parathyroidectomy in normal dogs. *J. Endocrinol.* **155**: 133-141, 1997.

Coen G, Mazzaferro S, ballanti P, Bonucci E, Cinotti GA, Fondi G, Manni M, Qasquali M, Perruzza I, Sardella D, Taggi F. Two sites immunoradiometric intact parathyroid hormone assay versus C-terminal parathyroid hormone in predicting osteodystrophic bone lesion in predialysis chronic renal failure. *J Lab Clin Med* 122:103-109. 1993

Cohen-Solal ME, Sebert JL, Boudailliez, Marie A, Moriniere P, Gueris J, Bouillon R, Fournier A. Comparison of Intact, Midregion, and Carboxy Terminal Assays of Parathyroid Hormone for the Diagnosis of Bone Disease in Hemodialyzed Patients. *J Clin Endocrinol Metab* 73:516-524. 1991

Cole JA, Carnes DL, Sorte LR, Eber S, Poelling RE, Thorne PK. Structure-activity relationships of parathyroid hormone analogs in the opossum kidney cell line. *J Bone Miner Res.* 1989 Oct;4(5):723-30. 1989

Dambacher MA, Fischer JA, Hunziker WH, Born W, Moran J, Roth HR, Delvin EE, Glorieux F. Distribution of circulating immunoreactive components of parathyroid hormone in normal subjects and in patients with primary and secondary hyperparathyroidism: the role of kidney and of the serum calcium concentration. *Clin Sci*, 57:435-43, 1979.

D'Amour P, Dorais C, Lepage R, Rousseau L, Brossard JH. Modulation of camp response to hPTH(1-84) in ros 17/2.8 clonal cells by synthetic hPTH(7-84): Implication of a carboxylterminal receptor. (Submitted to *J Endocrinology*) 2000.

D'Amour P, Huet PM, Segre GV, Rosenblatt M. Characteristics of bovine parathyroid hormone extraction by the dog liver *in vivo*. *Am J Physiol*, 241:E208-E214, 1981a.

D'Amour P, Huet PM. Evidence of two forms of hepatic extraction of parathyroid hormone in dogs *in vivo*. *Am J Physiol*, 246:E249-E255, 1984.

D'Amour P, Huet PM. Serum calcium does not influence the extraction of 125I-bovine parathyroid hormone by the dog liver *in vivo*. *Clin Invest Med.*;8(3):202-7. 1985.

D'Amour P, Labelle F, Lecavalier L, Plourde V, Harvey D. Influence of serum Ca concentration on circulating molecular forms of PTH in three species. *Amer J Physiol* 251(Endo Metab):E680-87, 1986a.

D'Amour P, Lazure C, Labelle F. Metabolism of radioiodinated carboxylterminal fragments of bovine parathyroid hormone in normal and anephric rats. *Endocrinology*, 117:127-34, 1985.

D'Amour P, Palardy J, Bashali G, Malette LE, Delean A, Lepage R. Modulation of circulating parathyroid hormone immunoheterogeneity in man by ionized calcium concentration. *J Clin Endocrinol Metab*, 75:525-32, 1992.

D'Amour P, Rousseau L, Rocheleau B, Pomier-Layrargues G, Huet PM. Influence of Ca^{++} concentration on the clearance and circulating levels of intact and carboxylterminal iPTH in pentobarbital-anesthetized dogs. *J Bone Miner Res*, 11:1075-1085, 1996.

D'Amour P, Segre GV, Roth S, Potts JT Jr. Analysis of parathyroid hormone and its fragments in rat tissues: chemical identification and microscopical localization. *J Clin Invest*, 63:89-98, 1979.

Daugaard H, Egfjord M, Lewin E, Olgaard K. Metabolism of N-terminal and C-terminal parathyroid hormone fragments by isolated perfused rat kidney and liver. *Endocrinology*, 134:1373-1381, 1994.

Daugaard H, Egfjord M, Olgaard K. Influence of calcium on the metabolism of intact parathyroid hormone by isolated perfused rat kidney and liver. *Endocrinology*, 126:1813-1820, 1990.

- Daugaard H, Egfjord M, Olgaard K. Metabolism of intact parathyroid hormone in isolated perfused rat liver and kidney. *Am J Physiol*, 254:E740-748, 1988.
- DeMay M, Mitchell J, Goltzman D. Comparison of renal and osseous binding of parathyroid hormone and hormonal fragments. *Am J Physiol*, 249: E437-E446, 1985.
- Divieti P, Inomata N, Chapin K, Singh R, Juppner H, Bringhurst FR. Receptors for the carboxyl-terminal region of pth(1-84) are highly expressed in osteocytic cells. *Endocrinology* Feb;142(2):916-25. 2001a.
- Divieti P, Inomata N, John MR, Juppner H, Bringhurst FR. In-Vitro Inhibition of Bone Resorption by Human hPTH(7-84). *J Bone Miner Res*, 16; suppl 1: S307, Abst SA483. 2001b
- El-Hajj Fuleihan G, Chen CJ, Scott AR, Marynick SP, Stock J, Pallotta JA, Brown EM. Calcium-dependent release of N-terminal fragments and intact immunoreactive parathyroid hormone by human pathological parathyroid tissue *in vitro*. *J Clin Endocrinol Metab*, 69:860-7, 1989.
- Erdmann S, Burkhardt H, von der Mark K, Müller W. Mapping of a carboxyl-terminal active site of parathyroid hormone by calcium-imaging. *Cell Calcium*, 23:413-421, 1998.
- Erdmann S, Müller W, Bahrami S, Vornehm SI, Mayer H, Bruckner P, von der Mark K,

Burkhardt H. Differential effects of parathyroid hormone fragments on collagen gene. Expression in chondrocytes. *J Cell Biol*, 135:1179-1191, 1996.

Evanson JM. The response to the infusion of parathyroid extract in hypocalcaemic states. *Clin Sci* 31:63-75. 1966

Fang VS, Tashjian Jr AH. Study on the role of the liver in the metabolism of parathyroid hormone. I. Effects of partial hepatectomy and incubation of the hormone with tissue homogenates. *Endocrinology* 90: 1177-1184.1972

Faugere MC, Lagub, Malluche HH. PTH (7-84) Antagonizes the Effects of PTH(1-84) on Bone Turnover in Rats. *J Bone Miner Res*, 16; suppl 1: S546, Abst M848. 2001

Flueck JA, DiBella FP, Edis AJ, Kehrwald JM, Arnaud CD. Immunoheterogeneity of parathyroid hormone in venous effluent serum from hyperfunctioning parathyroid glands. *J Clin Invest*, 69:1367-75, 1977.

Fogh-Andersen N, Ladefoged J, Moller-Petersen J. Renal and hepatic extraction of carboxylterminal immunoreactive parathyrin in normal man. *J Clin Chem Clin Biochem*, 22:479-482, 1984.

Fox J, Scott M, Nissenson RA, Heath H. Effects of plasma calcium concentration on the metabolic clearance rates of parathyroid hormone in the dog. *J Lab Clin Med*, 102:70-7, 1983.

Freitag JJ, Martin KJ, Conrades MB, Slatopolsky E. Metabolism of parathyroid hormone by fetal rat calvaria. *Endocrinology*, 104:510-16, 1979.

Fukayama S, Schipani E, Juppner H, Lanske B, Kronenberg HM, Abou-Samra AB, Bringhurst FR. Role of protein kinase-A in homologous down-regulation of parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor messenger ribonucleic acid in human osteoblast-like SaOS-2 cells. *Endocrinology* Apr;134(4):1851-8. 1994

Funk JL, Krul EJ, Moser AH, Shigenaga JK, Strewler GJ, Grunfeld C, Feingold KR. Endotoxin increases parathyroid hormone-related protein mRNA levels in mouse spleen. Mediation by tumor necrosis factor. *J Clin Invest* Nov;92(5):2546-52. 1993

Gautvik KM, Gautvik VT, Halvorsen JF. Characterization of the molecular forms of immunoreactive parathyroid hormone in primary hyperparathyroidism and in hyperparathyroidism due to renal failure. *Scand J Clin Lab Invest*, 43:553-64, 1983.

Gautvik KM, Gordeladze JO, Moxheim E, Gautvik VT. Peripheral metabolism of parathyroid hormone in patients with primary hyperparathyroidism as judged by

immunological and biological studies. *Eur Surg Res*, 16(supp. 2):41-54, 1984.

Goldsmith RS, Furszyfer J, Johnson WJ, Fournier AE, Sizemore GW, Arnaud CD. Etiology of hyperparathyroidism and bone disease during chronic hemodialysis. III. Evaluation of parathyroid suppressibility. *J Clin Invest*, 52:173-80, 1973.

Goltzman D, Paytreman A Callaban EN, Serge GV, Potts JT Jr. Metabolism and biological activity of parathyroid hormone in renal cortical membranes. *J Clin Invest*. Jan;57(1):8-19. 1976

Goltzman D, Henderson B, Loveridge N. Cytochemical bioassay of parathyroid hormone. Characteristics of the assay and analysis of circulating hormonal forms. *J Clin Invest*, 65:1309-17, 1980.

Goltzman D. Examination of the requirement for metabolism of parathyroid hormone in skeletal tissue before biological action. *Endocrinology*, 102:1555-62, 1978.

Habener JF, Kemper B, Potts JT Jr. Calcium-dependent intracellular degradation of parathyroid hormone: a possible mechanism for regulation of hormone stores. *Endocrinology*, 97:431-41, 1975.

Habener JF, Mayer GP, Dee PC, Potts JT Jr. Metabolism of amino and carboxyl-sequence immunoreactive parathyroid hormone in the bovine; evidence for peripheral cleavage of hormone. *Metabolism*, 25:385-95, 1976.

Habener JF, Powell D, Murray TM, Mayer GP, Potts JT Jr. Parathyroid hormone: secretion and metabolism *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 68:2986-91, 1971.

Hanley DA, Axer LM. Calcium-dependent release of carboxylterminal fragments of parathyroid hormone by hyperplastic human parathyroid tissue in vitro. *J Clin Endocrinol Metab*, 63:1075-1079, 1986.

Hanley DA, Takatsuki K, Sultan JM, Schneider AB, Sherwood LM. Direct release of parathyroid hormone fragments from functioning bovine parathyroid glands *in vitro*. *J Clin Invest*, 62:1247-54, 1978.

Heinrich G, Fronenberg HM, Pott JT Jr, Habener JF. Gene encoding parathyroid hormone: Nucleotide sequence of the rat gene and deduced amino acid sequence of rat preproparathyroid hormone. *J Biol Chem*. Mar 10;259(5):3320-9. 1984

Hernandez A, Salido E, Rodriguez M, Torres A. High phosphate diet increases preproPTH mRNA independent of calcium and calcitriol in normal rat. *Kidney Int* 50 :1872-8. 1996.

Hruska KA, Martin K, Mennes P, Greenwalt A, Anderson C, Klahr S, Slatopolsky E. Degradation of parathyroid hormone and fragment production by the isolated perfused dog kidney. *J Clin Invest*, 60:501-10, 1977.

Hruska KA, Moskowitz D, Esbrit P, Civitelli R, Westboot S and Huskey M. Stimulation of inositol triphosphate and diacylglycerol production in renal tubular cells by parathyroid hormone. *J. Clin. Invest.* 79 : 230-239. 1987

Ikeda K, Okazaki R, Inoue D, Ohno H, Ogata E, Matsumoto T. Interleukin-2 increases production and secretion of parathyroid hormone-related peptide by human T cell leukemia virus type I-infected T cells: possible role in hypercalcemia associated with adult T cell leukemia. *Endocrinology*. Jun;132(6):2551-6. 1993.

Inomata N, Akiyama M, Kubota N, Jüppner H. Characterization of a novel PTH-receptor with specificity for the carboxyl-terminal region of PTH(1-84). *Endocrinology*, 136: 4732-4740, 1995.

Ishimi Y, Russell J, Sherwood LM. Regulation by calcium and 1,25-(OH)₂D₃ of cell proliferation and function of bovine parathyroid cells in culture. *J Bone Miner Res*. Jul;5(7):755-60. 1990.

Jüppner H, Abou-Samra AB, Unenos S, Gu WX, Potts JT Jr, Serge GV. The parathyroid hormone-like peptide associated with humoral hypercalcemia of malignancy and parathyroid hormone bind to the same receptor on the plasma membrane of ROS 17/2.8 cells. *J Biol Chem.* Jun 25;263(18):8557-60. 1988.

Kaji H, Sugimoto T, Kanatani M, Miyauchi A, Kimura T, Sakakibara S, Fukase M, Chihara, K. Carboxyl-terminal parathyroid hormone fragments stimulate osteoclast-like cell formation and osteoclastic activity. *Endocrinology*, 134: 1897-1904, 1994.

Karaplis AC, Luz A, Glowacki J, Bronson RT, Tybulewicz VLJ, Kronenberg HM. Lethal skeletal dysplasia from targeted disruption of the parathyroid hormone-related peptide gene. *Genes Dev.* Feb 1;8(3):277-89. 1994.

Karmali R, Farrow S, Hewison M, Barker S, O'Riordan JLH. Effects of 1,25-dihydroxyvitamin D and cortisol on bovine and human parathyroid cells. *J Endocrinol* 123: 137-142. 1989.

Kaufman M, Muff R, Fischer JA. Effect of dexamethasone on parathyroid hormone (PTH) and PTH-related protein regulated phosphate uptake in opossum kidney cells. *Endocrinology.* Apr;128(4):1819-24. 1991

Kilav R, Silver J, Naveh-Many T. Parathyroïde hormone gene expression in hypophosphatemic rats . J Clin Invest 96 :327-333. 1995

Kremer R, Boliva I, Goltzman D, Hendy GN. Influence of calcium and 1,25-dihydroxycholecalciferol on proliferation and proto-oncogene expression in primary cultures of bovine parathyroid cells. Endocrinology. Aug;125(2):935-41. 1989.

Lafage MH, Combe C, Fournier A, Aparicio M, Ketodiet, Physiological calcium intake and native vitamine D improve renal osteodystrophy. Kidney Int 42 :1217-25. 1992

Landske B, Karaplis AC, Lee K, Luz A, Vortkamp A, Pirro A, Kaperien M, Defize LHK, Ho C, Mulligan RC, Abou-Samra AB, Juppner H, Serge GV, Kronenberg HM. PTHPTHrP receptor in early development and Indian hedghog-regulated bone growth. Science, 273 :663-666. 1996.

Lepage R, Roy L, Brossard JH, Rousseau L, Dorais C, Lazure C, D'Amour P. A non(1-84) circulating parathyroid hormone (PTH) fragment interferes significantly with intact PTH commercial assay measurements in uremic samples. Clin Chem, 44:805-809, 1998.

Lim SK, Gardella TJ, Baba H, Nussbaum SR, Kronenberg HM. The carboxy-terminus of parathyroid hormone is essential for hormone processing and secretion. Endocrinology 131 2325-2330. 1992.

Llach F, Massry S, Singer F, Kurokawa K, Kaye J, Coburn J. Skeletal resistance to endogenous parathyroid hormone in patients with early renal failure. A possible cause for secondary hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 41:339-345. 1975

Lopez-Hilker, S., Dusso, A. S., Rapp, N. S., Martin, K. J. and Slatopolsky, E. Phosphorus restriction reverses hyperparathyroidism in uremia independent of changes in calcium and calcitriol. *Am.J.Physiol.* 28: F432-F437, 1990.

MacGregor RR, Jilka RL, Hamilton JW. Formation and secretion of fragments of parathormone. Identification of cleavage sites. *J Biol Chem* 261:1929-1934, 1986.

Mallette LE, Thornby J, Pretorius HT. Internal homology in preproparathyroid hormone. Four copies of a primitive gene. *J Bone Min Res*, 1:58, 1986.

Mallette LE. Parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein as polyhormones. *The Parathyroids. Basic and Clinical Concepts.* Bilezikian JP, Marcus R, Levine MA Edts. Raven Press, Chap 12:171-84, 1994.

Martin KJ, Freitag JF, Conrades MB *et al.* Selective uptake of the synthetic aminoterminal fragment of bovine parathyroid hormone by isolated perfused bone. *J Clin Invest*, 62:256-261, 1978.

Martin KJ, Hruska KA, Greenwalt A, Klahr S, Slatopolsky E. Selective uptake of intact parathyroid hormone by the liver. *J Clin Invest*, 58:781-88, 1976.

Martin KJ, Hruska KA, Lewis J, Anderson C, Slatopolsky E. The renal handling of parathyroid hormone. Role of peritubular uptake and glomerular filtration. *J Clin Invest*, 60:808-815, 1977.

Martin TJ, Greenberg PB, Melick RA. Nature of human parathyroid hormone secreted by monolayer cell cultures. *J Clin Endocrinol*, 34:437-40, 1972.

Massry SG, Smogorzewski M. The mechanisms responsible for PTH-induced rise in cytosolic calcium in various cells are not uniform. *Min Electrolyte Metab*, 21: 13-28, 1995a.

Massry SG, Smogorzewski M. Mechanisms through which parathyroid hormone mediates the deleterious effects on organ function in uremia. *Semin Nephrol*, 14: 219-231, 1994.

Mayer GP, Keaton JA, Hurst JG, Habener JF. Effect of plasma calcium concentration on the relative proportion of hormone and carboxyl fragments in parathyroid venous blood. *Endocrinology*, 104:1778-84, 1979.

Mayer H. The mid-region (28-48) of parathyroid hormone exerts its effects via a mechanism that is distinct from the classical cAMP dependent pathway: structure/function relationship of PTH-fragments on bone-forming cells. Proceeding of the First International Forum on Calcified tissue and Bone Metabolisms. Yokohama, 1992, Tokyo: Chugai Pharmaceuticals, 44-47, 1992.

McCauley LK, Beecher CA, Meton ME, Werkmeister Jr, Juppner H, Abou-Samra AB, Serge GV, Rosol TJ. Transforming growth factor-beta1 regulates steady-state PTH/PTHrP receptor mRNA levels and PTHrP binding in ROS 17/2.8 osteosarcoma cells. *Mol Cell Endocrinol.* May;101(1-2):331-6. 1994

McKee MD, Murray TM. Binding of intact parathyroid hormone to chicken renal plasma membranes: evidence for a second binding site with carboxyl-terminal specificity. *Endocrinology* 117: 1930-1939, 1985.

Morel F, Imbert-Teboul M, Charbades D. Distribution of hormone-dependent adenylate cyclase in the nephron and its physiological significance. *Annu Rev Physiol* 43:569-581. 1981.

Morrissey JJ, Hamilton JW, McGregor RR, Cohn DV. The secretion of parathormone fragments 34-84 and 37-84 by dispersed porcine parathyroid cells. *Endocrinology*, 107:164-71, 1980.

Muff R, Fischer JA, Biber J, Murer H. Parathyroid hormone receptors in control of proximal tubule function. *Annu Rev Physiol.*;54:67-79. Review. 1992.

Murray TM, Rao LG, Muzaffar SA, Ly H. Human parathyroid hormone carboxylterminal peptide (53-84) stimulates alkaline phosphatase activity in dexamethasone-treated rat osteosarcoma cell *in vitro*. *Endocrinology*, 124: 1097-1099, 1988.

Murray TM, Rao LG, Muzaffar SA. Dexamethasone-treated ROS 17/2.8 rat osteosarcoma cells are responsive to human carboxylterminal parathyroid hormone peptide hPTH(53-84): stimulation of alkaline phosphatase. *Calcif Tissue Int*, 49: 120-123, 1991.

Murray TM, Rao LG, Rizzoli RE. Interaction of parathyroid hormone, parathyroid hormone-related peptide, and their fragments with conventional and non-conventional receptor sites . *The parathyroids. Basic and clinical concepts*. Raven Press, New York, 185-211.

Murray TM, Sutherland M, Ly H, Wylie J, Haussler M, Rao LG. Gene regulation in osteoblastic cells by the carboxytermininal (53-84) fragment of parathyroid hormone: Effects of hPTH(53-84) in human osteoblastic SaOS-2 cells. In: *Calcium regulating hormones and bone metablism: basic and clinical aspects*. Vol II. DV Cohn, C Gennari, AH Tashjian Jr eds. Amsterdam: Excerta Medica, 1992: 105-109.

Nakamoto C, Baba H, Fukase M, Nakajima K, Kimura T, Sakakibara S, Fujita T, Chihara K. Individual and combined effects of intact PTH, amino-terminal, and a series of truncated carboxylterminal PTH fragments on alkaline phosphatase activity in dexamethasone-treated rat osteoblastic osteosarcoma cells, ROS 17/2.8. *Acta Endocrinol*, 128: 367-372, 1993.

Naveh-Many T, Silver J. Regulation of parathyroid hormone gene expression by hypocalcemia, hypercalcemia, and vitamin D in the rat. *J Clin Invest* 86:1313-1319. 1990.

Naveh-Many T, Friedlander MM, Mayer H, Silver J. Calcium regulates parathyroid hormone messenger ribonucleic acid (mRNA), but not calcitonin mRNA in-vivo in the rat. Dominant role of 1,25-dihydroxyvitamin D. *Endocrinology* 125: 275-280. 1989.

Naveh-Many T. Post-transcriptional regulation of the parathyroid hormone gene by calcium and phosphate. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 8(4):414-419. 1999.

Neuman WF, Neuman MW, Lane K, Miller L, Sammon PJ. The metabolism of labeled parathyroid hormone. V. Collected biological studies. *Calcif Tissue Res. Sep* 17;18(4):271-87. 1975.

Neuman WF, Neuman MW, Lane K. Formation and serum disappearance of fragments of parathyroid hormone in the infused dog. *Calcif. Tiss Int.*, 28:79-81, 1979.

Neuman WF, Neuman MW, Lane K. The metabolism of labelled parathyroid hormone. VI. Effects of vitamin D status. *Calcif Tiss Res.*, 18:289-95, 1975c.

Neuman WF, Neuman MW, Lane K. The metabolism of labelled parathyroid hormone. VII. Attempts to modify hormone deposition. *Calcif Tiss Res.*, 19:169-78, 1975.

Neuman WF, Neuman MW, Sammon PJ, Lane K. The metabolism of labeled parathyroid hormone. III. Studies in rats. *Calcif Tiss Res.*, 18:251-61, 1975a.

Nguyen-Yamamoto L, Rousseau L, Brossard JH, Lepage R, D'Amour P. Origin of Parathyroid Hormone (PTH) Fragments Detected by Intact PTH Assays. (Submitted 2001).

Nguyen-Yamamoto L, Rousseau L, Brossard JH, Lepage R, D'Amour P. Synthetic carboxylterminal fragments of PTH decrease ionized calcium concentration in rats by acting on a receptor different from the PTH/PTHrP receptor. *Endocrinology* 142 : 1386-1392. 2001

Niall HD, Keutmann HT, Saver R, Hogan ML, Dawson BF, Aurbach GD, Potts JT Jr. The amino acid sequence of bovine parathyroid hormone I. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie*, 351:1586-88, 1970.

Nygren P, Larsson R, Johansson H, Ljunghall S, Sastad J, Akerstrom G. 1,25(OH)₂D₃ inhibits hormone secretion and proliferation but not functional dedifferentiation of cultured bovine parathyroid cells. *Calcif Tissue Int.* Oct;43(4):213-8. 1988.

Oldham SB, Fonck EJ, Singer FR. Parathyroid hormone clearance in man. *Metabolism*, 27:993-1001, 1978.

Parsons JA, Robinson CJ. A rapid indirect hypercalcemic action of parathyroid hormone administered in isolated blood-perfused bone. IN: Parathyroid Hormone and Thyrocalcitonin (Calcitonin). Talmage RV, Bélanger LF eds, Excerpta Medica, 329-31, 1968.

Pillai S, Zull JE. Production of biologically active fragments of parathyroid hormone by isolated Kupffer's cells. *J Biol Chem*, 261:24919-24923, 1986.

Pines M, Adams AE, Stueckle S, Bessale R, Rashti-Behar V, Chorev M, Rosenblatt M, Suva L J. Generation and characterization of human kidney cell lines stably expressing recombinant human PTH/PTHrP receptor: lack of interaction with a c-terminal human PTH peptide. *Endocrinology*, 135: 1713-1716, 1994.

Puschett JB, Winaver J, Chen T, Fragula J, Syck DB, Robertson JS. Study of the renal tubular sites and mechanisms of action of parathyroid hormone. *Mineral Electrolyte Metab* 6 :190-209. 1981.

Ramachandran C, Chan M, Brunette MG. Characterization of ATP-dependent Ca^{2+} transport in the basolateral membrane vesicles from proximal and distal tubules of the rabbit kidney. *Biochem Cell Biol.* Feb-Mar;69(2-3):109-14. 1991

Rao LG, Murray T M. Binding of intact parathyroid to rat osteosarcoma cells: major contribution of binding sites for the carboxyl-terminal region of the hormone. *Endocrinology*, 117: 1632-1638, 1985.

Rizzoli RE, Murray, TM, Marx SJ, D. AG. Binding of radioiodinated bovine parathyroid hormone-(1-84) to canine renal cortical membranes. *Endocrinology.* Apr;112(4):1303-12. 1983

Rouleau MF, Warshawsky H, Goltzman D. Parathyroid hormone binding in vivo to renal, hepatic, and skeletal tissues of the rat using a radioautographic approach. *Endocrinology*, 118:919-931, 1986.

Russell J, Lettieri D, Sherwood LM. Direct regulation of calcium of cytoplasmic messenger ribonucleic acid coding for pre-parathyroid hormone in isolated bovine parathyroid cells. *J Clin Invest* 72: 1851-1855. 1983.

Russell J, Lettieri D, Sherwood LM. Direct suppression by $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ of transcription of the parathyroid hormone gene. *Clin Res* 34:726A. 1986.

Russell J, Olivera A, Liu S, Sherwood LM. Isolation and complete nucleotide sequence of the avian parathyroid hormone gene. *Endocrine Society Program and Abstracts*, 73rd Annual Meeting 1991.

Russell J, Sherwood LM. The effects of 1,25 dihydroxyvitamin D3 and high calcium on transcription of preproparathyroid hormone gene are direct. *Trans Assoc Am Physicians* 100:256-262. 1987.

Schettler T, Aufm'kolk B, Atkinson MJ, Radeke H, Enters C, Hesch RD. Analysis of immunoreactive and biologically active human parathyroid hormone-peptides by high performance liquid chromatography. *Acta Endocrinol*, 107:60-69, 1984.

Schlüter KD, Hellstern H, Wingender E, Mayer H. The central part of parathyroid hormone stimulates thymidine incorporation of chondrocytes. *J Biol Chem*, 264:11087-11092, 1989.

Segre GV, D'Amour P, Hultman A, Potts JT Jr. Effects of hepatectomy, nephrectomy and nephrectomy/uremia on the metabolism of parathyroid hormone in the rat. *J Clin Invest*, 67:439-48, 1981.

Segre GV, D'Amour P, Potts JT Jr. Metabolism of radioiodinated bovine parathyroid hormone in the rat. *Endocrinology*, 99:1645-52, 1976.

Segre GV, Habener JF, Powell D, Tregear GW, Potts JT Jr. Parathyroid hormone in human plasma. Immunochemical characterization and biological implications. *J Clin Invest*, 51:3163-72, 1972.

Segre GV, Niall HD, Habener JF, Potts JT Jr. Metabolism of parathyroid hormone. Physiologic and clinical significance. *Am J Med*, 56:774-84, 1974

Segre GV, Niall HD, Sauer RT, Potts JT Jr. Edman degradation of radioiodinated parathyroid hormone: Application to sequence analysis and hormone metabolism *in vivo*. *Biochemistry*, 16:2417-27, 1977.

Segre GV, Perkins AS, Witters LA, Potts JT Jr. Metabolism of parathyroid hormone by isolated rat Kupffer's cells and hepatocytes. *J Clin Invest*, 67:449-457, 1981b.

Segre GV, Rosenblatt M, Tully GL 3rd, Laugharn J, Reit B, Potts JT Jr. Evaluation of an *in vitro* parathyroid hormone antagonist *in vivo* in dogs. *Endocrinology*. 116(3):1024-9. 1985.

Seitz PK, Zhang RW, Simmons DJ, Cooper CW. Effects of C-terminal parathyroid hormone-related peptide on osteoblasts. *Miner Electrolyte Metab*, 21:180-183, 1995.

Sela-Brown A, Silver J, Brewer G, Naveh-Many. Identification of AUFT1 as a parathyroid hormone mRNA 3'-untranslated region-binding protein that determines parathyroid hormone mRNA stability. *J Biol Chem* 275(10):7424-7429. 2000.

Serge GV, Rosenblatt M, Tully GL III, Gaugharn J, Reit B, Potts JT Jr, Evaluation of an in-vitro parathyroid hormone antagonist in-vivo in dogs. *Endocrinology* 116: 1024-1029. 1985.

Sherwood LM, Lundberg WB, Targovnik JH, Rodman JS, Seyfer A. Synthesis and secretion of parathyroid hormone *in vitro*. *Amer J Med*, 50:658-69, 1971.

Sherwood LM, Rodman JS, Lundberg WB. Evidence for a precursor to circulating parathyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci USA*, 67:1631-38, 1970.

Shurtz-Swirski R, Lewinson D, Shenzer P, Mayer H, Silbermann M. Effects of parathyroid hormone fragments on the growth of murine mandibular condylar cartilage *in vitro*. *Acta Endocrinologica (Copenh)*, 122:217-26, 1990.

Silbermann M, Shurtz-Swirski R, Lewinson D, Shenzer P, Mayer H. In-vitro response of neonatal condylar cartilage to simultaneous exposure to the parathyroid hormone fragments 1-34, 28-48 and 53-84 hPTH. *Calcif Tissue Int* 48: 260-266. 1991.

Silver J, Naveh-Many T, Friedlander MM, Mayer H, Schmelzer HJ, Popovtzer MM. Regulation by vitamin D metabolites of parathyroid hormone gene transcription in-vivo in the rat. *J Clin Invest* 78: 1296-1301.1986.

Silver J, Naveh-Many T, Mayer H, Schmelzer HJ, Popovtzer MM.. Regulation by vitamin D metabolites of parathyroid hormone gene transcription in-vivo in the rat. *J. Clin Invest.* 78: 1296-1301.1986.

Silver J, Russell J, Sherwood LM. Regulation by vitamin D mtabolistes of messenger ribonucleic acid for preproparathyroid hormone in isolated bovine parathyroid cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 4270-4273. 1985.

Silver J, Yalcindag C, Sela-Brown A, Kilav R, Naveh-Many T. Regulation of the parathyroid hormone gene by vitamin D, calcium and phosphate. *Kidney Int Suppl* 73:S2-S7. 1999.

Silverman R, Shurtz-Swirski R, Lewinson D, Frenzer P, Mayer H. In vitro response of neonatal condylar cartilage to simultaneous exposure to the parathyroid hormone fragments 1-34, 28-48, and 53-84 hPTH. *Calcif Tissue Int*, 48:260-6, 1991.

Silverman R, Yalow RS. Heterogeneity of parathyroid hormone. Clinical and physiological implications. *J Clin Invest*, 52:1958-71, 1973.

Singer FR, Segre GV, Habener JF, Potts JT Jr. Peripheral metabolism of bovine parathyroid hormone in the dog. *Metabolism*, 24:139-143, 1975.

Slovik DM, Rosenthal DI, Doppelt SH. Restoration of spinal bone in osteoporotic men by treatment with human parathyroid hormone (1-34) and 1,25 dihydroxy vitamin D. *J Bone Min Res* 1:377-381.1986.

Sneddon WB, Barry EL, Coutermarsh BA, Gesek FA, Liu F, Friedman PA. Regulation of renal parathyroid hormone receptor expression by 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ and retinoic acid. *Cell Physiol Biochem*;8(5):261-77. 1998.

Soifer NE, Van Why SK, Ganz MB, Kashgarian M, Siegel NJ, Stewart AF. Expression of parathyroid hormone-related protein in the rat glomerulus and tubule during recovery from renal ischemia. *J Clin Invest* Dec;92(6):2850-57. 1993.

Somjen D, Binderman I, Schluter KD, Wingender E, Maxer H, Kaye A. Stimulation by defined parathyroid hormone fragments of cell proliferation in skeletal-derived cell cultures. *Biochem J*, 272:781-5, 1990.

Somjen D, Schluter KD, Wingender E, Mayer H, Kaye AM. Stimulation of cell proliferation in skeletal tissues of the rat by defined parathyroid hormone fragments. *Biochem J*, 277:863-8, 1991.

Sutherland MK, Rao LG, Wylie JN, Gupta A, Ly H, Sodek J, Murray TM. Carboxyl-terminal parathyroid hormone peptide (53-84) elevates alkaline phosphatase and osteocalcin mRNA levels in SaOS-2 cells. *J Bone Min Res*, 9: 453-458, 1994.

Takasu H, Baba H, Inomata N, Uchiyama Y, Kubota N, Kumaki K, *et al.* The 69-84 amino acid region of the parathyroid hormone molecule is essential for the interaction of the hormone with the binding sites with carboxyl-terminal specificity. *Endocrinology*, 137: 5537-5543, 1996.

Tam CS, Heersche JNM, Murray TM, Parson JA. Parathyroid hormone stimulates the bone apposition rate independently of its resorptive action: differential effects of intermittent and continuous administration. *Endocrinology* 110: 506-512. 1982.

Teitelbaum AP, Schneider N, Neuman WF. On the relation between peripheral cleavage of parathyroid hormone and its biological activity in kidney. *Metab Bone Dis Rel Res*, 2:25-31, 1979.

Tian J, Smogorzewski M, Kedes L, Massry SG. Parathyroid hormone-parathyroid hormone related protein receptor messenger RNA is present in many tissues besides the kidney. *Am J Nephrol*, 13: 210-213, 1993.

Tsuboi T, Togari A. Comparison of the effects of carboxylterminal parathyroid hormone peptide (53-84) and aminoterminal peptide (1-34) on mouse tooth germ *in vitro*. *Arc Oral Biol*, 43:335-339, 1998.

Tuner G, Coureau C, Rabin MR, Escoubet B, Hruby M, Walrant O, Silve C. Parathyroid hormone receptor PTH/PTHrP receptor mRNA expression and PTH response in a rat model of secondary hyperparathyroidism associated with vitamin D deficiency. *Endocrinol* 136 :3751-58. 1995.

Urena P, Iida-Klein A, Kong XF, Juppner H, Kronenberg HM, Abou-Samra AB, Segre GV. Regulation of parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor messenger ribonucleic acid by glucocorticoids and PTH in ROS 17/2.8 and OK cells. *Endocrinology* Jan;134(1):451-6. 1994

Urena P, Kong X F, Abou-Samra AB, Juppner H, Kronenberg H M, Potts J T Jr, Segre, G. V. Parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide (PTHrP) receptor mRNA is widely distributed in rat tissues. *Endocrinology*, 133: 617-623, 1993.

Vasicek T, McDevitt BE, Freeman MW *et al* . Nucleotide sequence of the human parathyroid hormone gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 80 :2127. 1983

Weaver CA, Gordon DF, Kissil MS et al . Isolation and complete nucleotide sequence of the gene for bovine parathyroid hormone. *Gene* 28 :319-329. 1984.

Yalcindag C, Silver J, Naveh-Many T. Mechanism of increased parathyroid hormone mRNA in experimental uremia: role of protein RNA binding and RNA degradation. *J Am Soc Nephrol* 10(12):2562-2568. 1999.

Yamamoto M, Igarishi T, Muramatsu M, Fukagawa M, Motokura T, Ogata E. Hypocalcemia increases and hypercalcemia decreases the steady state level of parathyroid hormone messenger ribonucleic acid in the rat. *J Clin Invest* 83: 1053-1058. 1989.

Zull JE, Repke DW. The tissue localization of tritiated parathyroid hormone thyroparathyroidectomized rats. *J Biol Chem*, 247:2195-2199, 1972.

Mes sincères remerciements à :

Mme Louise Rousseau pour son précieux soutien et conseils.

Mme Manon Livernois pour la rédaction de mes articles et de ma thèse.

M Robert Boileau pour ses expertises en statistique.

M Bernard Rocheleau pour ses conseils en chirurgie.

Tout le personnel du centre de recherche de l'Hôpital Saint-Luc pour les facilités techniques et administratives qui m'ont permis de terminer mon projet.

Tous les étudiants pour les connaissances partagées et leur amitié.