

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

Effets biologiques des fragments carboxyl-terminaux de la parathormone chez le rat
parathyroïdectomisé

par

Mariana Usatii

Sciences Biomédicales

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures

pour l'obtention du grade de

Maître ès Sciences (M.Sc)

en sciences biomédicales

Décembre 2007

© Mariana Usatii, 2007



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Effets biologiques des fragments carboxyl-terminaux de la parathormone chez le rat
parathyroïdectomisé

rédigé par

Mariana Usatii

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Alain Bonnardeaux : président – rapporteur

Dr. Pierre D'Amour : directeur de recherche

Dr. Daniel Lajeunesse : membre de jury

RÉSUMÉ

Les fragments carboxyl-terminaux (C) de la parathormone (PTH) exercent des effets biologiques opposés à ceux de la PTH(1-84) ou (1-34) sur la calcémie, la phosphaturie et la résorption osseuse. Pour étudier leur effet sur la synthèse rénale de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, nous avons infusé des rats parathyroïdectomisés (PTX) avec des préparations de PTH(1-84) et (1-34) humaines (h) ou de rat (r) à des doses prédéterminées pour corriger l'hypocalcémie. La hPTH(1-84) et (1-34) n'ont eu aucun effet sur les concentrations de phosphate ou de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. La rPTH(1-84) et (1-34) ont diminué l'hyperphosphatémie du rat PTX au niveau observé chez le rat contrôle ($p < 0.001$). La rPTH(1-34) a causé une forte élévation de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (234 ± 96 pmol/L), alors que la rPTH(1-84) a maintenu son niveau à celui du rat contrôle (122 ± 33 pmol/L; $p < 0.001$). Pour étudier si cette différence était liée à la présence de fragments C issus du métabolisme de la rPTH(1-84), nous avons infusé une mixture de fragments C de rat seule ou avec de rPTH(1-34). Seule, la mixture a inhibé (67 ± 20 pmol/L) l'effet stimulant de l'hypocalcémie présente chez le rat PTX sur la synthèse de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (133 ± 42 pmol/L; $p < 0.001$). Avec la rPTH(1-34), elle a diminué l'effet stimulant (98 ± 26 pmol/L) au niveau de la rPTH(1-84) (122 ± 33 pmol/L; NS). L'effet inhibiteur était indépendant de la quantité de CYP27B1 (1 α -hydroxylase) ARNm observé. Cet effet s'ajoute aux effets inhibiteurs de la PTH (1-84) déjà connus, mais le mécanisme de cette inhibition demeure à préciser.

Mots-clés : Parathormone, $1,25(\text{OH})_2$ vitamine D, insuffisance rénale, CYP27B1

ABSTRACT

Parathyroid hormone (PTH) carboxyl-terminal (C) fragments exert biological effects opposite to those of PTH(1-84) or (1-34) on serum calcium, urinary phosphate and bone resorption. To study the possible effect of these fragments on the renal synthesis of $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, we have infused parathyroidectomized (PTX) rat with human (h) or rat (r) PTH(1-84) and (1-34) preparations at doses pre-established to correct the hypocalcemia. hPTH(1-84) and (1-34) had no effect on the concentrations of phosphate or $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. rPTH(1-84) and rPTH(1-34) were able to decrease phosphate level to the one observed in control rat ($p < 0.001$) rPTH(1-34) caused an important elevation of $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (234 ± 96 pmol/L) compared to rPTH(1-84) (122 ± 33 pmol/L; $p < 0.001$), which maintained the level at the one observed in control rat. To study if this difference was related to the presence of C-PTH fragments generated during the hepatic metabolism of rPTH(1-84), we have infused PTX rats with a mixture of rC-PTH fragments alone or with rPTH(1-34). Alone, the mixture inhibited (67 ± 20 pmol/L) the stimulating effect of hypocalcemia present in PTX rat on $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ synthesis (133 ± 42 pmol/L; $p < 0.001$). With rPTH(1-34), the mixture also inhibited $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ synthesis (98 ± 26 pmol/L) to the level observed with rPTH(1-84) (122 ± 33 pmol/L; NS). The inhibitory effect of C-PTH fragments was independent of CYP27B1 (1α -hydroxylase) mRNA level. This inhibitory effect adds itself to the list of inhibitory effects of C-PTH fragments on PTH(1-84) biological effects but its mechanism remains to be elucidated.

Key words : Parathyroid hormone, $1,25(\text{OH})_2$ vitamin D, renal failure, CYP27B1

TABLES DES MATIERES

RÉSUMÉ.....	iii
ABSTRACT	iv
TABLES DES MATIERES	v
LISTE DES TABLEAUX.....	vii
LISTE DES FIGURES	viii
LISTE DES ABBRÉVIATIONS.....	x
REMERCIEMENTS	xii
CHAPITRE I INTRODUCTION.....	1
I.1 Homéostasie phosphocalcique: anciens et nouveaux concepts	2
CHAPITRE II REVUE DE LA LITTERATURE.....	5
II.1 Rôle de la 1,25(OH) ₂ D dans l'homéostasie phosphocalcique.....	6
II.1.1 Synthèse de la 1,25(OH) ₂ D	6
II.1.2 Régulation de la synthèse de la 1,25(OH) ₂ D.....	9
II.1.3 Le récepteur de la 1,25(OH) ₂ D et ses effets sur la métabolisme phosphocalcique	12
II.2 Rôle de la de la PTH dans l'homéostasie phosphocalcique	12
II.2.1 Les formes circulantes de la PTH : nature et origine	13

II.2.2	La régulation des formes moléculaires circulantes de la PTH.....	17
II.2.3	Les récepteurs et les effets biologiques des formes moléculaires circulantes de la PTH.....	19
II.2.4	La biologie de la PTH : une nouvelle version basée sur les formes moléculaires circulantes de la PTH.....	23
CHAPITRE III METHODOLOGIE.....		30
III.1	Animaux.....	31
III.2	Protocole expérimental.....	31
III.3	Méthodes expérimentales.....	32
CHAPITRE IV RESULTATS.....		37
PTH C-TERMINAL FRAGMENTS INHIBIT ACTIVE HORMONE AND HYPOCALCEMIA-INDUCED 1,25(OH) ₂ D SYNTHESIS		38
CHAPITRE V DISCUSSION GENERALE DES RESULTANTS.....		65
CHAPITRE VI CONCLUSIONS		72
CHAPITRE VII BIBLIOGRAPHIE		74

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I

Description des séquences d'amorces35

Table 1 (manuscript)

Bio-equivalence: r and hPTH in PTX rats.....55

Table 2 (manuscript)

Influence of rC-PTH fragment mixture on the biological responses to rPTH(1-34)..56

LISTE DES FIGURES

Figure 1	
Homéostasie phosphocalcique.....	4
Figure 2	
Métabolisme de la vitamine D.....	8
Figure 3	
Les relations existantes entre les niveaux circulants de calcium, de phosphate, de PTH et de 1,25(OH) ₂ D.....	11
Figure 4 :	
Détection des formes moléculaires circulantes de PTH par les dosages de PTH.....	26
Figure 5 :	
Profils HPLC de la PTH circulante	27
Figure 6 :	
Une nouvelle conception de la bioactivité de la PTH.....	28
Figure 7	
La biologie de la PTH : une nouvelle version	29

Figure 1 (manuscript)

Calcemic response to various human and rat PTH preparations in PTX rats.....63

Figure 2 (manuscript)

CYP27B1 and 1,25(OH)₂D responses to various rat PTH preparations.....64

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

a.a.	Acide aminé
ADNc	Acide désoxyribonucléique
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
Ca ⁺⁺	Calcium ionisé
C-PTH	Parathormone carboxyl-terminale
CYP	Cytochrome P
ELISA	Dosage immuno-enzymatique
hPTH	Parathormone humaine
i.v.	Intraveineux
I-bPTH	Parathormone bovine intacte
I-PTH	Parathormone intacte
NHERF1	Na ⁺ /H ⁺ exchanger regulatory factor 1
nmol	Nanomole
N-PTH	Parathormone amino-terminale
PCR	Réaction en chaîne par polymérase
PTH	Parathormone
PTX	Parathyroïdectomisé
rPTH	Parathormone de rat
VDR	Récepteur de la 1,25(OH) ₂ D
1,25(OH) ₂ D	1,25 dihydroxyvitamine D

Je dédie ce mémoire à mes grands-parents.

REMERCIEMENTS

Ma sincère reconnaissance au Dr Pierre D'Amour pour la confiance qu'il a eu en moi en qualité d'étudiante et pour la chance et l'aide qu'il m'a offerte généreusement.

Je tiens à remercier particulièrement Louise Rousseau pour sa précieuse présence, pour son soutien technique, ses conseils et son amitié à travers tous les aspects de ce projet.

Merci à Manon Livernois pour la rédaction de tout ce qu'a été écrit, imprimé ou publié concernant ce travail.

Je tiens aussi à souligner la contribution et l'aide de Christian Demers pour les travaux de biologie moléculaire, de Bernard Rocheleau pour les aspects chirurgicaux, de Loan Nguyen Yamamoto pour le partage de son expérience, de Caroline Albert pour la biochimie, de Robert Boileau pour les statistiques, de Jean-Luc Petit pour l'aide technique, de Dr Marielle Gascon Barré pour ses précieux commentaires.

Je remercie tout le personnel de l'animalerie de St-Luc pour la qualité de leurs services.

Cela a été un réel plaisir de travailler dans une des meilleures ambiances de laboratoire universitaire.

CHAPITRE I INTRODUCTION

I.1 Homéostasie phosphocalcique: anciens et nouveaux concepts

Les niveaux sériques de calcium et de phosphate sont maintenus en dedans de limites relativement étroites chez l'homme et l'animal. Deux hormones, la parathormone et la 1,25-dihydroxyvitamine D ($1,25(\text{OH})_2\text{D}$) et trois tissus, le rein, l'os et l'intestin, sont principalement impliqués dans cette régulation. La $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ stimule l'absorption intestinale du calcium et du phosphate et contribue à la résorption osseuse des deux même éléments induite par la PTH [DeLuca HF,1985; Jones G, 1998]. Elle exerce aussi un effet négatif sur la synthèse de PTH par les cellules parathyroïdiennes [Russell J, 1986]. Classiquement la PTH(1-84), la forme circulante biologiquement active de cette hormone, exerce ses effets biologiques classiques via le récepteur PTH/PTHrP de type 1 présent dans les tissus cibles [Juppner H, 1991; Abou-Samra AB, 1992]. C'est ainsi que la PTH(1-84) stimule la synthèse rénale de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, diminue l'excrétion urinaire du calcium au niveau du tubule distal du rein et diminue la réabsorption tubulaire proximale du phosphate. La PTH(1-84) agit au niveau de l'os pour promouvoir la résorption osseuse de calcium et de phosphate. Ces notions classiques sur les effets biologiques de la PTH ont été remises en question récemment parce que les fragments carboxyl-terminaux de la PTH, la forme principale de la PTH en circulation, s'opposent aux effets classiques de la PTH en agissant via un récepteur différent du récepteur PTH/PTHrP de type 1 [Murray TM, 2005]. Ainsi, on a démontré que les fragments carboxyl-terminaux infusés chez le rat parathyroïdectomisé pouvait diminuer la calcémie au-delà de l'effet de la parathyroïdectomie, antagoniser les effets calcémiant et phosphaturiant de la PTH(1-84) ou de la PTH(1-34) et inhiber in vitro la résorption

osseuse induite non seulement par la PTH(1-84) ou la PTH(1-34), mais aussi par la prostaglandine E2, l'interleukin 11, et la 1,25(OH)₂D [Slatopolsky E, 2000; Nguyen-Yamamoto L, 2001; Divieti P, 2002]. Cependant, il n'y a aucune information sur les effets possibles de la PTH(1-84) ou (1-34) sur la synthèse de 1,25(OH)₂D au niveau du rein. Mon travail de maîtrise a donc consisté à mettre au point un modèle qui nous permettrait d'étudier ce dernier point. Avant la description de mon travail et de mes résultats, nous allons revoir la littérature pertinente à ce sujet de maîtrise.

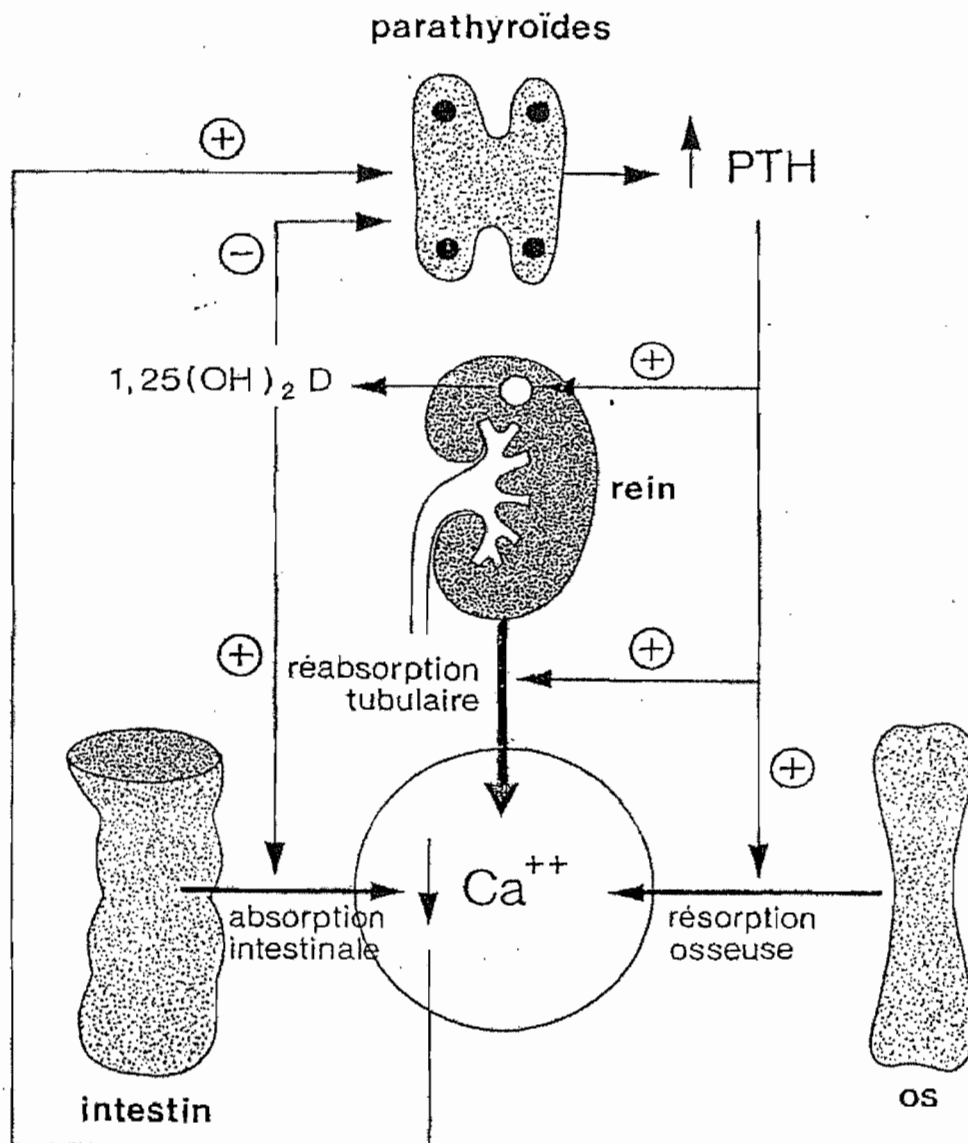


Figure 1. Homéostasie phosphocalcique

Légende : Dans sa formulation classique, l'homéostasie phosphocalcique est assurée principalement par deux hormones, la parathormone (PTH) et la 1,25-dihydroxyvitamine D ($1,25(\text{OH})_2\text{D}$), et trois tissus: l'intestin, le rein et l'os. La PTH, dont le principal stimulus est l'hypocalcémie, stimule la synthèse rénale de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, la réabsorption tubulaire distale de calcium et la diminution de la réabsorption tubulaire proximale de phosphate. Elle stimule aussi la résorption osseuse de calcium et de phosphate. La $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ quant à elle stimule l'absorption intestinale de calcium et de phosphate, et participe à la résorption osseuse induite par la PTH. L'hypercalcémie et des niveaux élevés de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ diminuent la sécrétion de PTH.

CHAPITRE II REVUE DE LA LITTERATURE

II.1 Rôle de la 1,25(OH)₂D dans l'homéostasie phosphocalcique

Le principal rôle de la 1,25(OH)₂D est de promouvoir l'entrée de calcium et de phosphate dans l'organisme via le tube digestif [Nicolaysen R 1937, DeLuca HF. 1985]. Elle induit aussi la mobilisation du calcium de l'os [Carlsson HF, 1967]. Si la 1,25(OH)₂D est essentielle à l'entrée du calcium dans l'organisme, elle l'est beaucoup moins pour le phosphate dont l'absorption demeure relativement élevée même en absence de 1,25(OH)₂ D [Nicolaysen R 1937]. Cependant avant de devenir la forme active de la vitamine D, la 1,25(OH)₂ D doit subir différentes transformations [Lawson D, 1971].

II.1.1 Synthèse de la 1,25(OH)₂D

La synthèse de la forme active de la vitamine D, la 1,25(OH)₂ D, comporte plusieurs étapes (Figure 2). Elle débute au niveau de la peau où le 7-dehydrocholesterol est transformé en vitamine D₃ sous l'effet des rayons ultraviolets du soleil et de la chaleur [Esvelt RP, 1978, Holick MF 1980]. Cette vitamine D₃ est mise en circulation et se joint à la vitamine D₂ et D₃ provenant de la diète. Ces vitamines peuvent être emmagasinées par le tissu adipeux [SJ. Rosenstreich, 1971]. La vitamine D subit une première hydroxylation en position 25 au niveau du foie donnant la 25(OH)D [Blunt JW, 1968, G. Ponchon, 1969], le principal métabolite circulant de la vitamine D [Olson EB Jr, 1976]. Une deuxième hydroxylation en position 1α donne naissance au niveau du tubule proximal du rein à la 1,25(OH)₂D, le métabolite actif de la vitamine D [Brunette

MG, 1978]. Il s'agit d'une étape très bien régulée puisqu'elle donne naissance au métabolite actif [Ribovich ML, 1978; Murayama A, 1999].

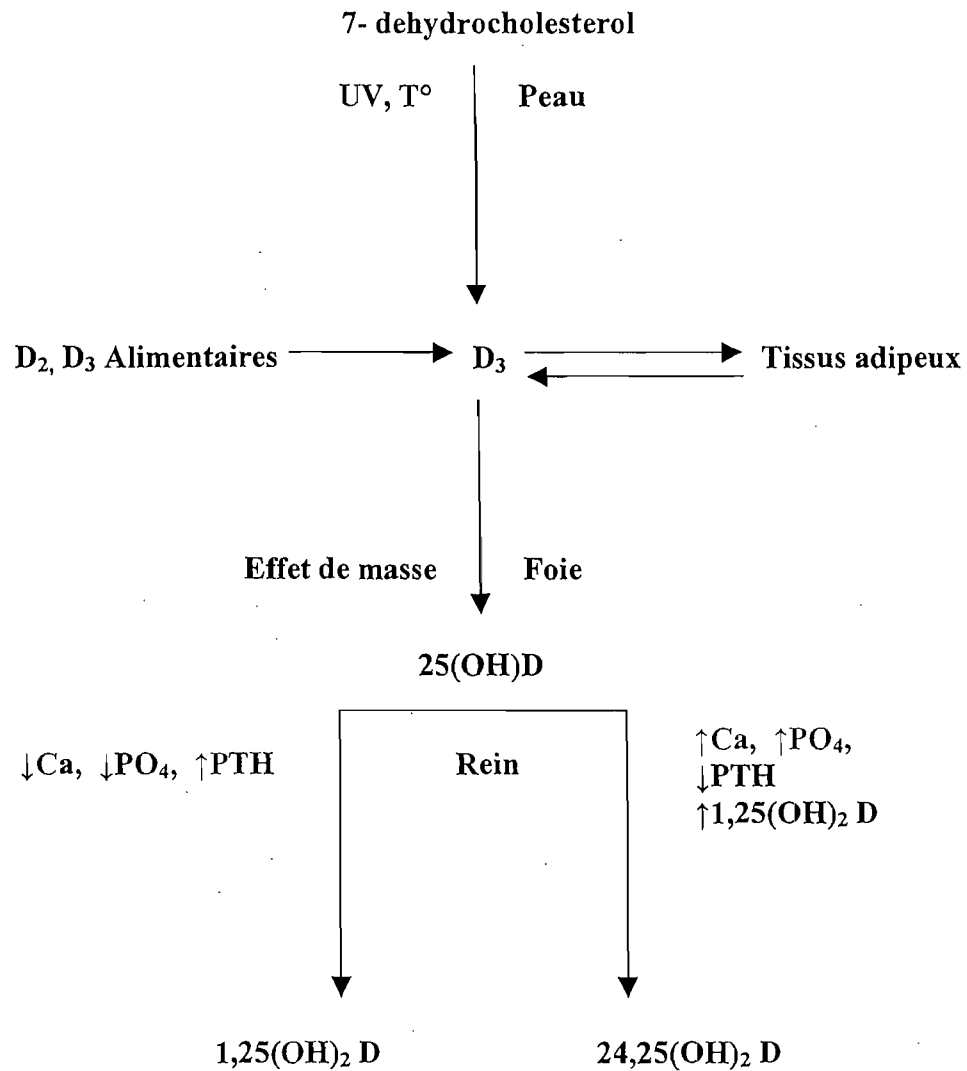


Figure 2 Métabolisme de la Vitamine D

Légende : La vitamine D₃ synthétisée au niveau de la peau s'ajoute à la D₂ et D₃ d'origine alimentaire pour constituer le pool de vitamine D qui doit subir une hydroxylation hépatique en position 25 et une hydroxylation rénale en position 1α pour devenir le métabolite actif de la vitamine D, la 1,25(OH)₂D.

II.1.2 Régulation de la synthèse de la 1,25(OH)₂D

La PTH, le phosphate, le calcium et la 1,25(OH)₂D elle-même exercent une régulation sur la synthèse de 1,25(OH)₂D par le rein [Ribovich ML, 1978; Murayama A, 1999]. La PTH stimule la synthèse de 1,25(OH)₂D en augmentant la quantité de ARNm codant pour la CYP27B1 (1 α hydroxylase) via des mécanismes PKA (cyclique AMP) [Fukase M, 1982; Henry HL, 1985] et PKC (Ca⁺⁺) [Ro HK, 1992] dépendants. L'hypophosphatémie stimule et l'hyperphosphatémie inhibe la synthèse de 1,25(OH)₂D en agissant sur la transcription du gène CYP27B1 [Hughes MR, 1975; Portale AA, 1986; Zhang MY, 2002]. Il est possible que l'effet de la phosphatémie soit indirect et exercé via de nouvelles molécules impliquées dans le métabolisme du phosphate, appelées phosphatonines [Schiavi SC, 2004]. Le FGF-23 est une phosphatonine impliquée dans l'inhibition de la synthèse de la 1,25(OH)₂D au cours de certaines maladies et sa sécrétion est stimulée par l'hyperphosphatémie [Schiavi SC, 2004]. L'hypocalcémie est aussi un puissant stimulant de la synthèse de la 1,25(OH)₂D indépendamment des niveaux de PTH [Trechsel U, 1980; Hulter HN, 1985; Bushinsky DA, 1985; Weisinger JR, 1989; Bland R, 1999]. Finalement, la 1,25(OH)₂D elle-même, lorsque élevée en circulation, exerce un effet inhibiteur sur sa propre synthèse [Murayama, A, 1999] et stimule la formation d'un métabolite moins actif, la 24,25(OH)₂D [Zierold C, 2003]. La 1,25(OH)₂D, à des niveaux élevés, diminue la transcription du gène CYP27B1 et augmente celle du CYP24 [Murayama, A, 1999].

Tous ces mécanismes de régulation de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ visent à maintenir des niveaux de calcium et de phosphate normaux en circulation en collaboration avec la PTH. (Figure 3)

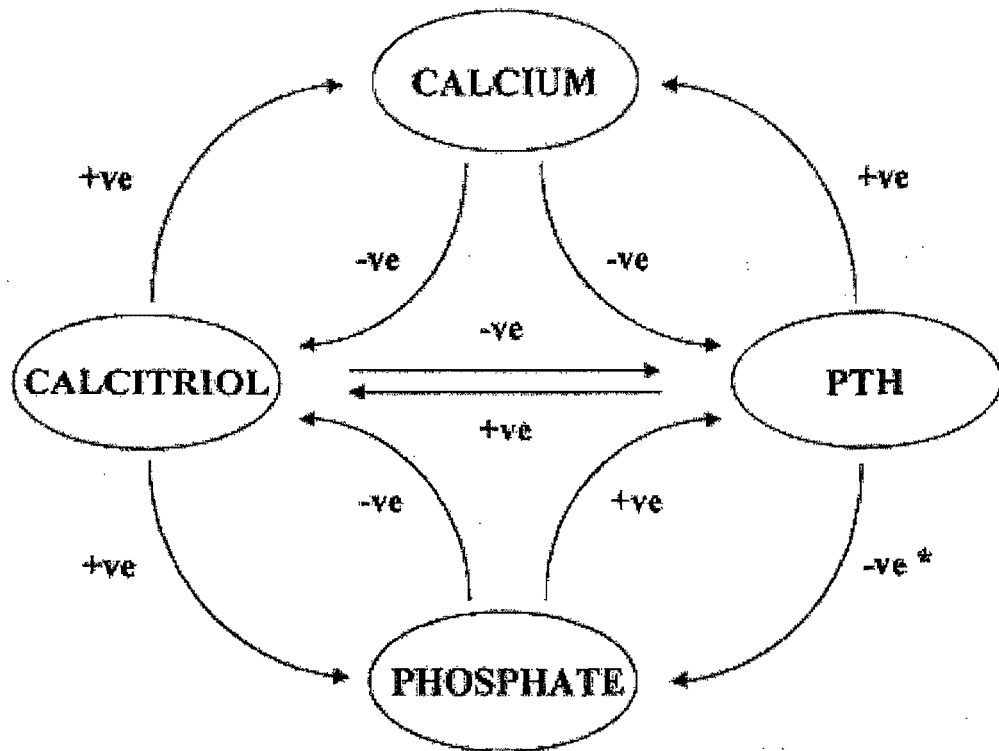


Figure 3 Les relations existants entre les niveaux circulants de calcium, de phosphate, de PTH et de $1,25(\text{OH})_2 \text{D}$ au niveau de leur régulation respective sont indiquées par des signes + (stimulation) ou - (inhibition). (Tiré de : Neil J. Schroeder and John Cunningham, What's new in vitamin D for the nephrologist?, *Nephrol Dial Transplant* 15: 460-466,2000.

II.1.3 Le récepteur de la 1,25(OH)₂D et ses effets sur le métabolisme phosphocalcique

Le récepteur nucléaire de la 1,25(OH)₂ D existe dans une multitude de tissus en plus de ceux qui sont directement impliqués dans le métabolisme phosphocalcique [Clemens TL, 1988; Berger U, 1988]. Au niveau de la cellule intestinale, l'action de la 1,25(OH)₂ D sur son récepteur facilite tous les aspects du transport à travers la cellule intestinale vers la circulation. Au niveau de l'os, la vitamine D est nécessaire au processus de minéralisation. Au niveau du rein, le récepteur à 1,25(OH)₂ D est nécessaire pour expliquer la rétroaction de la 1,25(OH)₂ D sur le CYP27B1 et le CYP24. Au niveau des parathyroïdes, l'activation du récepteur de la 1,25(OH)₂ D conduit à une diminution de la synthèse de PTH via un effet transcriptionnel et à une augmentation de la formation de fragments carboxyl terminaux à partir de la PTH nouvellement synthétisée [Hanley DA , 1986 ; Cloutier M, 1997].

II.2 Rôle de la de la PTH dans l'homéostasie phosphocalcique

Dans la plupart des espèces, la PTH est synthétisée sous forme d'un polypeptide de 84 acides aminés, qui est sécrété par la cellule parathyroïdienne [Kronenberg HM, 2001]. Sa région amino-terminale (N), les premiers 34 a.a. [Tregear GN, 1973], suffit à expliquer les effets biologiques classiques de hormone sur l'os et le rein, liés à l'activation du récepteur PTH/PTHrP de type I [Jüppner H, 1991 ;

Abou-Samra AB, 1992]. La séquence carboxyl (C) terminale, les derniers 50 a.a., n'est pas nécessaire à l'interaction avec ce récepteur [Rosenblatt M, 1978, Pines M, 1994]. Ceci a longtemps promu l'idée que la séquence C-terminale de la PTH était inactive. Paradoxalement, la PTH circulante reflète peu cette réalité biologique et est constituée majoritairement de fragments C-terminaux de l'hormone [Gao P, 2005]. Ces fragments sont contrôlés différemment de la PTH (1-84) [D'Amour P, 2002] et leurs effets biologiques ont été difficiles à dévoiler parce qu'un récepteur différent du récepteur PTH de type I semble être impliqué [Murray TM, 2005].

II.2.1 Les formes circulantes de la PTH : nature et origine

Les formes moléculaires circulantes de PTH ont été identifiées par 3 générations de dosages de PTH, et ont en fait dicté l'évolution du dosage de PTH [Gao P, 2005]. La figure 4 résume l'interaction des formes moléculaires circulantes connues de PTH avec les différents dosages de PTH, illustrant comment ces derniers sont devenus de plus en plus spécifiques pour la PTH(1-84) [Segre GV, 1977] avec chaque génération. Sur la figure 5, ces mêmes dosages sont utilisés pour identifier les formes moléculaires circulantes de la PTH après séparation par chromatographie liquide à haute pression (HPLC) chez un individu normal et un patient avec insuffisance rénale.

a) Les fragments C- terminaux de la PTH : Ils sont les premiers à éluer d'une colonne de HPLC constituée de C¹⁸ μ Bondapak (Figure 5) de par leurs propriétés hydrophylques. Ils ont initialement été identifiés par la première génération de dosages radioimmunologiques de PTH après chromatographie sur gel de sérums [Gao P, 2005]. Ils ne sont pas reconnus par les deuxième et les troisième générations de dosage de PTH [Brossard JH, 1996 ; Gao P, 2001] parce qu'ils n'ont pas de structure N-terminale. Des fragments C-terminaux de la PTH débutant aux positions 34, 37, 41 et 43 de la structure de la PTH ont été générés durant le métabolisme périphérique de la ¹²⁵I-bPTH (1-84) chez le chien et/ou le rat [Segre GV, 1976 ; Segre GV, 1977]. Des fragments C-terminaux de PTH, débutant aux positions 24, 28, 34, 37 et 43 de la structure de la PTH, sont sécrétés par les cellules parathyroïdiennes de porc, humaine et/ou bovine [Morrissey JJ, 1980 ; MacGregor RR ,1985 ; MacGregor RR, 1986]. Les fragments 34-84, 37-84, 38-84 et 45-84 ont été récemment identifiés par spectrométrie de masse dans le sérum de patients avec insuffisance rénale ayant un niveau élevé de PTH ou dans le sérum de patients avec ostéoporose après une injection de 100 μ g de hPTH (1-84) recombinante [Zhang CX, 2006]. Les fragments C-terminaux de la PTH sont éliminés par le rein et s'accumulent en insuffisance rénale, contrairement à la PTH (1-84) qui subit surtout une élimination hépatique [D'Amour P, 1979 ; Brossard JH, 2000]. Les deux tiers de cette dernière sont accomplis par les cellules de Kupffer, qui sont responsables de la formation périphérique des fragments C-terminaux à partir de la PTH (1-84) [Segre GV, 1981 ; Bringhurst FR, 1982 ; D'Amour P, 1984]. Les fragments C-

terminaux de la PTH représentent 80% de la PTH circulante chez un individu normal et 95% chez un patient avec insuffisance rénale [Brossard JH, 1996] (figure 2).

b) Non-(1-84) PTH : À peu près 10% des fragments C-terminaux de la PTH ont une structure N-terminale partiellement conservée et réagissent avec les dosages de parathormone intacte (I-PTH) [Brossard JH, 1996]. Ils éluent après les fragments C-terminaux lors d'une séparation par HPLC (Figure 5) et sont connus sous les noms de non-(1-84) PTH [Brossard JH, 1996 ; Brossard JH, 2000] ou de fragments C-terminaux avec portion N-terminale partiellement tronquée [Gao P, 2005]. Leur séquence N-terminale commence aux positions 4, 7, 8, 10 et 15 de la structure de PTH, les positions 7 et 15 étant prédominantes [D'Amour P, 2005a ; D'Amour P, 2005b]. Ils sont sécrétés par les cellules parathyroïdiennes humaines [D'Amour P, 2005b] et générés par le métabolisme périphérique de PTH humaine chez le rat [Nguyen-Yamamoto L, 2002]. Ils représentent 20% de la I-PTH chez un individu normal mais jusqu'à 50% dans une insuffisance rénale avancée, à cause d'une élimination rénale diminuée [Brossard JH, 1996 ; Nguyen-Yamamoto L, 2002]. La structure de ces fragments n'a pas encore été identifiée par spectrométrie de masse parce qu'ils sont 10 à 50 fois moins abondants en circulation que les plus petits fragments carboxyl-terminaux.

c) N-PTH : C'est une nouvelle forme moléculaire de PTH décrite par notre laboratoire [D'Amour P, 2003]. Elle migre devant la hPTH (1-84) lors d'une

séparation par HPLC (Figure 2). Elle est reconnue par la troisième génération de dosage de PTH [D'Amour P, 2003] mais réagit faiblement dans les dosages de deuxième génération ayant un épitope qui couvre la région 15-20 [D'Amour P, 2003], possiblement en relation avec une modification post-translationnelle dans cette région [D'Amour P, 2003]. La N-PTH peut être produite en excès dans l'hyperparathyroïdie primaire sévère [D'Amour P, 2003 ; Räkel A, 2005], dans le cancer parathyroïdien [Rubin MR, 2005] et dans l'hyperparathyroïdie secondaire sévère [Arakawa T, 2006]. Elle est normalement sécrétée par les cellules parathyroïdiennes humaines [D'Amour P, 2005b].

d) PTH (1-84) et petits fragments amino-terminaux (N) bioactifs: La PTH (1-84) est la forme circulante bioactive majeure de la PTH. Elle se lie au récepteur PTH/PTHrP de type I. Elle représente ~16% de la PTH immunoréactive chez un individu normal et moins de 5% en insuffisance rénale avancée [Brossard JH, 1996 ; Brossard JH, 2000]. La PTH (1-37) a aussi été décrite dans l'ultrafiltrat de patients dialysés [Hock D, 1997]. Des petits fragments de N-PTH ont aussi été identifiés dans le surnageant de cellules parathyroïdiennes humaines [El-Hajj Fuleihan G, 1989] en culture par des dosages radioimmunologiques N-terminaux. Ces fragments ne sont pas captés par les anticorps 39-84 utilisés sur la phase solide des dosages de PTH de deuxième et de troisième génération. La sécrétion d'une petite quantité de fragments N-PTH bioactifs demeure un sujet controversé. L'hypothèse que ces

formes soient générées par le métabolisme périphérique de la PTH (1-84) a été rejetée par l'expérimentation [Bringhurst FR, 1988].

II.2.2 La régulation des formes moléculaires circulantes de la PTH

La composition de la PTH circulante est influencée d'une manière aiguë par la calcémie [D'Amour P, 1986 ; D'Amour P, 1992 ; D'Amour P, 2006 ; Mayer GP, 1979 ; Hanley DA, 1986]. Cette influence s'exerce sur les cellules parathyroïdiennes [Mayer GP, 1979 ; Hanley DA, 1986] après la transcription du gène de la PreProPTH et la traduction de la PreProPTH ARNm en PTH (1-84) [Chu LLH, 1973 ; Habener JF, 1975]. Si la calcémie est élevée, la PTH (1-84) nouvellement synthétisée est rapidement dégradée à l'intérieur de la cellule parathyroïdienne. La PTH (1-84) reste intacte si la calcémie est basse [Chu LLH, 1973 ; Habener JF, 1975]. L'ultracentrifugation et la microscopie électronique ont mis en évidence l'existence de 2 types de granules de sécrétion dans les cellules parathyroïdiennes [Bajpai S, 1990 ; Setoguti T, 1998]. Ces granules sont inversement contrôlés par la calcémie. Ceux de type I, qui contiennent la PTH (1-84) intacte, sont dominants en hypocalcémie. Ceux de type II, qui contiennent la PTH (1-84) dégradée, prédominent en hypercalcémie [Setoguti T, 1998]. Les granules de type II contiennent toujours de la PTH C-terminale avec la cathepsine B et H, tandis que les granules de type I de la PTH sans nécessairement les cathepsines [Hashizume Y, 1993]. La présence de cathepsines est probablement le résultat de la fusion de petites vésicules avec les granules de sécrétion [Hashizume Y, 1993]. Cela pourrait indiquer qu'en fonction de la

calcémie les granules de type I se transformeraient en granules de type II par l'addition d'enzymes. Les fragments C-terminaux sont générés et sécrétés durant ce processus ou par un processus similaire dans la cellule parathyroïdienne [Mayer GP, 1979 ; Hanley DA, 1986]. La production de fragments C-terminaux par le métabolisme périphérique semble être indépendante de la calcémie [Bringham FR, 1989]. L'hypocalcémie augmente la sécrétion de la PTH (1-84) plus que celle de la non-(1-84) PTH ou celle de fragments C-terminaux de la PTH. Ceci amène des niveaux élevés de PTH avec un ratio plus bas de C-PTH/I-PTH ou non-(1-84) PTH/PTH (1-84) alors que l'hypercalcémie fait l'inverse [Brossard JH, 1996 ; D'Amour P, 1992 ; D'Amour P, 2006]. Ces changements sont plus marqués lors de conditions expérimentales ou cliniques chroniques (Figure 6). L'hypercalcémie d'origine non-parathyroïdienne chronique chez l'humain est associée à des niveaux élevés de fragments C-terminaux et à un ratio C-PTH/I-PTH plus élevé que l'hypercalcémie aiguë [Brossard JH, 1993]. L'administration de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ chez le chien, sans évoquer l'hypercalcémie, abaisse la fonction parathyroïdienne mesurée par un dosage I-PTH mais pas celle mesurée avec un dosage C-PTH, résultant en une augmentation du ratio C-PTH/I-PTH à tous les niveaux de calcémie [Cloutier M, 1997]. La correction de l'hyperparathyroïdie secondaire, induite au moyen d'une diète déficiente en calcium et en vitamine D chez le chien, supprime la fonction parathyroïdienne mesurée avec un dosage de I-PTH, mais pas celle mesurée par un dosage C-PTH. La résultante est un ratio C-PTH/I-PTH plus élevé qu'au départ, à tous les niveaux de calcémies [Cloutier M, 1994]. Au contraire, au début d'une

déficience en calcium et vitamine D chez le chien, la production de la I-PTH augmente plus que celle de la C-PTH, abaissant le ratio C-PTH/I-PTH à tous les niveaux de calcémie [Cloutier M, 1992]. La résection de la moitié des glandes parathyroïdes chez le chien a un effet similaire [Cloutier M, 1997]. Chez les patients avec une insuffisance rénale avancée et une fonction parathyroïdienne basse, les ratios C-PTH/I-PTH et non-(1-84) PTH/PTH (1-84) sont plus élevés [Brossard JH, 1996]. Ces données démontrent que les fragments C-terminaux sont contrôlés aussi efficacement mais différemment de la PTH (1-84). De plus, étant donné que le seuil de stimulation mesuré pour la modulation des ratios de C-PTH/I-PTH ou non-(1-84) PTH/PTH (1-84) est toujours plus élevé que le seuil de stimulation mesuré pour la sécrétion de la PTH [Brossard JH, 1996 ; D'Amour P, 1992 ; D'Amour P, 2006 ; Brossard JH, 1993 ; Cloutier M, 1997 ; Cloutier M, 1994 ; Cloutier M, 1992], on peut déduire que les fragments C-terminaux ont probablement un rôle plus important à jouer lorsque la calcémie augmente (Figure 6).

II.2.3 Les récepteurs et les effets biologiques des formes moléculaires circulantes de la PTH

Le récepteur de la PTH de type I : L'existence d'un récepteur spécifique pour la séquence N-terminale de la PTH (1-84) est connue depuis longtemps [Tregear GN, 1973 ; Segre GV, 1994]. Ce récepteur a été cloné [Jüppner H, 1991]. Il appartient à la famille des récepteurs couplés à la protéine G et caractérisés par l'existence de sept passages transmembranaires. Les effets de la PTH sur ce

récepteur s'exercent par l'activation de deux voies différentes, soit celle de l'AMPC via la protéine kinase A et/ou celle de la phospholipase C et du calcium intracellulaire via la protéine kinase C [Abou-Samra AB, 1992]. L'activation de ce récepteur par la PTH (1-84) explique l'augmentation de la réabsorption tubulaire distale du calcium, l'augmentation de la phosphaturie proximale et de la synthèse de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ au niveau rénal [Kronenberg HM, 2001 ; Segre GV, 1994]. Elle explique aussi l'augmentation de la mobilisation et de la résorption du calcium au niveau du tissu osseux [Kronenberg, HM 2001 ; Segre GV, 1994]. Ces effets, associés à une absorption intestinale accrue du calcium induite par la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, vont compenser pour toute tendance à la baisse de la calcémie, le stimulus principal de la sécrétion de PTH. Des données plus récentes, liées à l'utilisation de la PTH (1-34) ou (1-84) dans le traitement de l'ostéoporose, ont également indiqué que l'utilisation sous-cutanée intermittente de ces préparations a un effet anabolisant sur le squelette en découplant le processus de formation-résorption normalement présent avec une utilisation continue [Hodsman AB, 2005].

Le récepteur C-PTH : L'existence d'un récepteur C-PTH est soupçonnée depuis le début des années quatre-vingts [Rao LG, 1985] et est maintenant bien documentée, même si le clonage de ce récepteur n'a pas encore réussi. Les études les plus exhaustives ont utilisé des cellules clonales [Inomata N, 1995], des ostéocytes isolés à partir de souris ayant une ablation du récepteur de PTH de type I [Divieti P, 2001 ; Divieti P, 2005], et un traceur spécifique pour le

récepteur de la C-PTH. La hPTH (1-84) et la non-(1-84) PTH représentée par la hPTH (7-84) comme le plus long, et [tyr³⁴] hPTH (24-84) comme le plus court fragment, ont la plus grande affinité pour ce récepteur. Les plus courts fragments C-terminaux représentés par la hPTH (28-84) comme le plus long, et la hPTH (53-84) comme le plus court fragment, ont eu 10 à 20 fois moins d'affinité pour le même récepteur [Divieti P, 2005]. Pourtant, puisque ces derniers sont 10 fois plus abondants en circulation que les premiers, ils devraient être considérés tout aussi biologiquement importants [Brossard JH, 1996]. La hPTH (7-84) n'influence pas la production de l'AMP cyclique par le récepteur PTH/PTHrP de type I [Slatopolsky E, 2000 ; Nguyen-Yamamoto L, 2001] mais l'interaction de la hPTH (52-84) avec le récepteur de la C-PTH augmente le calcium intracellulaire des chondrocytes [Erdmann S, 1998] et des ostéocytes [Selim A, 2004]. Les déterminants de la liaison du traceur et de la bioactivité ont jusqu'à maintenant différé en fonction de cellules utilisées [Erdmann S, 1998; Selim A, 2004, ; Takasu H, 1996].

L'activité biologique des fragments C-terminaux a été étudiée au moyen de fragments C-terminaux synthétiques de la PTH, plus ou moins représentatifs de ceux qui se trouvent en circulation. La hPTH (7-84) [D'Amour P, 2005b], et la hPTH (39-84) ont une structure similaire à celle des fragments C-terminaux qui existent en circulation [Segre GV, 1977 ; Morrissey JJ, 1980 ; MacGregor RR, 1985 ; MacGregor RR, 1986 ; Zhang CX, 2006], mais il n'est pas certain que la hPTH (53-84) soit vraiment représentative de fragments C-terminaux plus petits

[Gao P, 2005]. Les études *in vivo* ont utilisé un modèle de rat parathyroïdectomisé (PTX) avec ou sans [Slatopolsky E, 2000 ; Nguyen-Yamamoto L, 2001] insuffisance rénale et des fortes doses de hPTH (7-84) [Slatopolsky E, 2000 ; Nguyen-Yamamoto L, 2001 ; Langub MC, 2003]. Un mélange de fragments C-terminaux (10% hPTH (7-84) et de 45% chaque de hPTH (39-84) et de hPTH (53-84)) plus représentatif de la PTH circulante a aussi été utilisé [Nguyen-Yamamoto L, 2001]. La hPTH (7-84) et, dans une moindre mesure, le mélange de fragments ont diminué la calcémie et la phosphatémie [Slatopolsky E, 2000 ; Nguyen-Yamamoto L, 2001] avec [Slatopolsky E, 2000] ou sans une diminution de l'excrétion du phosphate urinaire [Nguyen-Yamamoto L, 2001]. Ils ont contrecarré aussi l'effet stimulant de la hPTH (1-84) ou de la hPTH (1-34) [Slatopolsky E, 2000 ; Nguyen-Yamamoto L, 2001] sur la calcémie et la résorption osseuse du calcium induite par la hPTH (1-84) [Langub MC, 2003]. Les effets de la hPTH (7-84) et du mélange des fragments C-terminaux sont indépendants du récepteur de type I de la PTH. Ces effets sont exercés via un récepteur différent, le récepteur de la C-PTH [Slatopolsky E, 2000 ; Nguyen-Yamamoto L, 2001]. *In vitro*, les peptides synthétiques de la C-PTH augmentent l'activité de la phosphatase alcaline, l'ARNm de l'ostéocalcine dans les cellules ostéoblastiques [Sutherland MK, 1994 ; Nakamoto C, 1993], la formation des ostéoclastes et leur activité [Kaji H, 1994], l'activité de la phosphatase alcaline dans les cellules dentaires germinales de l'embryon de souris [Tsuboi T, 1998] et l'expression du collagène dans les chondrocytes [Erdmann S, 1996]. La hPTH (7-84) est aussi un puissant inhibiteur

de la résorption osseuse induite par une variété de substances, comme l'est la hPTH (39-84) à de plus grandes concentrations [Divieti P, 2002]. La hPTH (7-84) inhibe aussi l'ostéoclastogénèse. [Divieti P, 2002]. La hPTH (24-84) et la hPTH (39-84) sont en mesure de promouvoir l'apoptose des ostéocytes [Divieti P, 2001 ; Divieti P, 2005]. Les fragments C-PTH synthétiques ne se lient pas au récepteur de type I de la PTH [Rosenblatt M, 1978 ; Pines M, 1994 ; Nguyen-Yamamoto L, 2001]. De même, la hPTH (7-84) et la [tyr³⁴] hPTH (19-84) ne déplacent pas les traceurs spécifiques pour le récepteur de type I de la PTH dans différentes cellules [Inomata N, 1995 ; Nguyen-Yamamoto L, 2001]. Cependant, ceci n'est peut-être pas toujours le cas. Lorsque la hPTH (7-84) se lie aux cellules tubulaires distales du rein, elle semble provoquer l'internalisation du récepteur de type I de la PTH, toutefois cela n'est pas observé avec les cellules tubulaires proximales [Sneddon WB, 2004]. Ce phénomène a été lié à l'expression du facteur régulateur de l'échangeur Na⁺/H⁺ de type I (NHERF 1) dans les cellules tubulaires proximales mais non dans les cellules tubulaires distales [Sneddon WB, 2003]. Ainsi les fragments de non-(1-84) PTH seraient aussi capables de contrôler l'expression et l'activité biologique du récepteur de type I de la PTH, en fonction de l'expression du NHERF 1 dans les cellules cibles.

II.2.4 La biologie de la PTH : une nouvelle version basée sur les formes moléculaires circulantes de la PTH

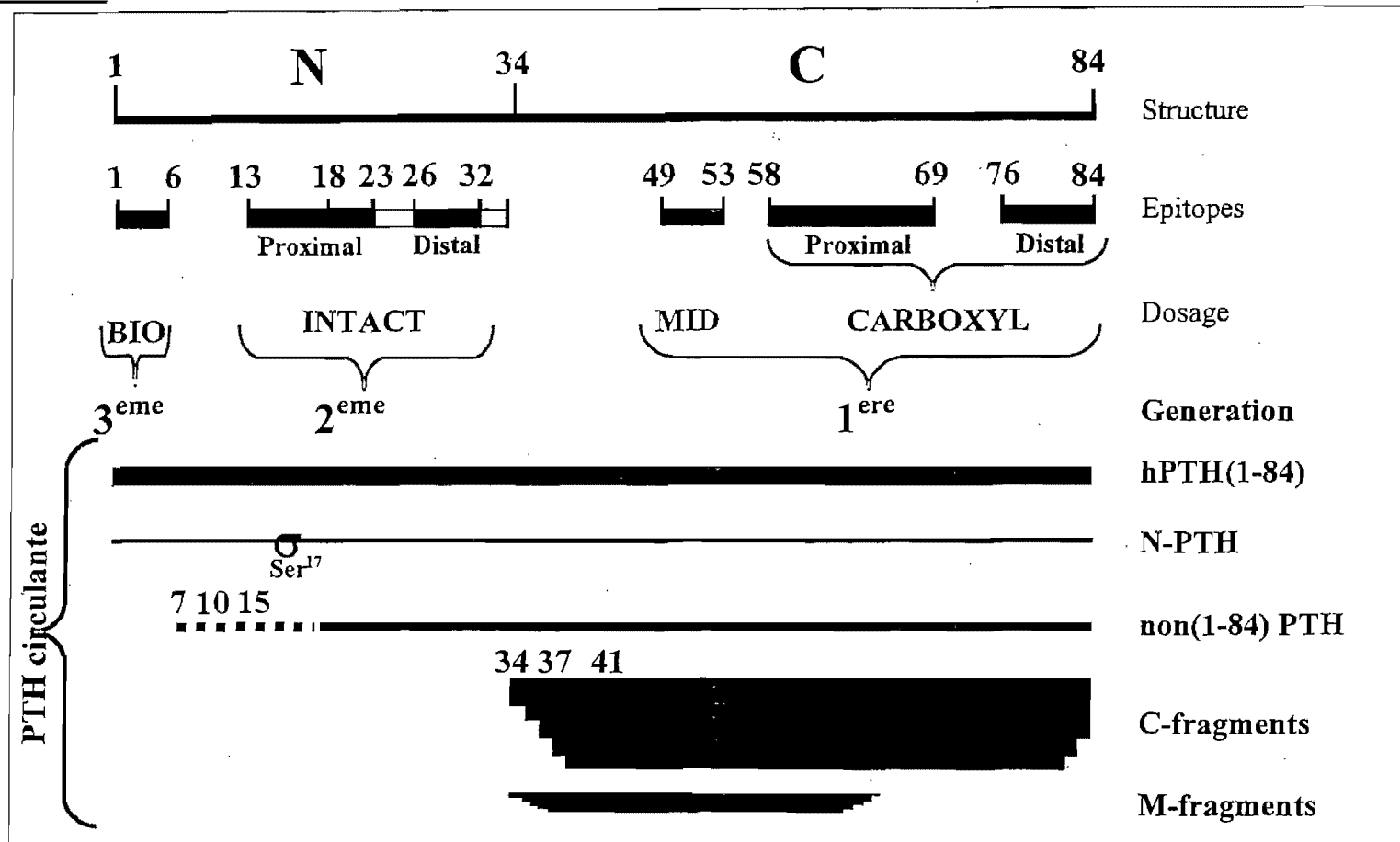
(Figure 7)

Cette revue de la littérature indique l'existence de deux récepteurs à la PTH, souvent sur les mêmes cellules, et qui interagissent avec deux parties différentes

de la molécule de PTH (1-84). La PTH (1-84) est capable d'interagir avec ces deux récepteurs, tandis que les fragments C-terminaux de la PTH et la non-(1-84) PTH seulement avec le récepteur C-PTH. De plus, les effets biologiques des premiers 34 acides aminés de la structure de la PTH sur le récepteur PTH/PTHrP de type I semblent être opposés aux effets biologiques exercés par les fragments C-terminaux sur le récepteur C-PTH des tissus osseux et rénal. Nous avons maintenant à faire avec un système complexe qui exerce des effets positifs et négatifs sur l'homéostasie du calcium et la résorption osseuse, en fonction de l'apport en calcium et en vitamine D [Cloutier M, 1997 ; Cloutier M, 1994 ; Cloutier M 1992]. La $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, un régulateur négatif de l'expression du gène de la PTH [Russell J, 1986], a une influence importante sur la sécrétion des fragments C-terminaux [Cloutier M, 1997 ; Cloutier M, 1992 ; Hanley DA, 1996]. En conclusion, l'hétérogénéité immunologique de la PTH circulante ne peut plus être considérée comme un processus non pertinent. Néanmoins, la compréhension du rôle des fragments C-terminaux de la PTH dans la physiologie normale nécessitera davantage d'expérimentation avec des concentrations plus physiologiques de fragments C-terminaux. Particulièrement, la hPTH (7-84) ne peut pas être considérée comme le seul fragment significatif étant donné sa faible concentration en circulation [Brossard JH, 1996]. Les fragments C-PTH plus petits doivent aussi être pris en considération pour rendre ce système significatif du point de vue physiologique [Nguyen-Yamamoto L, 2001]. De plus il est à noter que les effets de fragments C-terminaux sur la synthèse de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$

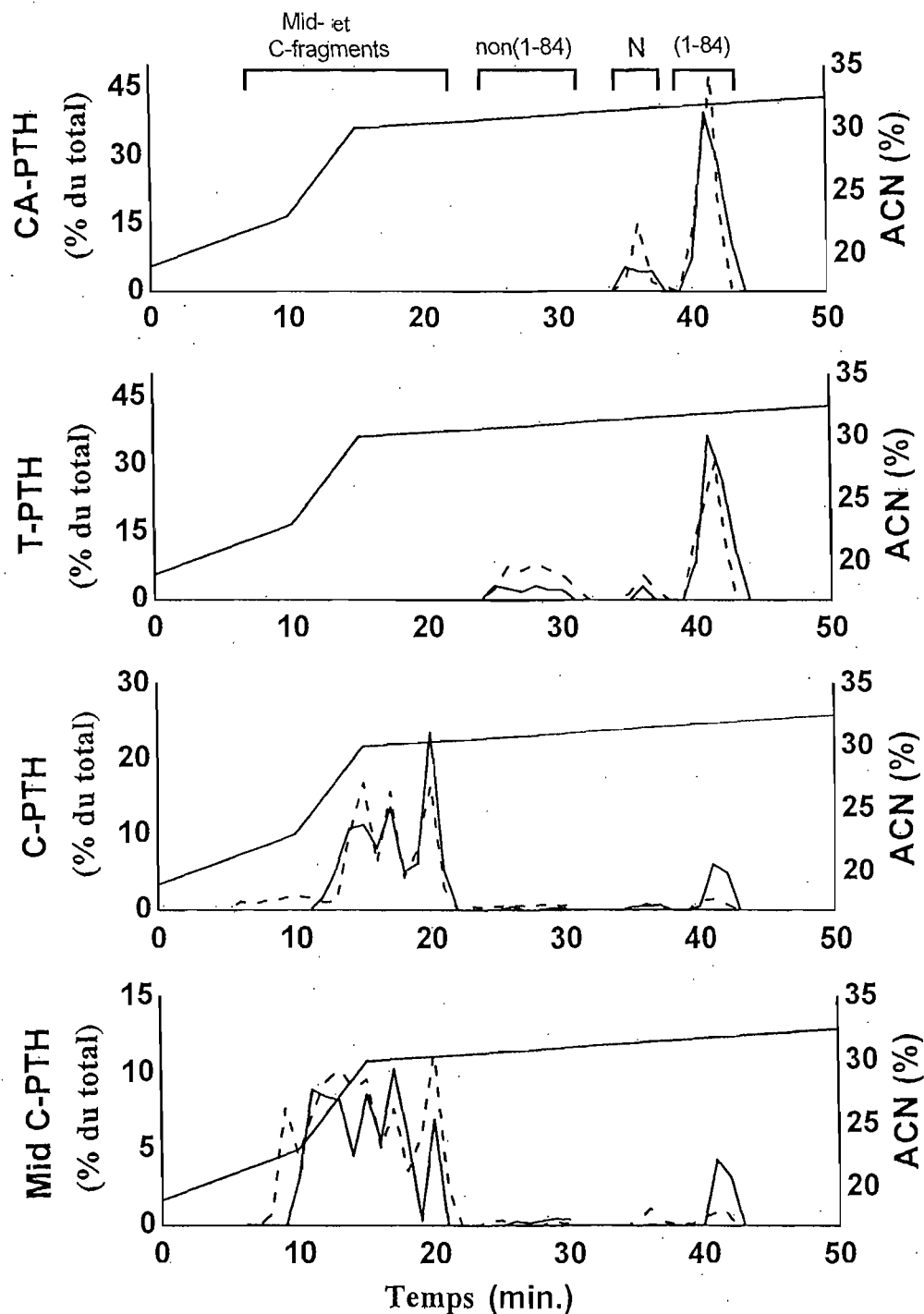
induite par la PTH n'ont pas été encore décrits, et constituent l'essentiel du travail de cette maîtrise.

FIGURE 4 Détection des formes moléculaires circulantes de PTH par les dosages de PTH



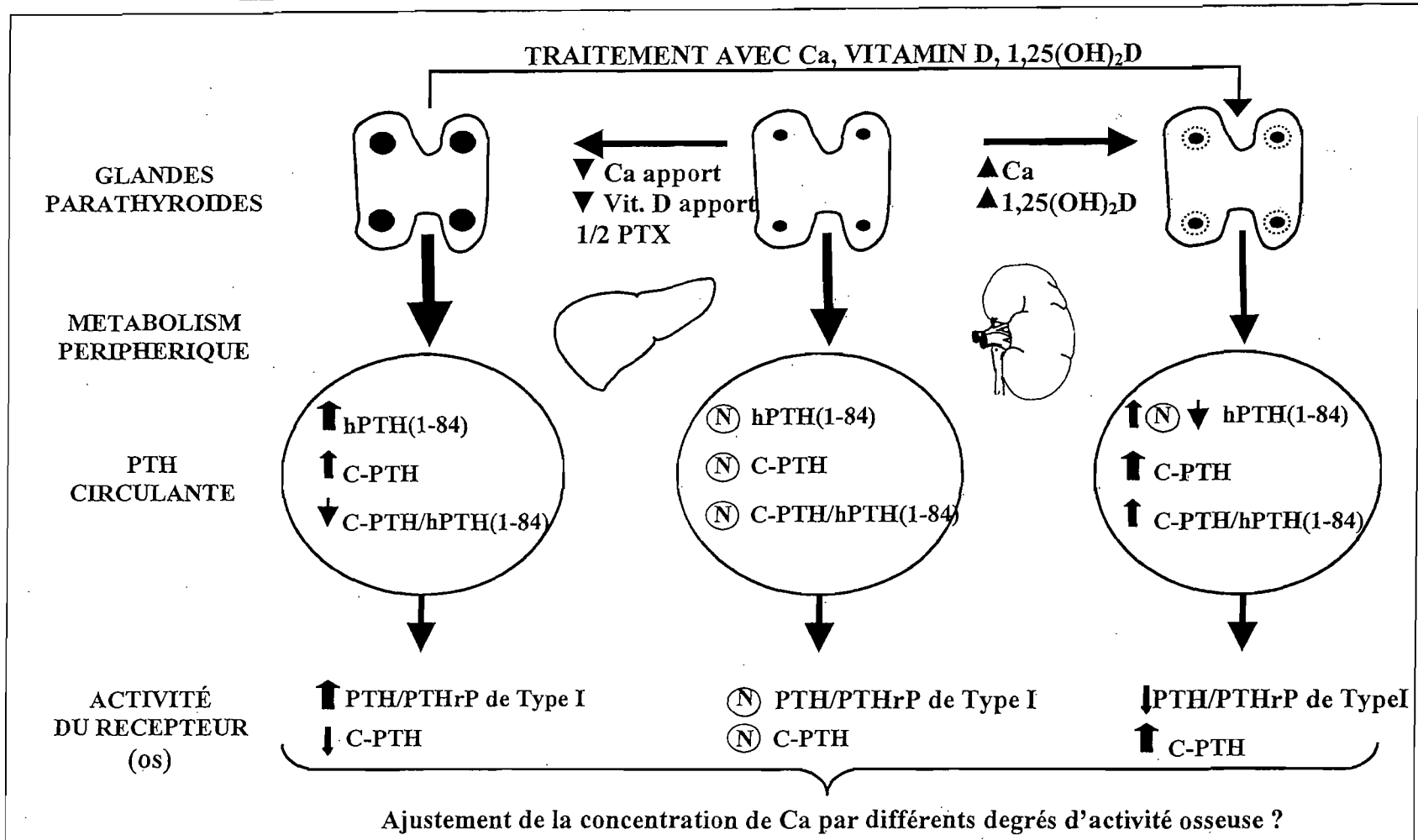
Cette figure illustre la relation existante entre la structure de la hPTH(1-84), les formes circulantes de PTH et leur détection par 3 générations de dosages de PTH. La hPTH(1-84) réagit dans tous les dosages de PTH, la N-PTH dans tous les dosages sauf les dosages de 2^{me} génération avec un epitope dans la région 15-20, la non-(1-84)PTH dans les dosages de 1^{ere} et 2^{me} génération alors que les plus petits fragments C-terminaux ou M-terminaux seulement dans les dosages de 1^{ere} génération. La non réactivité de la N-PTH dans les dosages de 2^{me} génération avec un epitope proximal s'explique le plus probablement par une modification post-traductionnelle de la serine en position 17.

FIGURE 5 PROFILS HPLC DE LA PTH CIRCULANTE



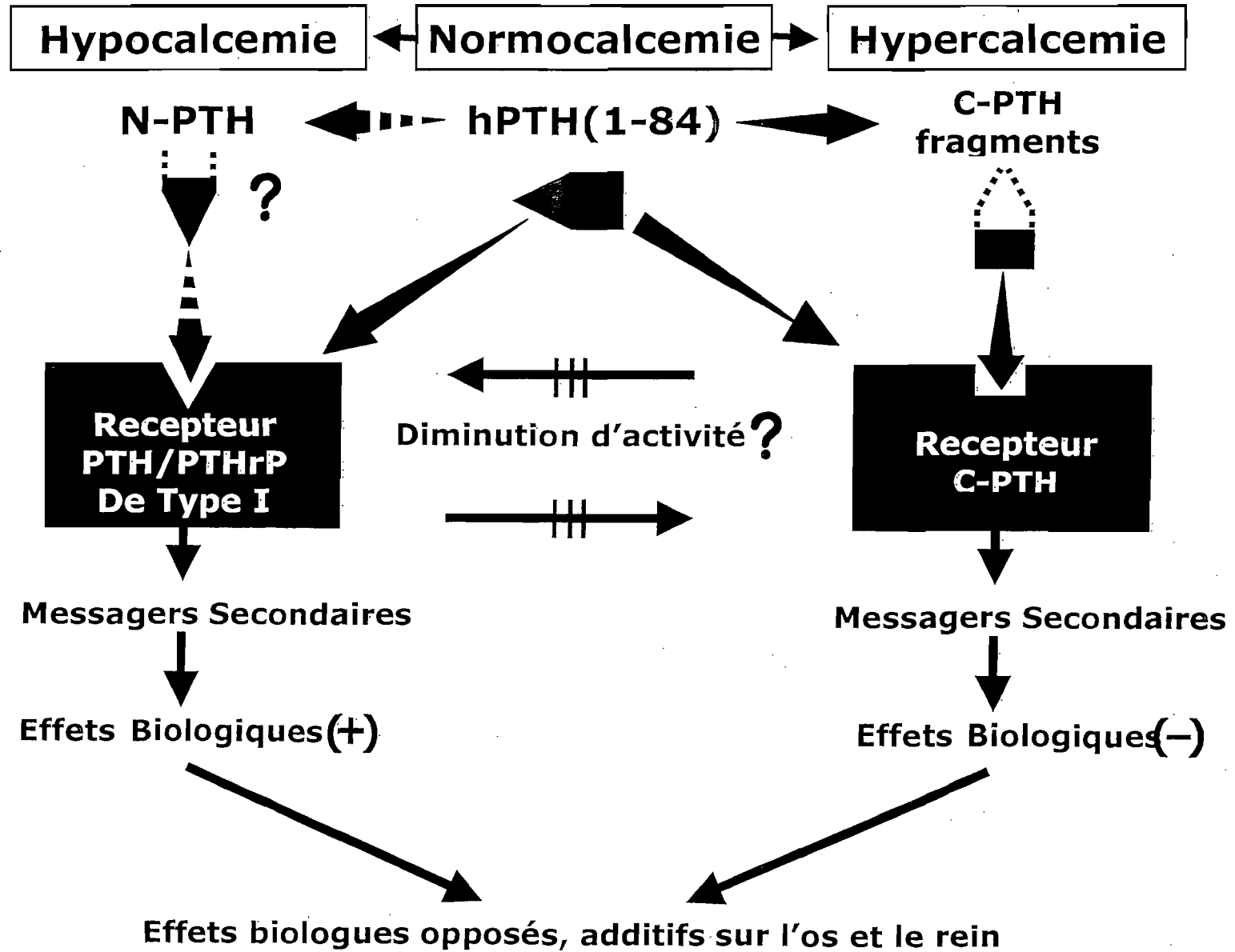
HPLC de la parathormone circulante chez un individu normal (—) et un patient avec insuffisance rénale terminale (-----). Les résultats sont exprimés en % de l'immunoréactivité totale détectée par 3 générations de dosages de PTH. Les dosages Mid et C-terminaux de 1^{ère} génération détectent de petits fragments de PTH n'ayant aucune structure amino terminale. Le dosage de T-PTH est un dosage de PTH intacte de 2^{ème} génération avec un epitope 13-18 qui détecte la PTH(1-84) et les fragments non-PTH(1-84) qui ont une structure amino-terminale avec un epitope 1-4, qui reconnaît la PTH(1-84) et une nouvelle forme de PTH amino-terminale (N-PTH). Il y a davantage de fragments C-terminaux en insuffisance rénale parce que ces fragments sont principalement éclairés par le rein.

FIGURE 6 UN NOUVEAU CONCEPT DE LA BIOACTIVITÉ DE LA PTH



Plusieurs facteurs peuvent influencer la quantité relative de hPTH(1-84) et fragments carboxyl (C) terminaux présents en circulation. En situation aiguë, la calcémie demeure le modulateur principale du ratio C-PTH fragments/hPTH(1-84). Ces modifications peuvent être plus remarques en situation chronique ou davantage ou moins de hPTH(1-84) devient nécessaire au maintien de la calcémie. Ces changements se traduisent par une activité plus ou moins grande du récepteur PTH/PTHrP de Type I par rapport au récepteur C-PTH.

Figure 7 La Biologie de la PTH: Une nouvelle version



CHAPITRE III METHODOLOGIE

III.1 Animaux

Les rats Sprague - Dawley mâles, pesant entre 225-275 g ont été achetés chez Charles - River Canada (St- Constant, Québec). Ils ont été gardés en concordance avec les recommandations du Conseil Canadien de Soins pour les Animaux sur une diète normale avec eau de boisson supplémentée avec du gluconate du calcium 1% pour la durée du protocole et une semaine avant toute manipulation.

III.2 Protocole expérimental

Le protocole expérimental a été approuvé par le Comité Institutionnel de Protection des Animaux. Des groupes de 7-9 rats ont été étudiés. Sous anesthésie générale avec isoflurane, une parathyroïdectomie sélective a été pratiquée chez plusieurs groupes. La parathyroïdectomie a été considérée réussie quand le calcium ionisé (Ca^{++}) a chuté sous la valeur de 1.10 mmol/L, 7-10 jours après la chirurgie. Sous le même type d'anesthésie, une mini pompe osmotique (Modèle Alzet 1003D, 1 μ l/h pour 3 jours, Durec Corp., Cupertino, CA) a été implantée sous -cutanée sur la région dorsale de tous les rats pour délivrer IV une préparation de PTH ou de solvant via un cathéter de type silastique (0.64 mm (D.I.), Dow Corning Corp., Midland, MI) introduit dans la veine jugulaire droite. Toutes les préparations de PTH (BACHEM, Torrance, CA) ont été dissoutes dans le même solvant (2.2% L - cystéine HCl, 0.9% salin), dans un volume final de 130 μ l. Deux groupes, un sham et un groupe PTX ont été infusés avec le

solvant seul, deux groupes PTX avec la hPTH (1-84) à 0.24 nmol/kg/h et la hPTH(1-34) à 0,12 nmol/kg/h, 2 groupes PTX avec la rPTH(1-84) à 0.09 nmol/kg/h et la rPTH(1-34) à 0.06 nmol/kg/h et 2 groupes PTX avec la mixture de fragments rC-PTH (30% de rPTH(7-84) et 70% de rPTH(39-84)) seule ou avec la rPTH(1-34) à 0.06 nmol/kg/h. Un échantillon sanguin a été obtenu par la veine de la queue pour mesurer le Ca^{++} quotidiennement sur trois jours avant l'implantation du mini pompe et 4h, 24h, 48h après. Les animaux sont sacrifiés à 48h par exsanguination via la veine cave abdominale.

III.3 Méthodes expérimentales

Produits : Tous les peptides de r ou de hPTH ont été achetés chez BACHEM dans leur catalogue régulier ou après synthèse spécifique pour ce projet.

Biochimie : Le calcium ionisé (Ca^{++}) a été mesuré par une électrode spécifique (Modèle Rapid Lab 348, Bayer Diagnostics, Toronto, Ontario). Le calcium total, phosphate, albumine, créatinine et phosphatase alcaline ont été mesurés par méthodes colorimétriques adaptés au multianalyseur. La PTH humaine (h) et la PTH de rat (r) ont été mesurées avec des troupes PTH ELISA, fournies par Immunotopics Int. (San Clement, CA). Deux dosages de hPTH, avec une spécificité pour les régions (1-4) (Bio Intact), (12-23) (Intact) de la structure de la PTH, ont été utilisés. Des dosages similaires de rPTH ont été utilisés, mais leurs épitopes dans les régions 1-4 et 13-34 n'ont pas été encore précisément identifiés.

Analyse statistique : Les résultats sont exprimés sous la forme d'une moyenne \pm une déviation standard. La différence entre les groupes a été analysée par ANOVA suivi d'un test de Student – Newman Keuls pour les comparaisons multiples.

Analyses relatives à l'évaluation de l'expression génique

Extraction des ARN rénaux

Les ARN totaux des échantillons de reins ont été extraits en présence d'isothiocyanate de guanidine et de LiCl selon la méthode de Chirgwin et *al.* [Chirgwin JM, 1979] décrite précédemment par Lemay et *al* [Lemay J,1995]. Les échantillons ont subi une digestion avec la protéinase K afin de digérer les contaminants protéiques et ont été extraits avec un mélange de phénol-chloroforme-alcool isoamylique puis ont été précipités avec de l'acétate de sodium et de l'éthanol. La concentration des échantillons a été dosée par spectrophotométrie à 260 et à 280 nm selon la formule suivante :

$$\frac{D.O.260nm - D.O.280nm \times \text{Facteur de dilution}}{0,0125} = \mu\text{g d'ARN/mL}$$

Synthèse d'ADNc

Les ARNs sont traités à la DNase à l'aide de la trousse (RNeasy Mini Kit, Qiagen, Mississauga, Ont.) et les ADNc sont synthétisés par transcription inverse (RT) en présence de 1 μ g d'ARN total (First-Strand cDNA Synthesis Kit,

Amersham Biosciences) en utilisant l'oligonucléotide hexamère aléatoire Pd(N)₆ comme amorce selon les instructions du manufacturier. La réaction de transcription inverse a été conduite à 37°C pendant 1 heure. Préalablement aux réactions d'amplification, une purification des ADNc a été faite en utilisant la trousse ChargeSwitch PCR Clean-Up Kit d'Invitrogen (Mississauga, Ont.) selon les instructions du manufacturier et l'ADNc a été résuspendu dans un volume de 30µL.

Réaction de PCR en temps réel

Des amorces spécifiques au rat ont été employées afin d'amplifier les fragments de cDNA correspondant aux gènes codant pour les *CYP27B1*, *CYP24*, *VDR* et le *GAPDH* (Voir tableau 1). Les amorces ont été élaborées à l'aide du logiciel Primer 3 (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi) et synthétisées par la compagnie Invitrogen (Mississauga, ON). La synthèse des amorces a été réalisée selon les séquences de St-Arnaud *et al.* [St-Arnaud R, 1997] *CYP27B1*, Kawane *et al* [Kawane T, 2001] (*PTH-PTHrPr*), Ohyama *et al.*, [Ohyama Y, 1991] Burmester *et al* [Burmester, J.K, 1988] *VDR* et Tso *et al.* [Tso JY, 1985] *GAPDH*. La description des amorces des différents gènes étudiés est présentée au tableau 1. Le mélange PCR de 25µl était constitué de 2,5 µL (*GAPDH*) ou de 6µL (tous les autres) de la réaction de RT purifiée; 20µM d'amorces spécifiques et 12,5µL d'un mélange prêt à l'emploi pour le PCR quantitatif (Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG, Invitrogen,

Mississauga, ONT) et les échantillons sont placés dans un appareil Rotor-Gene 3000 (Corbett Research, Sydney, Australia) et l'amplification de tous les gènes a été réalisée sous les conditions suivantes : 1 cycle de dénaturation à 95°C pendant 3 minutes, 45 cycles d'appariement à 59°C pendant 30 secondes et d'élongation à 72°C pendant 30 secondes, et finalement, le PCR se termine par un dernier cycle de fusion de 72°C à 95°C.

Tableau I. Description des séquences d'amorces

Oligonucléotides	Séquences	Position dans la séquence
<i>CYP27B1</i>	5'-GCTATGCTGGA ACTCTGGACAG-3'	452-473
	5'-TTCTTTGATCACAGCCTTTAGC-3'	1122-1101
<i>PTH-PTH_rPR</i>	5'-CTGTTTCTGCAATGGTGAGG-3'	1449-1468
	3'-GTTTCCCATTCTTCCTGCAA-5'	1838-1819
-----	3'-CAAGTGCTGGGTTCTAGTGA-5'	1601-1621
	5'- TTAACGCAAGCCAGGTGCC-3'	1886-1867
<i>VDR</i>	3'-CAGCGGCCAGCACCTCCCTGC-5'	105-125
	5'- CTGTCCTTCAAGGCCTCTTCC-3'	450-439
<i>GAPDH</i>	3'-CCCTTCATTGACCTCAACTACATGGT-5'	123-148
	5'- GAGGGGCCATCCACAGTCTTCTG-3'	592-570

Pour chacun des gènes étudiés, une courbe standard a été générée à partir d'un échantillon d'ARN rénal provenant du groupe témoin parathyroïdectomie simulée-salin (solvent-salin) et les résultats du niveau d'expression à l'état d'équilibre sont exprimés sous forme de ratio *Gène d'intérêt/GAPDH*. Arbitrairement, le ratio du groupe solvant-salin a été établi à 1.

CHAPITRE IV RESULTATS

**PTH C-TERMINAL FRAGMENTS INHIBIT ACTIVE HORMONE AND
HYPOCALCEMIA-INDUCED 1,25(OH)₂D SYNTHESIS**

M. Usatii, L. Rousseau, C. Demers, J.-L. Petit, J.-H. Brossard, M. Gascon-Barré,

¹J.R. Lavigne, ¹R.J. Zahradnik, ²E. F. Nemeth, P. D'Amour

Centre de recherche, Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM) -

Hôpital Saint-Luc and Department of Medicine, Université de Montréal

Montréal, Québec, Canada. ¹Immutopics International., San Clemente, CA, USA,

²NPS Pharmaceuticals, Toronto, Canada

Running headline: C-PTH fragments and 1,25(OH)₂D synthesis

Address requests for reprints to:

Pierre D'Amour, M.D.

Centre de recherche

CHUM - Hôpital Saint-Luc

264, boul. René-Lévesque est

Montréal (Québec) Canada H2X 1P1

Tel: (514) 890-8310 ext. 35707 / Fax: (514) 412-7314

e-mail: XXXXXXXXXX

ABSTRACT

Carboxyl (C)-terminal fragments of parathyroid hormone (PTH) oppose the calcemic, phosphaturic, and bone-resorbing effects of active hormone. To study the action of these fragments on 1,25(OH)₂D (1,25-dihydroxyvitamin D) synthesis, we infused parathyroidectomized rats with human or rat active 1-34 or 1-84 PTH at doses selected to produce similar calcemic responses. Human active PTH influenced neither phosphate nor 1,25(OH)₂D concentrations. However, active 1-34 rat PTH decreased phosphate to the same level as vehicle-treated rats and increased 1,25(OH)₂D to very high levels, whereas active 1-84 PTH decreased phosphate but maintained 1,25(OH)₂D. As the latter effect could have been due to C-terminal fragment generation during its metabolic breakdown, we infused a mixture of rat C-terminal fragments alone or with rat 1-34. The C-terminal fragments decreased 1,25(OH)₂D and prevented hypocalcemic-induced 1,25(OH)₂D synthesis. When infused with active rat 1-34, they lowered the 1,25(OH)₂D level to that seen with intact rat 1-84. The C-terminal fragments did not influence either basal or rat 1-34- or 1-84-induced CYP27B1 mRNA levels, suggesting that their inhibitory effects on 1,25(OH)₂D synthesis appears to be post-transcriptional.

Key words: Parathyroid hormone, 1,25(OH)₂ vitamin D, renal failure, CYP27B1

INTRODUCTION

Carboxyl-terminal (C) fragments constitute 75-80% of circulating parathyroid hormone (PTH) immunoreactivity in a normal individual and more than 95% in renal failure patients.¹ Once believed to be biologically inactive, these fragments have now been demonstrated to exert biological actions both in vivo and in vitro (see Murray et al.² for review). In vivo, in parathyroidectomized (PTX) rats, human (h) PTH(7-84) and a mixture of hC-PTH fragments (10% hPTH(7-84) and 45% each of hPTH(39-84) and (53-84)) were able to decrease calcium concentration beyond the effect of parathyroidectomy,^{3,4} to reduce phosphate concentration,⁴ and to antagonize the calcemic or phosphaturic action of PTH(1-84) or hPTH(1-34).^{3,4} hPTH(7-84) also diminished the high bone turnover induced by hPTH(1-84) alone in rats with renal failure.⁵ In vitro, the most impressive effect was an inhibition of calcium resorption elicited not only by PTH(1-84) and PTH(1-34) but also by 1,25(OH)₂ vitamin D (1,25-dihydroxyvitamin D), prostaglandin E₂, and interleukin-11.⁶ It also promoted osteoblast apoptosis.⁷ All these outcomes of C-PTH fragments are opposite and probably independent of those of PTH(1-84) or (1-34) on the PTH/PTHrP type 1 receptor. Binding studies⁷⁻⁹ suggest that these effects may be mediated via a different so-called C-PTH receptor, but the latter has not yet been cloned successfully.

Surprisingly, nothing has been established about the possible action of C-PTH fragments on 1,25(OH)₂D synthesis. It is well-known that 1,25(OH)₂D impacts the secretion of PTH(1-84) and the C-PTH/I-PTH ratio in blood.¹⁰⁻¹² Here, we report a

negative influence of C-PTH fragments on 1,25(OH)₂D synthesis but not on CYP27B1 mRNA expression in the kidneys. We also explain why it has been difficult to demonstrate an effect of hPTH(1-84) or (1-34) preparations on 1,25(OH)₂D synthesis.

RESULTS

Table 1 and Figure 1a and b illustrate the biochemical characteristics of our PTX rat model and the influence of hPTH and rat(r)PTH(1-34) and (1-84) infusion in these animals. The dose of each preparation to be infused intravenously for 48 h was established in preliminary experiments, which aimed at the correction of low Ca²⁺ concentrations present in PTX rats to the levels observed in the controls. This was achieved at 0.24 nmol/kg/h for hPTH(1-84), 0.12 nmol/kg/h for hPTH(1-34), 0.09 nmol/kg/h for rPTH(1-84), and 0.06 nmol/kg/h for rPTH(1-34). These doses caused a similar increase of 0.27-0.31mmol/l in Ca²⁺ or of 0.54-0.69mmol/l in total Ca at 48 h (Table 1 and Figure 1b). The PTX-h- and rPTH(1-84)-infused groups had a mean body weight slightly lower than that of the sham-solvent group (P<0.05). The PTX-solvent group was hypocalcemic (P<0.001) and hyperphosphatemic (P<0.01) with low to undetectable levels of rPTH (P<0.001) compared to sham-solvent rats, but its mean 25-hydroxyvitamin D (25(OH)D) and 1,25(OH)₂D levels did not differ from those of the latter group (nonsignificant (NS)).

When infused with hPTH or rPTH preparations at the preselected doses, all PTX groups significantly increased their ionized and total calcium concentrations compared to PTXsolvent group (P<0.001) and to the mean level observed in sham-solvent rats (NS). The two PTX-hPTH-infused groups failed to decrease their phosphate concentration to the values found in sham-solvent rats (P<0.05) and, in fact, remained similar to PTX-solvent rats (NS). In contrast, both PTXrPTH-infused groups decreased their phosphate values to the concentration in sham-solvent rats (NS) and significantly

lower than in the PTX-solvent group ($P < 0.05$) or the two PTX-hPTH-infused groups ($P < 0.05$). Mean alkaline phosphatase levels did not differ among the various groups. Mean serum 25(OH)D concentrations were higher in the sham-solvent group ($P < 0.01$) than in the PTX-h- and rPTH(1-34) as well as the PTX-hPTH(1-84)-infused groups, but the values observed did not differ from those of the PTX-solvent group (NS). The two PTX-hPTH-infused groups decreased their 1,25(OH)₂D to lower values than in the sham-solvent group ($P < 0.05$), the PTX-solvent group ($P < 0.01$) or the PTXrPTH(1-34)-infused ($P < 0.001$) and the PTX-rPTH(1-84)-infused ($P < 0.05$) groups. In contrast, the PTX-rPTH(1-34) group increased its 1,25(OH)₂D concentration to well above all other groups ($P < 0.01$). The PTX-rPTH(1-84)-infused group maintained a mean 1,25(OH)₂D concentration similar to the sham- and PTX-solvent groups (NS). Rats infused with hPTH or rPTH(1-34) preparations had undetectable levels of hPTH or rPTH in the circulation, as expected. Rats infused with hPTH(1-84) displayed levels of hPTH(1-4) and (12-23) that were respectively 10 and 4 times higher than rPTH values in sham-solvent rats, whereas rPTH(1-84)-infused rats showed rPTH(1-4) and (13-34) values similar to those of the latter group.

Table 2 and Figure 1c illustrate the influence of infusion of a rat C-PTH fragment mixture alone or with rPTH(1-34) on calcium, phosphate, 25(OH)D, and 1,25(OH)₂D concentrations in PTX rats. Infused alone the mixture did not affect the low total or ionized calcium values and the high phosphate and 25(OH)D concentrations observed in the PTX-solvent group. The only exception was the 1,25(OH)₂D level, which became significantly lower than in the PTX-solvent ($P < 0.001$), the PTX-rPTH(1-34)

($P < 0.001$), the PTXrPTH(1-34) mixture (30% rPTH (7.84) and 70% rPTH (39.84)) ($P < 0.05$), and the rPTH(1-84) ($P < 0.001$) groups, but was similar to the values in the normocalcemic, hyperphosphatemic hPTH-infused groups (NS). When rPTH(1-34) was infused with the mixture of C-PTH fragments, the total and ionized calcium values reached were identical to those obtained during the infusion of rPTH(1-34) (NS) or rPTH(1-84) (NS) alone, but phosphate was significantly higher than with rPTH(1-84) ($P < 0.01$), even if similar to the results with rPTH(1-34) (NS). 1,25(OH)₂D concentration declined significantly lower than with the infusion of rPTH(1-34) alone ($P < 0.001$) and was identical to the value observed with the rPTH(1-84) infusion (NS). As expected, rPTH(1-4) was only detectable in the group infused with rPTH(1-84) ($P < 0.001$), and the level was similar to that in sham-solvent rats (NS). rPTH(13-34) was detectable in the mixture groups and the rPTH(1-84) group. Its level was higher in the PTX-mixture group than in the PTX-solvent group ($P < 0.001$) and in the PTXrPTH(1-34) mixture and rPTH(1-84) groups ($P < 0.05$) compared to the rPTH(1-34) group, as expected. Next, the CYP27B1/GAPDH ratio was measured to try to understand how rC-PTH fragments were exerting their inhibitory effects on 1,25(OH)₂D synthesis (Figure 2). By a one way analysis of variance, the ratio was very different among the various groups ($P < 0.005$), but the between-groups analysis was only significant between the rPTH(1-84) group and the sham-solvent ($P < 0.05$) or PTX-solvent ($P < 0.05$) groups even if 50% of the rats in the rPTH(1-34) and rPTH(1-34)+mixture groups also increased their ratio. The ratio did not differ between the sham-solvent, the PTXsolvent, and the mixture alone groups.

DISCUSSION

Our aim was to study the possible influence of C-PTH fragments on 1,25(OH)₂D synthesis induced by a variety of hPTH or rPTH preparations and to compare the potency of hPTH and rPTH preparations in this regard. We developed a PTX rat model infused intravenously over 48 h with various PTH preparations. These rats had the biochemical characteristics of hypoparathyroid animals with low calcium, high phosphate, and very low to undetectable rPTH levels, but they maintained normal 25(OH)D and 1,25(OH)₂D levels. The absence of a decrease in mean 1,25(OH)₂D level in these rats is best explained by their hypocalcemia, which is a potent stimulator of 1,25(OH)₂D synthesis independently of PTH or phosphate levels.¹³⁻¹⁶

We next tested rPTH and hPTH(1-84) and (1-34) in our PTX rat model at doses that gave a similar calcemic response for each preparation. Despite the latter common characteristic, hPTH(1-84) and (1-34) had no effect on the elevated phosphate level and, in fact, caused a reduction of 25(OH)D and 1,25(OH)₂D levels. The decrease in 25(OH)D concentration is probably best explained by a PTH-induced increase in 25(OH)D turnover, as demonstrated previously in rats.¹⁷ The diminished 1,25(OH)₂D concentration reflects both the lack of influence of hPTH(1-34) and (1-84) preparations on 1,25(OH)₂D synthesis, at the selected doses, and the inhibitory impact of higher calcium concentrations, achieved with the hPTH preparations, on the same process.¹³⁻¹⁶ The doses of hPTH preparations selected for this study are the lowest required to normalize calcium concentration in PTX rats and are 16.5 (hPTH(1-84)) and 33 (hPTH(1-34)) times lower than doses tested by us in earlier experiments.⁴ It

demonstrates that hPTH preparations are less potent than their rat counterparts, as expected, but that they also have different dose dependencies of calcemic vs phosphatemic and 1,25(OH)₂D synthetic effects. These discrepancies were not observed with the two rPTH preparations, which disclosed similar hypercalcemic, hypophosphatemic, and 1,25(OH)₂D synthetic actions at the chosen concentrations. However, rPTH(1-34) proved to be a more potent preparation for stimulation of 1,25(OH)₂D synthesis than rPTH(1-84) by two fold. C-PTH fragments were generated during the peripheral metabolism of rPTH(1-84), and their levels did not differ significantly from those seen in sham-solvent control rats. We thus postulate that the difference in 1,25(OH)₂D synthesis noted between these two groups could be related to the presence of C-PTH fragments issued by hepatic metabolism in the rPTH(1-84)-infused group.

To study this hypothesis, we infused one group of PTX rats with a mixture of C-PTH fragments alone and a second group with the mixture and rPTH(1-34). The dose of rCPTH fragments selected was three times the dose of rPTH(1-34), a minimal difference required at least between the two human preparations to ascertain a biological effect of C-PTH fragments on calcium concentration.⁴ The composition of 30% PTH(7-84) and 70% PTH(39-84) was arbitrary, but attempted to better duplicate the composition of circulating PTH, with results from the human model.¹ The mixture alone did not influence calcium, phosphate, or 25(OH)D concentrations in PTX rats but caused a significant decrease in 1,25(OH)₂D below that in PTX-solvent rats or the rPTH(1-34)- and rPTH(1-84)-infused groups. In fact, it prevented the hypocalcemia-

induced 1,25(OH)₂D synthesis observed in the PTX-solvent group, indicating that rC-PTH fragments are able to inhibit not only PTH-induced biological actions but also other hormone- or ion-induced biological effects, as demonstrated previously *in vitro* for the bone-resorbing outcome of 1,25(OH)₂D, prostaglandin E2, and interleukin-11.⁶ When infused with rPTH(1-34), the rPTH mixture did not reduce the calcemic effect of rPTH(1-34), nor did it influence the hypophosphatemic action of this rPTH preparation, but it decreased 1,25(OH)₂D synthesis induced by rPTH(1-34) alone to the level seen in rPTH(1-84)-infused rats or in sham-solvent controls, confirming our initial hypothesis.

To establish how the inhibitory effect of rC-PTH fragments was exerted, we measured CYP27B1 mRNA. The rC-PTH fragments mixture group, which had the lowest mean 1,25(OH)₂D level, presented a CYP27B1/GAPDH ratio similar to that of the sham- and PTX-solvent groups, indicating an inhibitory mechanism independent of CYP27B1 mRNA level. This was also confirmed in the rPTH(1-34), rPTH(1-84), and rPTH(1-34) mixture groups, which manifested a similar increase in the CYP27B1/GAPDH ratio in 50% of the rats in each group while having very different mean 1,25(OH)₂D levels. It remains unclear why only 50% of these 9-week rats increased their ratio. The CYP27B1 mRNA response of PTX rats to PTH is more marked in younger rats,¹⁸ and ours were young. The dose of rPTH(1-34) used was minimal in our study and may have been contributive. Together, these data suggest that the inhibitory effect of rC-PTH fragments on calcium- or rPTH-induced 1,25(OH)₂D synthesis is mainly post-transcriptional. As rC-PTH fragments exert an inhibitory

effect both on PTH- and calcium-induced 1,25(OH)₂D synthesis, one can postulate that their mechanism of action is not simply limited to inhibition of the PTH/PTHrP type 1 receptor. This observation confirms the results obtained *in vitro* concerning the inhibition of bone resorption by C-PTH fragments, which, besides PTH(1-84) and (1-34), also affect 1,25(OH)₂D, prostaglandin E₂, and interleukin-11.⁶ It is thus probably unlikely that the inhibitory effect could be related to PTH/PTHrP type 1 receptor internalization, an action of PTH(7-84) in some renal cells,¹⁹ but is probably linked more to the activation of a not-yet-cloned C-PTH receptor.² For the first time, an inhibitory impact of C-PTH fragments on 1,25(OH)₂D synthesis has been demonstrated. It is probably related to the fact that all prior studies *in vivo* in PTX rats used hPTH preparations,³⁻⁵ which had no stimulatory effect on 1,25(OH)₂D synthesis in our experiments and at the doses tested. Inhibition was seen at near physiological concentrations of rPTH(1-84) and rC-PTH fragments and in the absence of noticeable actions of rC-PTH fragments on calcium or phosphate concentrations. This indicates that the main function of rC-PTH fragments at physiological levels may be to control 1,25(OH)₂D synthesis. It may be part of a mechanism to regulate the participation of bone in circulating calcium concentration. When 1,25(OH)₂D is elevated, the intestinal absorption of calcium is enhanced, the transcription of the PTH gene is reduced,²⁰ the production and secretion of C-PTH fragments by the parathyroid glands¹² are augmented and measurable in the circulation.^{10,11} This should result in a decrease of bone resorption.⁶ The reverse would be true when 1,25(OH)₂D level is low. Our findings are pertinent to 1,25(OH)₂D synthesis in renal failure, as it is reduced very early when only 25% of the glomerular filtration rate is impaired.^{21,22} The

accumulation of C-PTH fragments is also a very early event²³ and may be involved in the early 1,25(OH)₂D diminution.

MATERIALS AND METHODS

Experimental animals

Male Sprague-Dawley rats, weighing 125-150 g and purchased from Charles-River Canada (St-Constant, QC, Canada), were maintained according to the guidelines of the Canadian Council on Animal Care on a normal chow diet supplemented with 1% calcium gluconate in water for the duration of the protocol and for 1 week before any manipulation.

Experimental protocol

The experimental protocol was approved by the Animal Care Committee of our center. Eight groups of 8-12 rats were studied. Parathyroidectomy was performed selectively in seven groups under isoflurane anesthesia delivered in NO₂/O₂ (4:1), whereas the other group was sham-operated under similar conditions. Parathyroidectomy was considered effective when concentration of ionized calcium (Ca²⁺) decreased below 1.10 mmol/l between 7 and 10 days post-surgery. Then, under the same type of anesthesia, an osmotic minipump (Alzet model 1003D, 1 ml/h for 3 days; Durect Corp., Cupertino, CA, USA) was implanted subcutaneously in the dorsal area in all rats to deliver PTH preparation intravenously via a silastic catheter (0.64 mm, inner diameter, Dow Corning Corp., Midland, MI, USA) introduced in the right jugular vein. The PTH preparations were dissolved in 2.2% L-cysteine HCl in 0.9% saline in a final volume of 130 ml, at the required concentration. Two groups, one sham and one PTX group, were infused with solvent alone, two PTX groups with hPTH(1-84) at 0.24

nmol/kg/h and hPTH(1-34) at 0.12 nmol/kg/h, two PTX groups with rPTH(1-84) at 0.09 nmol/kg/h and rPTH(1-34) at 0.06 nmol/kg/h, and two PTX groups with rC-PTH fragment mixture (30% rPTH(7-84) and 70% rPTH(39-84) alone at 0.18 nmol/kg/h or with rPTH(1-34) at 0.06 nmol/kg/h). Blood was obtained by the tail vein to measure Ca²⁺ daily for 3 days before minipump implantation and at 4, 24, and 48 h after. The animals were 9-10 weeks old when killed under general anesthesia at 48 h by exsanguination through the abdominal vena cava.

Experimental methods

Products: All h and rPTH peptides were obtained from BACHEM, some in their regular catalog but some newly synthesized for this project.

Biochemistry: Ca²⁺ was quantified by Ca²⁺-specific electrode (Rapid Lab Model 348, Bayer Diagnostics, Toronto, Ontario). Total calcium, phosphate, albumin, creatinine and alkaline phosphatase were measured by colorimetric methods adapted to multianalyser evaluation. 25(OH)D was quantified by a RIA from IDS, Inc. (Fountain Hills, AZ). 1,25(OH)₂D was analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay from ALPCO Diagnostics (Windham, NH). hPTH and rPTH were assessed by PTH enzyme-linked immunosorbent assays provided by Immotopics International (San Clemente, CA). Two hPTH assays were undertaken with specificity for regions 1-4 (bioactive hPTH) and 12-23 (intact hPTH) of the hPTH structure.²⁴ The first detects hPTH(1-84) but not hPTH(7-84), whereas the second detects both molecular forms equally. Similar rPTH assays were performed, but their epitopes ((1-4) and (13-34))

have not been more precisely defined. Again, the first assay detects rPTH(1-84) but not rPTH(7-84), whereas the second detects both molecular forms equally. These assays served to measure PTH in serum at the time of killing.

RNA processing:

Total renal RNA was extracted by the guanidine isothiocyanate and lithium chloride procedure described in Lemay et al.²⁵ Before reverse transcription, mRNA was treated with DNase (Qiagen, Mississauga, ON, Canada) and purified with a RNeasy kit from Qiagen. For reverse transcription, 1 mg of DNase-treated total RNA was converted to cDNA with the First-Strand cDNA synthesis kit using pd(N)₆ as primer. cDNA was purified with ChargeSwitchPCR Clean-Up kit (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) and resuspended in 30 ml of Tris buffer (10mM, pH 8.5).

Quantitative polymerase chain reaction (PCR)

The expression of specific mRNAs was quantified in a Rotor-Gene3000 Real-Time DNA amplification system (Corbett Research, Sydney, NSW, Australia). Briefly, 2.25µl (GAPDH) or 4.5 ml (CYP27B1) of the reverse transcription reaction was amplified with specific primers and Platinum SYBR Green qPCR SuperMix UDG (Invitrogen), in a volume of 25 ml according to the manufacturer's procedure under the following conditions: 95°C for 3 min, followed by 45 cycles of 95°C for 10 s, 59°C for 30 s, and 72°C for 30 s. The primers were designed to generate CYP27B1 and GAPDH cDNA fragments, as described previously with sequences by St-Arnaud

et al.²⁶ (CYP27B1) and Tso et al.²⁷ (GAPDH). Standard curves were charted, with an internal control for each gene, and the relative abundance value obtained was divided by the value derived from the housekeeping gene standard curve, giving a relative quantitative ratio.

Statistical analysis: The results are means \pm s.d.. Differences between groups were ascertained by analysis of variance, followed by the Student-Newman-Keuls multiple comparison 2 X 2 test.

ACKNOWLEDGMENTS AND DISCLOSURE

This work was made possible by an educational grant from NPS Pharmaceuticals (Toronto). There is no other disclosure to this work. The authors thank Manon Livernois for typing this manuscript and Ovid Da Silva for editing it.

TABLE 1
Bio-equivalence: rPTH and hPTH in PTX rats

Group parameters	Sham-solvent	PTX-solvent	PTX-rPTH(1-34) (0.06 nmol/kg/hr)	PTX-rPTH(1-84) (0.09 nmol/kg/hr)	PTX-hPTH(1-34) (0.12 nmol/kg/hr)	PTX-hPTH(1-84) (0.24 nmol/kg/hr)
N	8	9	12	8	8	8
Weight (g)	297 ± 16	281 ± 28	278 ± 26	256 ± 20 ^a	289 ± 32	252 ± 20 ^b
Ca ²⁺ (mmol/L)	1.31 ± 0.03	1.04 ± 0.03 ^c	1.33 ± 0.09 ^f	1.31 ± 0.07 ^f	1.35 ± 0.06 ^f	1.33 ± 0.07 ^f
Ca total (mmol/L)	2.47 ± 0.07	1.95 ± 0.07 ^c	2.55 ± 0.20 ^f	2.49 ± 0.19 ^f	2.64 ± 0.14 ^f	2.64 ± 0.11 ^f
Phosphorus (mmol/L)	2.47 ± 0.24	3.05 ± 0.37 ^b	2.66 ± 0.38 ^d	2.44 ± 0.30 ^e	2.93 ± 0.37 ^{a,i}	3.03 ± 0.12 ^{b,g,j}
Alk. phos. (U/L)	329 ± 57	256 ± 101	301 ± 88	282 ± 106	262 ± 61	258 ± 74
25(OH)D (nmol/L)	92 ± 28	75 ± 22	63 ± 10 ^b	76 ± 6	62 ± 16 ^b	64 ± 14 ^b
1,25(OH) ₂ D (pmol/L)	116 ± 18	133 ± 42	234 ± 96 ^{c,f}	122 ± 33 ^h	79 ± 29 ^{b,c,h,i}	75 ± 17 ^{a,c,h,i}
rPTH(1-4) (pmol/L)	3.6 ± 1.4	0 ± 0 ^c	0 ± 0 ^c	3.7 ± 3.5 ^{f,h}	0 ± 0 ^{c,k}	2.6 ± 2.9 ^{a,f,h}
rPTH(13-34) (pmol/L)	12.5 ± 4.2	0.5 ± 0.4 ^c	0 ± 0 ^{c,f}	7.6 ± 7.3 ^{f,h}	0 ± 0 ^{c,f,k}	0.2 ± 0.2 ^{c,h,k}
hPTH(1-4) (pmol/L)	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	44 ± 31 ^{c,f,h,k}
hPTH(12-23) (pmol/L)	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	57 ± 40 ^{c,f,h,k}

ANOVA, analysis of variance; hPTH, human parathyroid hormone; 1,25(OH)₂D, 1,25-dihydroxyvitamin D; PTH, parathyroid hormone; PTX, parathyroidectomized. Results are means ± s.d. obtained at time 48 h. Statistical analysis by one-way ANOVA on log-transformed values, followed by the Student-Newman-Keuls test. Sham-solvent vs all PTX groups: ^aP<0.05; ^bP<0.01; ^cP<0.001. PTX-solvent vs PTH-infused PTH groups: ^dP<0.05; ^eP<0.01; ^fP<0.001. PTX-rPTH(1-34) vs other PTX-PTH-infused groups: ^gP<0.05; ^hP<0.001. PTX-rPTH(1-84) vs PTX-hPTH-infused groups: ⁱP<0.05; ^jP<0.01; ^kP<0.001.

TABLE 2
Influence of rC-PTH fragment mixture on the biological responses to rPTH(1-34)

Group parameters	PTX- solvent	PTX-rmixture (0.18 nmol/kg/hr)	PTX-rPTH(1-34) (0.06 nmol/kg/hr)	PTX-rPTH(1-34) + rmixture (0.18 mmol/kg/hr)	PTX- rPTH(1-84) (0.09 nmol/kg/hr)
N	9	10	12	8	8
Weight (g)	281 ± 28	264 ± 22	278 ± 26	254 ± 17	256 ± 20
Ca ²⁺ (mmol/L)	1.04 ± 0.03	0.99 ± 0.07	1.33 ± 0.09 ^{b,d}	1.32 ± 0.12 ^{b,d}	1.31 ± 0.07 ^{b,d}
Ca total (mmol/L)	1.95 ± 0.07	1.95 ± 0.17	2.55 ± 0.20 ^{b,d}	2.59 ± 0.27 ^{b,d}	2.49 ± 0.19 ^{b,d}
Phosphorus (mmol/L)	3.05 ± 0.37	3.16 ± 0.32	2.66 ± 0.38	2.87 ± 0.28	2.44 ± 0.30 ^{a,d,f}
Alk. phos. (U/L)	256 ± 101	332 ± 100	301 ± 88	278 ± 63	282 ± 106
25(OH)D (nmol/L)	75 ± 22	71 ± 10	63 ± 10	63 ± 9	76 ± 6
1,25(OH) ₂ D (pmol/L)	133 ± 42	67 ± 20 ^b	234 ± 96 ^{b,d}	98 ± 26 ^{c,h}	122 ± 33 ^{d,g}
rPTH(1-4) (pmol/L)	0	0	0	0	3.7 ± 3.5 ^{b,d,g,h}
rPTH(13-34) (pmol/L)	0.5 ± 0.4	30.7 ± 19.8 ^b	0 ^d	9.8 ± 5.0 ^{d,f}	7.6 ± 7.3 ^{d,e}

ANOVA, analysis of variance; 1,25(OH)₂D, 1,25-dihydroxyvitamin D; PTH, parathyroid hormone; PTX, parathyroidectomized. Results are means ± s.d. obtained at time 48 h. Differences between groups were analyzed by one-way ANOVA on log-transformed values, followed by the Student-Newman-Keuls test. PTX solvent vs other groups: ^aP<0.01; ^bP<0.001. PTX-rmixture vs other PTX-PTH-infused groups: ^cP<0.05; ^dP<0.001. PTX-rPTH(1-34) vs the two other rPTH-infused groups: ^eP<0.005; ^fP<0.01; ^gP<0.001. PTH-rPTH(1-34)+rmixture vs rPTH(1-84): ^hP<0.001.

REFERENCES

1. Brossard JH, Cloutier M, Roy L, *et al.* 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, 2000
2. Murray TM, Rao LG, Divieti P, *et al.* Parathyroid hormone secretion and action: evidence for discrete receptors for the carboxyl-terminal region and related biological actions of carboxyl-terminal ligands. *Endocrine Rev* 26:78-113, 2005
3. Slatopolsky E, Finch J, Clay P, *et al.* A novel mechanism for skeletal resistance in uremia. *Kidney Int* 58:753-761, 2000
4. 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
5. Langub MC, Monier-Faugere MC, Wang G, *et al.* Administration of PTH-(7-84) antagonizes the effects of PTH-(1-84) on bone in rats with moderate renal failure. *Endocrinology* 144:1135-1138, 2003
6. Divieti P, John MR, Jüppner H, *et al.* Human PTH-(7-84) inhibits bone resorption *in vitro* via actions independent of the type 1 PTH/PTHrP receptor. *Endocrinology* 143:171-176, 2002

7. 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.
8. Inomata N, Akiyama M, Kubota N, *et al.* Characterization of a novel PTH-receptor with specificity for the carboxyl-terminal region of PTH(1-84). *Endocrinology* 136:4732-4740, 1995
9. Divieti P, Geller AI, Suliman G, *et al.* Receptors specific for the carboxyl-terminal region of parathyroid hormone on bone-derived cells: determinants of ligand binding and bioactivity. *Endocrinology* 146:1863-1870, 2005
10. Cloutier M, Brossard JH, Gascon-Barré M, *et al.* 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
11. Cloutier M, Gagnon Y, Brossard JH, *et al.* Adaptation of parathyroid function to IV 1,25-dihydroxyvitamin D3 or partial parathyroidectomy in normal dogs. *J Endocrinol* 155:133-141, 1997
12. Hanley DA, Matus S, Cheng H. Effect of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on secretion of parathyroid hormone fragments in cultured bovine parathyroid cells. *Clin Invest Med* 19:S23, 1996

13. Trechsel U, Eisman JA, Fischer JA, *et al.* Calcium-dependent, parathyroid hormone-independent regulation of 1,25-dihydroxyvitamin D. *Am J Physiol* 239:E119-E124, 1980
14. Hulter HN, Halloran BP, Toto RD, *et al.* Long-term control of plasma calcitriol concentration in dogs and humans: dominant role of plasma calcium concentration in experimental hyperparathyroidism. *J Clin Invest* 76:695-702, 1985
15. Bushinsky DA, Riera GS, Favus MJ, *et al.* Evidence that blood ionized calcium can regulate serum 1,25(OH)₂D₃ independently of parathyroid hormone and phosphorus in the rat. *J Clin Invest* 76:1599-1604, 1985
16. Weisinger JR, Favus MJ, Langman CB, Bushinsky DA. Regulation of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ by calcium in the parathyroidectomized, parathyroid hormone-replete rat. *J Bone Miner Res* 4:929-935, 1989
17. Clements MR, Johnson L, Fraser DR. A new mechanism for induced vitamin D deficiency in calcium deprivation. *Nature* 125:62-64, 1987
18. Armbrecht HJ, Boltz MA, Hodam TL. PTH increases renal 25(OH)D₃-1 α -hydroxylase (CYP1A) mRNA but not renal 1,25(OH)₂D₃ production in adult rats. *Am J Physiol* 284:F1032-F1036, 2003
19. Sneddon WB, Syme CA, Bisello A, *et al.* Activation-independent parathyroid hormone receptor internalization is regulated by NHERF1 (EBP50). *J Biol Chem* 278:43787-43796, 2003

20. Silver J, Naveh-Many T, Mayer H, Schmelzer JH, Popotzer MM. Regulation by vitamin D metabolites of parathyroid gene transcription in vivo in the rat. *J Clin Invest* 78:1296-1301, 1986
21. St. John A, Thomas MB, Cavies CP, *et al.* Determinants of intact parathyroid hormone and free 1,25-dihydroxyvitamin D levels in mild and moderate renal failure. *Nephron* 61:422-427, 1992
22. Pitts TO, Piraino BH, Mitro R, *et al.* Hyperparathyroidism and 1,25-dihydroxyvitamin D deficiency in mild, moderate, and severe renal failure. *J Clin Endocrinol Metab* 67:876-881, 1988
23. Brossard JH, Lepage R, Cardinal H, *et al.* Influence of glomerular filtration rate on non-(1-84) parathyroid hormone (PTH) detected by intact PTH assays. *Clin Chem* 46:697-703, 2000
24. D'Amour P, Brossard JH, Rousseau L, *et al.* Structure of non-(1-84) PTH fragments secreted by parathyroid glands in primary and secondary hyperparathyroidism. *Kidney Int* 68:998-1007, 2005
25. Lemay J, Demers C, Hendy GN, *et al.* Expression of the 1,25-dihydroxyvitamin D₃-24-hydroxylase gene in rat intestine: response to calcium, vitamin D₃ and calcitriol administration *in vivo*. *J Bone Mineral Res* 10:1148-1157, 1995.
26. St-Arnaud R, Messerlian S, Moir JM, *et al.* The 25-hydroxyvitamin D 1-alpha-hydroxylase gene maps to the pseudovitamin D-deficiency rickets (PDDR) disease locus. *J Bone Mineral Res* 12:1552-1559, 1997.

27. Tso JY, Sun XH, Kao TH, *et al.* Isolation and characterization of rat and human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase cDNAs: genomic complexity and molecular evolution of the gene. *Nucleic Acids Res* 13:2485-2502, 1985

TITLE AND LEGEND TO FIGURES

Figure 1

Calcemic response to various human and rat PTH preparations in PTX rats

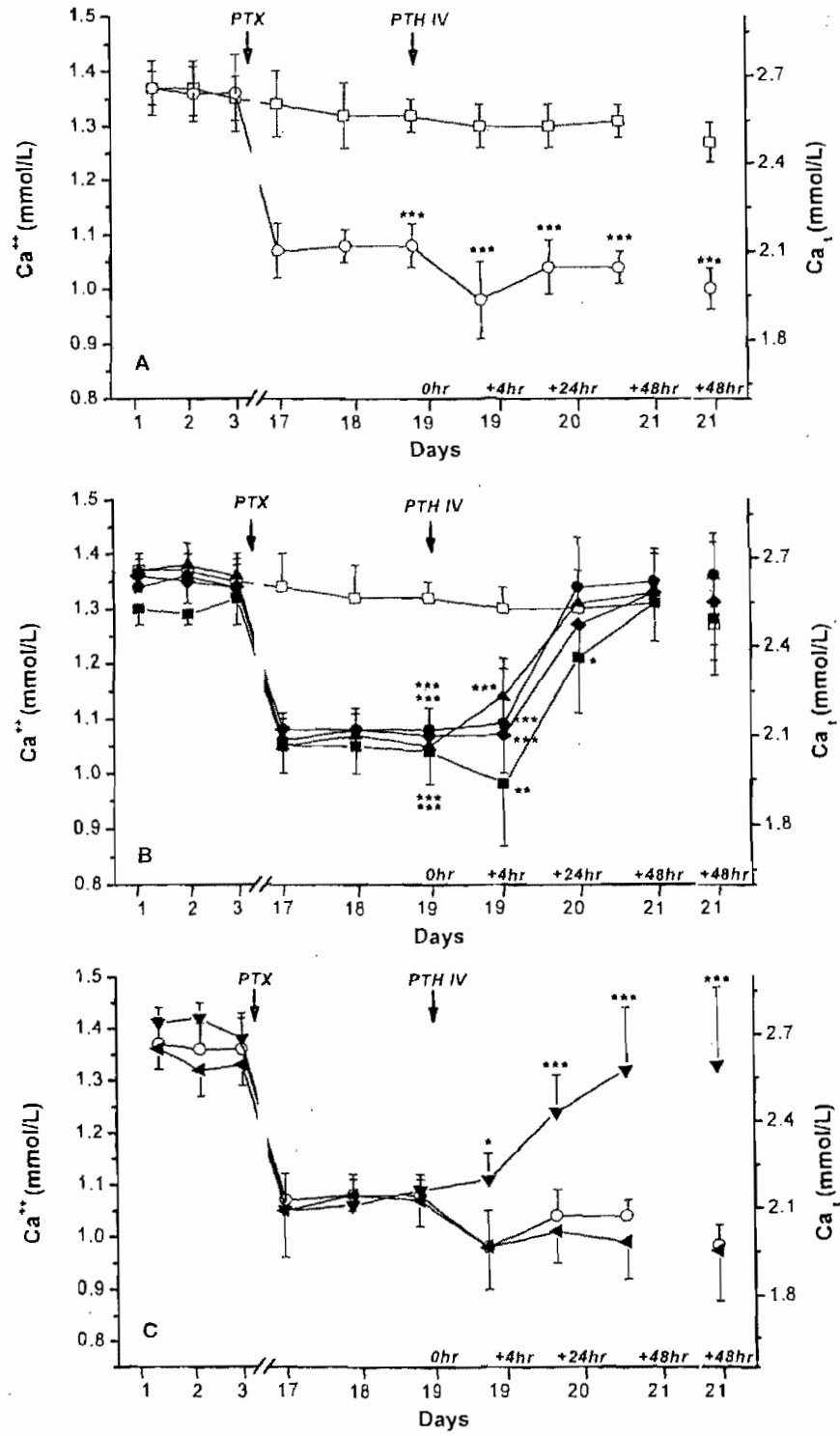
(a) Sham-solvent rats (G) are compared to PTX-solvent rats. (b) Sham-solvent rats (G) are compared to rats infused with hPTH(1-34), 0.12 nmol/kg/hr (M) hPTH(1-84), 0.24 nmol/kg/hr (▲), rPTH(1-34), 0.06 nmol/kg/hr (◆) and rPTH(1-84), 0.09 nmol/kg/hr (■). In C, PTX-solvent rats (○) are compared to rats infused with rPTH(1-34) and a mixture of rC-PTH fragments at 0.18 nmol/kg/hr (▼) or the mixture alone (▲). *, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$. Ionized calcium values (Ca^{2+}) are presented at all time points and total calcium values (Ca_t) only at 48 hr.

Figure 2

CYP27B1 and $1,25(OH)_2D$ responses to various rat PTH preparations

Response of the CYP27B1/GAPDH ratio and of $1,25(OH)_2D$ to various rPTH preparations alone or in combination. Results are means \pm s.d. Statistical analysis of log-transformed values by one-way ANOVA (analysis of variance), followed by the Student-Newman-Keuls test. (a) Different from sham-solvent ($^+$, $P < 0.05$); different from PTX-solvent (x , $P < 0.05$). (b) Different from PTX-rPTH(1-34) ($^{+++}$, $p < 0.001$); different from PTX-rPTH mixture (x , $P < 0.05$; xxx , $P < 0.001$).

FIGURE 1



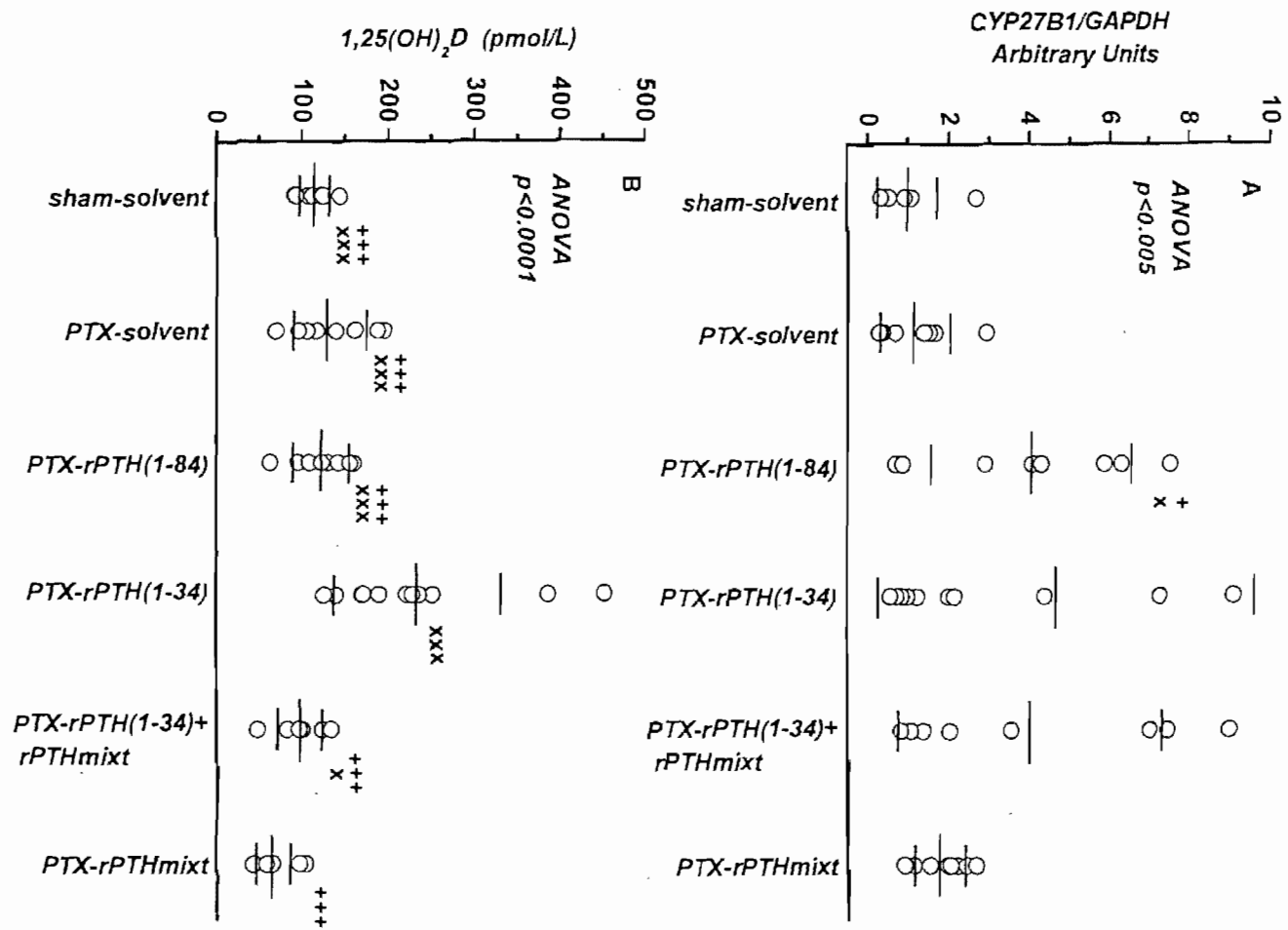


FIGURE 2

CHAPITRE V DISCUSSION GENERALE DES RESULTANTS

Cette étude a été entreprise parce qu'il était logique de penser que si les fragments C de la PTH inhibaient plusieurs effets connus de la PTH(1-84) ou (1-34), ils pourraient aussi inhiber l'effet de ces préparations sur la synthèse rénale de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. Cet effet n'a pu être démontré à date au cours des deux études in vivo pratiquées chez le rat parathyroïdectomisé avec la hPTH(1-84) ou (1-34) [Slatopolsky E, 2000; Nguyen-Yamamoto L, 2001]. Afin qu'une particularité d'espèce ne nous empêche pas de voir l'effet de la PTH sur la synthèse de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, nous avons décidé d'inclure aussi des préparations de rPTH(1-84) et (1-34) pour stimuler la synthèse de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ et des fragments C de rat pour inhiber la synthèse induite par les préparations précédentes.

Le modèle de rat parathyroïdectomisé et anesthésié pendant 4 heures que nous avons utilisé antérieurement [Nguyen-Yamamoto L, 2001] ne semblait pas adéquat pour ce projet étant donné d'une part l'anesthésie et d'autre part sa courte durée. Nous avons opté pour un modèle de rat parathyroïdectomisé avec calcémie intermédiaire maintenu par une diète normale et l'addition de 1% de gluconate de calcium dans l'eau de boisson. Nous avons de plus décidé d'administrer les préparations de PTH par voie intraveineuse au moyen d'une minipompe osmotique sur une période de 48 heures pour assurer une stimulation maximale de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. Tel qu'attendu, nos rats parathyroïdectomisés étaient hypocalcémiques, hyperphosphatémiques et avaient des niveaux de rPTH à la limite inférieure de détection ou indétectables. Cependant, leurs niveaux de $25(\text{OH})\text{D}$ et de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ demeuraient normaux. Ceci s'explique par le fait que l'hypocalcémie exerce un effet stimulant sur la synthèse de

1,25(OH)₂D indépendamment des niveaux de phosphate ou de PTH [Treschel U, 1980; Bushinsky DA, 1985; Weisinger JR, 1989].

Pour réaliser les expériences de stimulation avec les préparations de r et hPTH(1-84) et (1-34), nous avons dû procéder à des expériences préliminaires pour déterminer les doses de chaque préparation nécessaires pour normaliser la calcémie. Elles étaient de 0.24 et 0.12 nmol/kg/h pour la hPTH(1-84) et (1-34) respectivement, et de 0.09 et 0.06 nmol/kg/h pour la rPTH(1-84) et (1-34). À remarquer les doses plus élevées de PTH(1-84) nécessaires pour les deux espèces ainsi que les doses de hPTH 2 à 3 fois plus élevées pour les 2 préparations. Il a été possible de mesurer au moins la PTH(1-84) pendant ces expériences chez le rat parathyroïdectomisé infusé avec la hPTH(1-84) ou la rPTH(1-84). Avec la rPTH(1-84), le niveau sanguin atteint était similaire à celui observé chez le rat contrôle non parathyroïdectomisé. Par contre, avec la hPTH(1-84), le niveau atteint était beaucoup plus élevé, en fait 4 à 10 fois plus élevé, en partie en relation avec la dose 3 fois plus élevée infusée.

Les hPTH(1-84) et hPTH(1-34) ont eu l'effet hypercalcémiant escompté, mais n'ont eu aucun effet sur le niveau élevé de phosphate ni n'ont stimulé le niveau de 1,25(OH)₂D. En fait, on a observé une diminution des niveaux de 25(OH)D et de 1,25(OH)₂D avec ces deux préparations. Il est à noter que dans les deux études faites antérieurement chez le rat parathyroïdectomisé, la hPTH(1-84) et (1-34) avaient déclenché des effets hypophosphatémiant et hypophosphaturiant [Slatopolsky E, 2000; Nguyen-Yamamoto L, 2001] non retrouvés ici. Ceci s'explique fort

probablement par les doses minimales de hPTH(1-84) et (1-34) utilisées dans l'étude actuelle par rapport aux doses antérieures 16.5 fois (hPTH(1-84)) et 33 fois (hPTH(1-34)) plus élevées. La diminution de la 25(OH)D s'explique par une augmentation de la clairance de la 25(OH)D induite par les préparations de PTH humaine chez le rat parathyroïdectomisé [Clemens TL, 1987]. La diminution de la 1,25(OH)₂D quant à elle s'explique d'une part par l'absence d'effet des préparations humaines sur la synthèse de 1,25(OH)₂D aux doses utilisées, et par l'effet inhibiteur de l'augmentation de la calcémie induite par les mêmes préparations sur la synthèse rénale de 1,25(OH)₂D [Treschel U, 1980 ; Bushinsky DA, 1985; Weisinger JR, 1989]. Les préparations humaines en plus d'être moins puissantes que les préparations de rat démontrent des niveaux différents d'interaction pour la calcémie et la phosphatémie.

Les préparations de rPTH(1-84) et (1-34) n'ont pas quant à elles démontré de telles différences d'activité biologique. Les deux préparations se sont avérées capables de réduire l'élévation de la phosphatémie présente chez le rat parathyroïdectomisé au niveau observé chez le rat contrôle. Mais, si la rPTH(1-34) s'est avérée capable de doubler la concentration de 1,25(OH)₂D présente chez le rat parathyroïdectomisé, la rPTH(1-84) s'est avérée beaucoup moins puissante à cet égard et n'a fait que maintenir le niveau de 1,25(OH)₂D à celui du rat contrôle. Il s'agit bien néanmoins d'une stimulation si l'on tient compte des résultats obtenus avec la hPTH(1-84) et la hPTH(1-34), lesquelles ont démontré une baisse de la 1,25(OH)₂D face à l'augmentation de la calcémie en absence d'effet hormonal stimulant. Cette

différence observée entre les deux préparations de rPTH concernant la synthèse de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ pourrait s'expliquer de différentes façons. La distribution tissulaire de la rPTH(1-34) et (1-84) diffère au niveau du foie en rapport avec la présence de sites compétitifs et non compétitifs [Rouleau MF, 1986]. La formation de fragments C durant le métabolisme hépatique de la rPTH(1-84) pourrait contribuer à un effet inhibiteur de ces derniers [D'Amour P, 1979].

Pour étudier cette dernière hypothèse, nous avons infusé une mixture de fragments C de rat, à savoir 30% de rPTH(7-84) et 70% de rPTH(39-84), soit seule ou avec la rPTH(1-34) chez le rat parathyroïdectomisé. Ces deux fragments s'apparentent aux deux populations de fragments C retrouvés en circulation chez l'homme. La rPTH(7-84) s'apparente à la hPTH(7-84), le fragment principal de non(1-84) PTH détecté par les dosages d'hormone intacte [D'Amour P, 2005b]. Quant à elle, la rPTH(39-84) s'apparente aux fragments C qui n'ont pas de structure aminoterminal partiellement conservée. Ce type de fragments représente la forme principale de PTH en circulation [Gao P, 2005]. La proportion 30/70% choisie ici est arbitraire et tente de reproduire un profil circulatoire normal. Nous avons partiellement réussi si l'on considère que la quantité de rPTH(13-34) mesurée durant l'infusion combinée de rPTH(1-34) et de la mixture s'est avérée similaire à celle observée chez le rat contrôle. Nous n'avons pas mesuré les plus petits fragments. La mixture de fragments infusée seule n'a eu aucun effet sur la calcémie et la phosphatémie. Ceci diffère de nos résultats antérieurs [Nguyen-Yamamoto L, 2001] en ce qui concerne la calcémie. La non diminution du calcium s'explique par la dose beaucoup plus faible

de fragments C utilisé ici, soit 50 fois moins. Cependant, la mixture seule a diminué le niveau de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ au plus bas niveau observé dans cette étude, et a donc inhibé l'effet stimulant de l'hypocalcémie sur la synthèse de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ observé chez le rat parathyroïdectomisé. De plus, la mixture a inhibé partiellement l'effet stimulant de la rPTH(1-34) sur la synthèse de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ en ramenant le niveau de cette dernière à celui observé avec la rPTH(1-84). L'effet inhibiteur des fragments C sur la synthèse de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ s'exerce donc non seulement pour la rPTH(1-34) mais aussi pour l'hypocalcémie. Ceci s'apparente aux résultats obtenus *in vitro* concernant la résorption osseuse où les fragments C inhibaient non seulement les effets de la PTH(1-84) ou (1-34) mais aussi ceux de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, de la prostaglandine E_2 et de l'Interleukin-11 [Divieti P, 2002]. De plus, il est improbable que le tout puisse s'expliquer par l'internalisation du récepteur PTH/PTHrP de type 1 sous l'effet des fragments C décrit dans les cellules rénales [Sneddon WB, 2003] puisque plusieurs récepteurs autres que celui de la PTH sont aussi impliqués. Le récepteur C de la PTH pourrait donc être impliqué dans tous ces effets par des mécanismes à déterminer.

C'est la première fois qu'un effet inhibiteur des fragments C sur la synthèse de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ est décrit. Ceci est probablement lié au fait que dans toutes les études antérieures, *in vivo* avec rats PTX, les préparations de hPTH ont été utilisées. [Slatopolsky E 2000, Nguyen-Yamamoto L 2001, Langub MC 2003], lesquelles dans notre étude et aux doses utilisées n'ont pas d'effet stimulateur sur la synthèse de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, contrairement aux préparations de rPTH. Cet effet s'ajoute donc aux

autres effets inhibiteurs déjà décrits. Cependant, il existe une différence notable dans l'étude actuelle, les doses de rPTH utilisées ont créé des niveaux physiologiques de PTH alors que les doses utilisées dans les études antérieures se situaient davantage à des niveaux pharmacologiques [Slatopolsky E, 2000; Nguyen-Yamamoto L, 2001]. De plus, certains des effets observés antérieurement n'étaient plus présents dans l'étude actuelle. Nous en concluons donc que l'effet inhibiteur des fragments C sur la synthèse de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ pourrait être l'effet physiologique principal de ces fragments. Ceci est pertinent à la synthèse de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ dans l'insuffisance rénale. Celle-ci est réduite très tôt lorsque seulement 25% du taux de filtration glomérulaire est affecté [St. John A, 1992 ; Pitts TO, 1988]. L'accumulation des fragments C-PTH est aussi un événement précoce [Brossard JH, 2000], et probablement impliqué dans la baisse précoce de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. L'opposition des fragments carboxyl-terminaux aux effets classiques de la PTH(1-84) peut devenir très importante pour expliquer pourquoi il est très difficile de corréler l'action biologique de la PTH sur l'os en tenant compte de dosages de PTH qui ne tiennent compte que de la PTH(1-84).

CHAPITRE VI CONCLUSIONS

Comment interpréter maintenant le métabolisme phosphocalcique normal en fonction de nos résultats? Nous savons déjà que la 1,25(OH)₂D exerce un effet négatif sur la synthèse de PTH en agissant au niveau transcriptionnel [Russel J, 1986] et qu'elle favorise aussi la sécrétion de fragments C par les parathyroïdes in vitro [Hanley DA 1996] et in vivo [Cloutier M, 1997]. La PTH quant à elle exerce un effet positif sur la synthèse de 1,25(OH)₂D via la PTH(1-84) et un effet inhibiteur via les fragments C. La proportion de fragments C par rapport à la quantité de PTH(1-84) devient donc le facteur clé dans l'effet global de la PTH. Si un déficit en vitamine D s'installe, la PTH totale s'élève et le ratio fragments C/PTH(1-84) diminue [Cloutier M, 1994], stimulant la résorption osseuse et au contraire si la 1,25(OH)₂D s'élève, la PTH totale diminue et le ratio fragments C/PTH(1-84) augmente, favorisant l'absorption intestinale de calcium [Cloutier M, 1997]. On peut donc envisager que ces mécanismes ont été conçus pour maintenir une calcémie normale en favorisant soit la résorption osseuse ou l'absorption intestinale de calcium face au statut en vitamine D et à l'apport calcique [Cloutier M, 1994, 1997].

En terminant, nous n'avons pu identifier les mécanismes exacts par lequel les fragments C exercent leur effet inhibiteur mais il est logique de penser que ce sera via le récepteur C de la PTH. D'autres études seront nécessaires pour démontrer ce point lorsque le récepteur aura été cloné.

CHAPITRE VII BIBLIOGRAPHIE

1. Abou-Samra AB, Jüppner H, Force T, Freeman MW, Kong XF, Schipani E, Urena P, Richards J, Bonventre JV, Potts JT Jr, 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.
2. Albright F. The effect of vitamin D on calcium and phosphorus metabolism; studies on four patients. *J. Clin. Invest.* 17:305–315, 1938.
3. Arakawa T, D'Amour P, Sakai M, Kasumoto H, Igaki N, Goto T, Cantor T, Bukagawa M. Overproduction and secretion of a novel amino-terminal form of PTH from a severe type of parathyroid hyperplasia in uremia. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 1:525-31, 2006.
4. Bajpai S, Hamilton J. The isolation and partial characterization of bovine parathyroid secretory granules. *Bone Miner.* 9:9-22, 1990.
5. Berger U, Wilson P, McClelland RA, Colston K, Haussler MR, Pike JW, Coombes RC. Immunocytochemical detection of 1,25-dihydroxyvitamin D receptors in normal human tissues. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 67:607-13, 1988.

6. Bland R, Walker EA., Hughes SV, Stewart PM., and Hewison M. Constitutive expression of 25-hydroxyvitamin D₃-1alpha-hydroxylase in a transformed human proximal tubule cell line: evidence for direct regulation of vitamin D metabolism by calcium. *Endocrinology* 140:2027–2034, 1999.
7. Blunt JW, DeLuca HF, Schnoes HK. 25-hydroxycholecalciferol. A biologically active metabolite of vitamin D₃. *Biochemistry* 7:3317–3322, 1968.
8. 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* 21:4252-4258, 1982.
9. 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-E893, 1988
10. 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.* 122:237-245, 1989.

11. Brossard JH, Cardinal H, Roy L, Lepage R, Rousseau L, Dorais C, D'Amour P. 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.
12. 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.
13. 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.
14. Brunette MG, Chan M, Ferriere C, Roberts KD. Site of 1,25(OH)₂ vitamin D₃ synthesis in the kidney. Nature 276:287-289, 1978.
15. Burmester, J.K., Maeda, N. and DeLuca, H.F., Isolation and expression of rat 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor cDNA, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:1005-1009, 1988.

16. Bushinsky DA, Riera GS, Favus MJ, et al. Evidence that blood ionized calcium can regulate serum 1,25(OH)₂D₃ independently of parathyroid hormone and phosphorus in the rat. *J. Clin. Invest.* 76:1599-1604, 1985.
17. Carlsson A. Tracer experiments on the effect of vitamin D on the skeletal metabolism of calcium and phosphorus. *Acta Physiol. Scand.* 26:212-20, 1952.
18. Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease, *Biochemistry* 18:5294-9, 1979.
19. 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* 93:915-924, 1973.
20. Clemens TL, Garrett KP, Zhou XY, Pike JW, Haussler MR, Dempster DW. Immunocytochemical localization of the 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor in target cells. *Endocrinology* 122:1224-30, 1988.
21. 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.

22. 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.
23. Cloutier M, Gagnon Y, Brossard JH, Gascon-Barré M, 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.
24. 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.
25. 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.
26. D'Amour P, Lazure C, Labelle F. Metabolism of radioiodinated carboxyl-terminal fragments of bovine parathyroid hormone in normal and anephric rats. *Endocrinology* 117:127-134. 1985.
27. 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. *Am. J. Physiol.* 251:E680-E687, 1986.

28. D'Amour P, Palardy J, Bashali G, Mallette LE, DeLean A, Lepage R. Modulation of circulating parathyroid hormone immunoheterogeneity in man by ionized calcium concentration. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 75:525-532, 1992.
29. D'Amour P. Effects of acute and chronic hypercalcemia on parathyroid function and circulating parathyroid hormone molecular forms. *Eur. J. Endocrinol.* 148:407-410, 2002.
30. D'Amour P, Brossard JH, Rousseau L, Roy L, Gao P, Cantor T. Amino-terminal form of parathyroid hormone (PTH) with immunologic similarities to hPTH(1-84) is overproduced in primary and secondary hyperparathyroidism. *Clin. Chem.* 49:2037-2044, 2003.
31. D'Amour P, Brossard JH, R  kel A, Rousseau L, Albert C, Cantor T. Evidence that the amino-terminal composition of non-(1-84) parathyroid hormone fragments starts before position 19. *Clin. Chem.* 51:169-176, 2005a.
32. D'Amour P, Brossard JH, Rousseau L, Nguyen-Yamamoto L, Nassif E, Lazure C, Gauthier D, Lavigne JR, Zahradnik RJ. Structure of non-(1-84) PTH fragments secreted by parathyroid glands of patients in primary and secondary hyperparathyroidism. *Kidney Int.* 68:998-1007, 2005b.

33. D'Amour P, Räkel A, Brossard JH, Rousseau L, Albert C, Cantor T. Acute regulation of circulating PTH molecular forms by calcium. Utility of PTH fragments/PTH(1-84) ratios derived from 3 generations of PTH assays. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91:283-9, 2006.
34. DeLuca HF. Vitamin D-dependent calcium transport. *Soc. Gen. Physiol. Ser.* 39:159-76, 1985.
35. Divieti P, Geller I, Suliman G, Jüppner H, Bringhurst FR. Receptors specific for the carboxyl-terminal region of parathyroid hormone in bone derived cells: determinants of ligand binding and bioactivity. *Endocrinology* 146:1863-1870, 2005.
36. Divieti P, Inomata N, Chapin K, Singh R, Jüppner H, Bringhurst FR. Receptors for the carboxyl-terminal region of PTH(1-84) are highly expressed in osteocytic cells. *Endocrinology* 142:916-925, 2001.
37. Divieti P, John MR, Jüppner H, Bringhurst FR. Human PTH-(7-84) inhibits bone resorption in vitro via actions independent of the type I PTH/PTHrP receptor. *Endocrinology* 143:171-176, 2002.

38. 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.* 69:860-867, 1989.
39. 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.
40. 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.
41. Esvelt RP. Vitamin D₃ from rat skins irradiated in vitro with ultraviolet light. *Arch. Biochem. Biophys.* 188:282-6, 1978.
42. Fukase M, Birge SJ, Rifas L, Avioli LV, Chase LR. Regulation of 25 hydroxyvitamin D₃ 1-hydroxylase in serum-free monolayer culture of mouse kidney. *Endocrinology* 110:1073-1075, 1982.

43. Gao P, D'Amour P. Evolution of the parathyroid hormone (PTH) assay. Importance of circulating PTH immunoheterogeneity and of its regulation. *Clin. Lab.* 51:21-29, 2005.
44. Gao P, Scheibel A, D'Amour P, John MR, Rao SD, Schmidt-Gayk H, Cantor TL. Development of a novel immunoradiometric assay exclusively for biologically active whole parathyroid hormone 1-84: implications for improvement of accurate assessment of parathyroid function. *J. Bone Miner. Res.* 16:605-614, 2001.
45. Habener JF, Kemper B, Potts JT Jr. Calcium-dependent intracellular degradation of parathyroid hormone: a possible mechanism for regulation of hormone stores. *Endocrinology* 97:431-441, 1975.
46. 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.
47. Hanley DA, Matus S, Cheng H. Effect of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on secretion of parathyroid hormone fragments in cultured bovine parathyroid cells. *Clin. Invest. Med.* 19: (Abstract S23) 1996.

48. Hashizume Y, Waguri S, Watanabe T, Kominami E, Uchiyama Y. Cystein proteinases in rat parathyroid cells with special reference to their correlation with parathyroid hormone (PTH) in storage granules. *J. Histochem. Cytochem.* 41:273-282, 1993.
49. Henry, HL. Parathyroid hormone modulation of 25-hydroxyvitamin D3 metabolism by cultured chick kidney cells is mimicked and enhanced by forskolin. *Endocrinology* 116: 503-510, 1985
50. Hock D, Mägerle M, Heine G, Ochlich PP, Forssmann WG. Isolation and characterization of the bioactive circulating human parathyroid hormone, hPTH(1-37). *FEBS Lett.* 400:221-225, 1997.
51. Hodsman AB, Bauer DC, Dempster D, Larry D, Hanley DA, Harris ST, Kendler D, McClung MR, Miller PD, Olszynski WP, Orwoll E, Yuen CK. Parathyroid hormone and teriparatide for the treatment of osteoporosis: a review of the evidence and suggested guidelines for its use. *Endocr. Rev.* 26:688-703, 2005.
52. Holick MF. Photosynthesis of previtamin D3 in human skin and the physiologic consequences. *Science* 210:203-5,1980.

53. Hughes MR, Brumbaugh PF, Hussler MR, Wergedal JE, and Baylink DJ. Regulation of serum 1alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ by calcium and phosphate in the rat. *Science* 190:578-580, 1975.
54. Hulter HN, Halloran BP, Toto RD, et al. Long-term control of plasma calcitriol concentration in dogs and humans: dominant role of plasma calcium concentration in experimental hyperparathyroidism. *J. Clin. Invest.* 76:695-702, 1985.
55. 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.
56. Jones G, Strugnell SA, DeLuca HF. Current understanding of the molecular actions of vitamin D. *Physiological Reviews* 78:1193-31. 1998.
57. Jüppner H, Abou-Samra AB, Freeman M, Kong XF, Schipani E, Richards J, Kolakowski Hock J, Potts JT Jr, Kronenberg HM, Segre GV. A G protein-linked receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide. *Science* 254:1024-1026, 1991.
58. 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.
59. Kawane T, Mimura J, Fujii-Kuriyama Y, Horiuchi N Parathyroid hormone (PTH) suppresses rat PTH/PTH-related protein receptor gene promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 287:313-22,2001.
 60. Kronenberg HM, Bringham FR, Segre GV, Potts JT Jr. Parathyroid hormone biosynthesis and metabolism. In: *The Parathyroids*. JP Bilezikian, R Marcus and MA Levine (eds). Academic Press, chap 2:17-30, 2001.
 61. Langub MC, Monier-Faugere MC, Wang G, Williams JP, Koszewski NJ, Malluche HH. Administration of PTH(7-84) antagonizes the effects of PTH-(1-84) on bone in rats with moderate renal failure. *Endocrinology* 144:1135-1138, 2003.
 62. Lawson DE. Identification of 1,25-dihydroxycholecalciferol, a new kidney hormone controlling calcium metabolism. *Nature* 230:228-30, 1971.
 63. Lemay J, Demers C, Hendy GN, Delvin EE, Gascon-Barre M. Expression of the 1,25-dihydroxyvitamin D₃-24-hydroxylase gene in rat intestine: response to calcium, vitamin D₃ and calcitriol administration in vivo. *J. Bone Miner. Res.* 10:1148-57, 1995.

64. MacGregor RR, Jilka RL, Hamilton JW. Formation and secretion of fragments of parathormone. Identification of cleavage sites. *J. Biol. Chem.* 261:1929-1934, 1986.
65. MacGregor RR, McGregor DH, Lee SH, Hamilton JW. Structural analyzed parathyroid fragments elaborated by cells cultured from a hyperplastic human parathyroid gland. *Bone Miner.* 1:41-50, 1985.
66. 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.
67. Morrissey JJ, Hamilton JW, MacGregor RR, Cohn CV. The secretion of parathormone fragments 34-84 and 37-84 by dispersed porcine parathyroid cells. *Endocrinology* 107:164-171, 1980.
68. Murayama, A., K. Takeyama, S. Kitanaka, Y. Koderu, Y. Kawaguchi, T. Hosoya, and S. Kato. Positive and negative regulations of the renal 25-hydroxyvitamin D₃ 1alpha-hydroxylase gene by parathyroid hormone, calcitonin, and 1alpha,25(OH)₂D₃ in intact animals. *Endocrinology* 140:2224-2231, 1999.

69. Murray TM, Rao LG, Divieti P, Bringhurst FR. Parathyroid hormone secretion and action: evidence for discrete receptors for the carboxyl-terminal region and related biological actions of carboxyl-terminal ligands. *Endocr. Rev.* 26:78-113, 2005.
70. 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.* 138:367-372, 1993.
71. Nguyen-Yamamoto L, Rousseau L, Brossard JH, Lepage R, D'Amour P. Dual origin of non-(1-84) PTH detected by intact PTH assays. Role of peripheral metabolism and of parathyroid gland secretion. *Eur. J. Endocrinol.* 147:123-131, 2002.
72. Nguyen-Yamamoto L, Rousseau L, Brossard JH, Lepage R, D'Amour P. 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.

73. Nicolaysen R. Studies upon the mode of action of vitamin D. III. The influence of vitamin D on the absorption of calcium and phosphorus in the rat. *Biochem. J.* 31: 122–129, 1937.
74. Ohyama Y, Noshiro M, Okuda K. Cloning and expression of cDNA encoding 25-hydroxyvitamin D₃ 24-hydroxylase. *FEBS Lett.* 28:278:195-8, 1991.
75. Olson EB Jr, Knutson JC, Bhattacharyya MH, DeLuca HF. The effect of hepatectomy on the synthesis of 25-hydroxyvitamin D₃. *J. Clin. Invest.* 57:1213-1220, 1976.
76. Pines M, Adams AE, Stueckle S, Bessale R, Rashti-Behar V, Rosenblatt M, Suva LJ. 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.
77. Pitts TO, Piraino BH, Mitro R, *et al.* Hyperparathyroidism and 1,25-dihydroxyvitamin D deficiency in mild, moderate, and severe renal failure. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 67:876-881, 1988.
78. Ponchon G., Kennan A. L., and DeLuca H. F. “Activation” of vitamin D by the liver. *J. Clin. Invest.* 48: 2032–2037, 1969.

79. Portale A A, Halloran B P, Murphy M M, and Morris, Jr R C. Oral intake of phosphorus can determine the serum concentration of 1,25-dihydroxyvitamin D by determining its production rate in humans. *J. Clin. Invest.* 77: 7-12, 1986.
80. Räkel A, Brossard JH, Patenaude JV, Albert C, Nassif E, Cantor T, Rousseau L, D'Amour P. Overproduction of an amino-terminal form of PTH distinct from human PTH(1-84) in a case of severe primary hyperparathyroidism. Influence of medical treatment and surgery. *Clin. Endocrinol.* 62:721-727, 2005.
81. 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.
82. Ribovich ML, DeLuca HF. Effect of dietary calcium and phosphorus on intestinal calcium absorption and vitamin D metabolism. *Arch. Biochem. Biophys.* 188:145-156, 1978.
83. Ro HK, Tembe V, Favus MJ. Evidence that activation of protein kinase-C can stimulate 1,25-dihydroxyvitamin D₃ secretion by rat proximal tubules. *Endocrinology.* 131:1424-1428, 1992.

84. Rosenblatt M, Segre GV, Tregear GW, Shepard GL, Tyler GA, Potts JT Jr. Human parathyroid hormone: synthesis and chemical, biological, and immunological evaluation of the carboxyl-terminal region. *Endocrinology* 103:978-984, 1978.
85. Rosenstreich SJ. Deposition in and release of vitamin D₃ from body fat: evidence for a storage site in the rat. *J. Clin. Invest.* 50: 679-687, 1971.
86. 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.
87. Rubin MR, D'Amour P, Brossard JH, Cantor T, Bilezikian JP, Silverberg SJ. An amino-terminal molecular form of parathyroid hormone, distinct from hPTH(1-84), is overproduced in parathyroid carcinoma. *Clin. Chem.* 53:1470-1476, 2007.
88. Russell J, Lettieri D, Sherwood LM. Suppression by 1,25(OH)₂D₃ of transcription of the pre-parathyroid hormone gene. *Endocrinology* 119:2864-2866, 1986.
89. Schiavi SC, Kumar R. The phosphatonin pathway: new insights in phosphate homeostasis. *Kidney Int.* 65:1-14, 2004.

90. Segre GV, D'Amour P, Potts JT Jr. Metabolism of radioiodinated bovine parathyroid hormone in the rat. *Endocrinology* 99:1645-1652, 1976.
91. 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* 16:2417-2427, 1977.
92. 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, 1981a.
93. 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, 1981b.
94. Segre GV. Receptors for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein. *The Parathyroid. Basic and Clinical Concepts.* JP Bilezikian, R Marcus, MA Levine (eds). New York: Raven Press, chap. 14:213-229, 1994.
95. Selim A, Mahon MJ, Jüppner H, Bringhurst FR, Divieti P. Role of voltage dependent calcium channels in carboxyl-terminal parathyroid hormone receptor signalling. *J. Bone Miner. Res.* 19(suppl. 1): S194 (Abstract SA-536), 2004.

96. Setoguti T, Inoue Y, Shin M. Electron-microscopic studies on the threshold value of calcium concentration for the release of storage granules and the acceleration of their degradation in the rat parathyroid gland. *Cell Tissue Res.* 251:531-539, 1998.
97. Slatopolsky E, Finch J, Clay P, Martin D, Sicard G, Singera G, Gao P, Cantor T, Dusso A. A novel mechanism for skeletal resistance in uremia. *Kidney Int.* 58:753-761, 2000.
98. Sneddon WB, Colin AS, Bisello A, Magyar CE, Rochdi MD, Parent JL, Weinman EJ, Abou-Samra AB, Friedman PA. Activation-independent parathyroid hormone receptor internalization is regulated by NHERF1 (EBP50). *J. Biol. Chem.* 278:43787-43796, 2003.
99. Sneddon WB, Magyar CE, Willick GE, Syme CA, Galbrati F, Bisello A, Friedman PA. Ligand-selective dissociation of activation and internalization of the parathyroid hormone (PTH) receptor: conditional efficacy of PTH peptide fragments. *Endocrinology* 145:2815-2823, 2004.
100. St. John A, Thomas MB, Cavies CP, *et al.* Determinants of intact parathyroid hormone and free 1,25-dihydroxyvitamin D levels in mild and moderate renal failure. *Nephron* 61:422-427, 1992.

101. St-Arnaud R, Messerlian S, Moir JM, Omdahl JL, Glorieux FH, The 25-hydroxyvitamin D 1-alpha-hydroxylase gene maps to the pseudovitamin D-deficiency rickets (PDDR) disease locus. *J. Bone Miner. Res.* 12:1552-9, 1997.
102. St John A, Thomas MB, Davies CP, Mullan B, Dick I, Hutchison B, van der Schaff A, Prince RL. Determinants of intact parathyroid hormone and free 1,25-dihydroxyvitamin D levels in mild and moderate renal failure. *Nephron* 61:422-7, 1992.
103. 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 Miner. Res.* 9:453-458, 1994.
104. Takasu H, Baba H, Inomata N, Uchiyama Y, Kubota N, Kumaki K, Matsumoto A, Nakajima K, Kimura T, Sakakibara S, Fujita T, Chihara K, Nagai I. 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.

105. Trechsel U, Eisman JA, Fischer JA, et al. Calcium-dependent, parathyroid hormone-independent regulation of 1,25-dihydroxyvitamin D. *Am. J. Physiol.* 239:E119-E124, 1980
106. Tregear GN, van Rietschoten J, Greene E, Keutmann HT, Niall HD, Reit B, Parsons JA, Potts JT, Jr. Bovine parathyroid hormone: minimum chain length of synthetic peptide required for biological activity. *Endocrinology* 93:1349-1353, 1973.
107. Tso JY, Sun XH, Kao TH, Reece KS, Wu R. Isolation and characterization of rat and human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase cDNAs: genomic complexity and molecular evolution of the gene. *Nucleic Acids Res.* 13:2485-502, 1985.
108. 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*. *Arch. Oral. Biol.* 43:335-339, 1998.
109. Weisinger JR, Favus MJ, Langman CB, Bushinsky DA. Regulation of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ by calcium in the parathyroidectomized, parathyroid hormone-replete rat. *J. Bone Miner. Res.* 4:929-935, 1989

110. Zhang CX, Weber BV, Thammavong J, Grover TA, Wells DS. Identification of carboxyl-terminal peptide fragments of parathyroid hormone in human plasma at low-picomolar levels by mass spectrometry. *Anal. Chem.* 78:1636-43, 2006.
111. Zhang MY, Wang X, Wang JT, Compagnone NA, Mellon SH, Olson JL, Tenenhouse HS, Miller WL & Portale AA. Dietary phosphorus transcriptionally regulates 25-hydroxyvitamin D-1 alpha-hydroxylase gene expression in the proximal renal tubule. *Endocrinology* 143:587-595, 2002.
112. Zierold C, Mings JA, DeLuca HF. Regulation of 25-hydroxyvitamin D₃-24-hydroxylase mRNA by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and parathyroid hormone. *J Cell Biochem.* 88:234-7, 2003.