



**Université Lille 2**  
**Droit et Santé**

UNIVERSITE LILLE 2 DROIT ET SANTE  
**FACULTE DE MEDECINE HENRI WAREMBOURG**

Année : 2015

THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT  
DE DOCTEUR EN MEDECINE

**Corrélations phénotype-génotype concernant les mutations  
inactivatrices du récepteur sensible au calcium à propos de 118 cas**

Présentée et soutenue publiquement le 24 Juin 2015 à 16h  
au Pôle Recherche  
**Par Claire Vahé**

---

**JURY**

**Président :**

**Monsieur le Professeur Wemeau**

**Assesseurs :**

**Monsieur le Professeur Carnaille**

**Madame le Professeur Desailoud**

**Madame le Docteur Odou**

**Directeur de Thèse :**

**Madame le Professeur Vantghem**

---

## **Avertissement**

**La Faculté n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses : celles-ci sont propres à leurs auteurs.**

## Liste des abréviations

FHH : Familial Hypercalcemia hypocalciuria (Hypercalcémie Hypocalciurie Familiale)

PTH : Parathormone

DMO : Ostéodensitométrie

Ca : Calcémie

CaU : Calciurie

Creat : Créatinémie

ClCa/ClCreat : Clairance du calcium / clairance de la créatinine

CaSR : Récepteur sensible au Calcium

*CASR* : Gène du récepteur sensible au Calcium

(Ca<sup>++</sup>)<sub>i</sub> : Calcium intracellulaire

BPC : Bilan PhosphoCalcique

# Table des matières

<b>Résumé.....</b>	<b>1</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>2</b>
I. L'homéostasie calcique .....	2
II. Récepteur du calcium .....	8
III. But de notre travail .....	18
<b>Patients et méthodes .....</b>	<b>19</b>
I. Patients .....	19
II. Design de l'étude .....	20
III. Paramètres analysés .....	21
IV. Recueil des données .....	23
V. Tests statistiques .....	23
<b>Résultats .....</b>	<b>24</b>
I. Description de la cohorte .....	24
II. Ostéodensitométrie .....	26
III. Lithiases rénales .....	28
IV. Comparaison des paramètres biologiques selon la calcémie .....	29
V. Comparaison selon la présence ou non d'une mutation .....	31
VI. Comparaison phénotypique selon le génotype .....	32
<b>Discussion .....</b>	<b>39</b>
<b>Conclusion .....</b>	<b>46</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>47</b>

## RESUME

Les mutations inactivatrices du *CASR* sont susceptibles de causer un syndrome hypercalcémie hypocalciurie familiale (FHH), une hyperparathyroïdie néonatale sévère et une hyperparathyroïdie primaire. La FHH est caractérisée par une hypercalcémie modérée, une hypocalciurie, une clairance calcium/créatinine (CaCl/CrCl)  $<0,01$ , une PTH normale ou élevée. Cependant le phénotype est variable. Le but de notre travail était de comparer les phénotypes des patients porteurs ou non d'une mutation inactivatrice du *CASR*.

Les patients inclus (118 dont 86 femmes, âge médian 63 (40-77)), suivis pour une perturbation du bilan phosphocalcique non expliquée par une hyperparathyroïdie, avaient bénéficié d'un séquençage du gène *CASR* après consentement éclairé. Les patients sous diurétiques, bisphosphonates, lithium, présentant une insuffisance rénale, des anticorps anti*CASR* ou une mutation activatrice étaient exclus. Le sexe, l'âge, les lithiases rénales, l'ostéodensitométrie, la calcémie, phosphatémie, créatininémie, 25OHvitD, PTH, calciurie des 24h et CaCl/CrCl étaient comparés selon la calcémie  $<100$ , 100-105,  $>105$  mg/L et selon le génotype du *CASR*.

Les patients mutés pour le *CASR* (21) avaient une PTH plus basse (50 (32-91) vs. 83 (52-107) pg/mL) que les non mutés, sans différence de 25OHvitD (27 (21-35) vs. 23 (15-33) ng/mL), calciurie (120 (45-183) vs 123 (65-188)mg/24h) et CaCl/CrCl (0,01 (0-0,02) vs. 0,01 (0,01-0,02)). Les patients non mutés incluait 45 patients normaux pour *CASR*, 44 avec variant hétérozygote, 8 avec variant homozygote ou hétérozygote composite. La comparaison de ces 3 sous-groupes montrait aussi une différence concernant la PTH (0,0188). Une mutation du *CASR* et un variant étaient identifiés respectivement chez aucun et 53% des patients avec calcémie inférieure à 100mg/L, 14 et 50% des calcémies entre 100 et 105mg/L et 23 et 40% des calcémies  $>105$ mg/L.

Conclusion : 50% des patients avec calcémie  $<105$ mg/l présentaient un variant du *CASR* et 22% des patients avec calcémie  $>105$ mg/L avaient une mutation du *CASR*, avec une PTH plus faible, mais sans différence de calciurie ou de CaCl/CrCl, en présence d'une 25OHvitD similaire. Le rapport Calcium/PTH pourrait être un meilleur marqueur de la présence d'une mutation du *CASR* que CaCl/CrCl.

# INTRODUCTION

Le calcium est un métal bivalent, alcalino-terreux, présent en grande quantité dans le tissu osseux. C'est l'électrolyte le plus abondant de l'organisme. Il est indispensable au développement normal du squelette, et joue un rôle important à l'état ionisé dans la perméabilité cellulaire, l'excitabilité neuromusculaire et l'activation de certains systèmes enzymatiques, notamment la coagulation.

Sa régulation est très fine et passe par un acteur majeur de l'homéostasie calcique : le Récepteur sensible au Calcium (*CASR*), découvert il y a presque 20 ans.

## I. L'HOMÉOSTASIE CALCIQUE

- Répartition du calcium dans l'organisme

L'organisme contient 1 kilogramme de calcium, dont 99% se trouve dans l'os (hydroxyapatite et phosphate calcique). Les 11 grammes restants sont situés dans les tissus mous (10 grammes intracellulaire et 1 gramme extracellulaire).

### 1. Le calcium osseux

Il est présent principalement sous forme de cristal d'hydroxyapatite. Chaque jour 500 milligrammes sont échangés entre l'os et le milieu extracellulaire. L'ostéogenèse est due aux ostéoblastes qui synthétisent la trame protéique de l'os, matrice ensuite minéralisée. L'ostéolyse est due à l'action des ostéoclastes, l'hydroxyprolinurie en étant le témoin.

### 2. Le calcium intracellulaire

La pénétration intracellulaire du calcium est sous dépendance hormonale et vitaminique (PTH-VIT D).

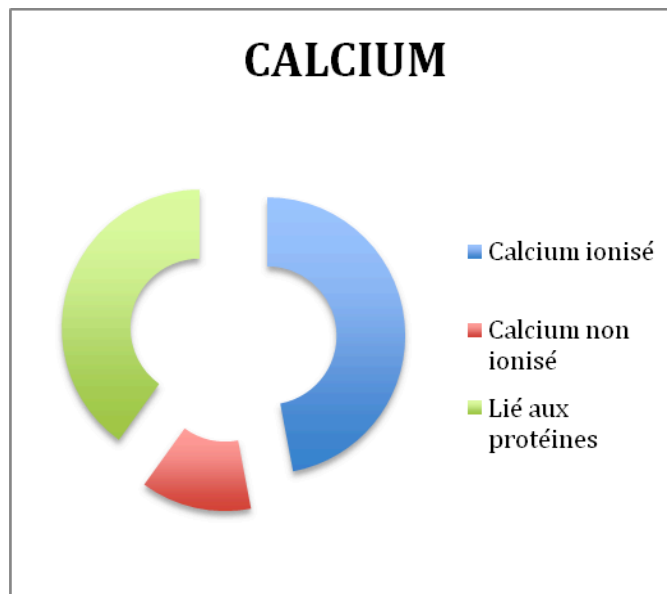
Le calcium intracellulaire joue un rôle dans la perméabilité membranaire aux ions, la libération des médiateurs chimiques dans les relais synaptiques, la contraction musculaire.

### 3. Le calcium extracellulaire

#### a) Le calcium sanguin.

Le calcium sanguin a un taux stable ; il est réparti sous 2 formes :

- le calcium ultra filtrable (60%), dont
  - 47% est ionisé (fraction biologiquement active, intervenant dans l'excitabilité neuro-musculaire et comme cofacteur dans de nombreuses réactions) et
  - 13% est non ionisé (complexé à des anions), et
- le calcium non ultra filtrable (40%), lié aux protéines et surtout à l'albumine, restant dans le compartiment vasculaire et constituant une réserve.



**Figure 1. Répartition du calcium sanguin**

Le calcium ionisé correspond donc à 50% du calcium sanguin, sauf dans 3 cas :

- L'acidose qui augmente la proportion calcium ionisé/calcium total (l'alcalose ayant l'effet inverse)
- L'hyperprotidémie qui augmente la calcémie totale mais diminue la part respective de calcium ionisé (l'hypoprotidémie exerçant l'effet inverse)
- L'hyperphosphorémie qui diminue le calcium ionisé et augmente la proportion du calcium complexé

b) Le calcium des autres liquides extracellulaires. Le taux de calcium dans les espaces interstitiels est de 60 mg/L et celui des autres liquides (LCR, LYMPHE) inférieur à celui du sang.

- Le bilan calcique

Les apports et les besoins sont variables selon les individus, environ 1 gramme/24H chez l'adulte. Les besoins sont augmentés lors de la grossesse, de l'allaitement et de la croissance. Le taux d'absorption intestinale du calcium varie de 30 à 50% et est dépendant du 1,25dihydrocholécalférol ou vitamine D3. L'absorption s'effectue dans le duodénum et le jéjunum sous forme de calcium ionisé. Les pertes sont de 3 types : fécales (400-500mg /24h), urinaires (100-250mg/24h) et sudorales (50-100mg/24h).

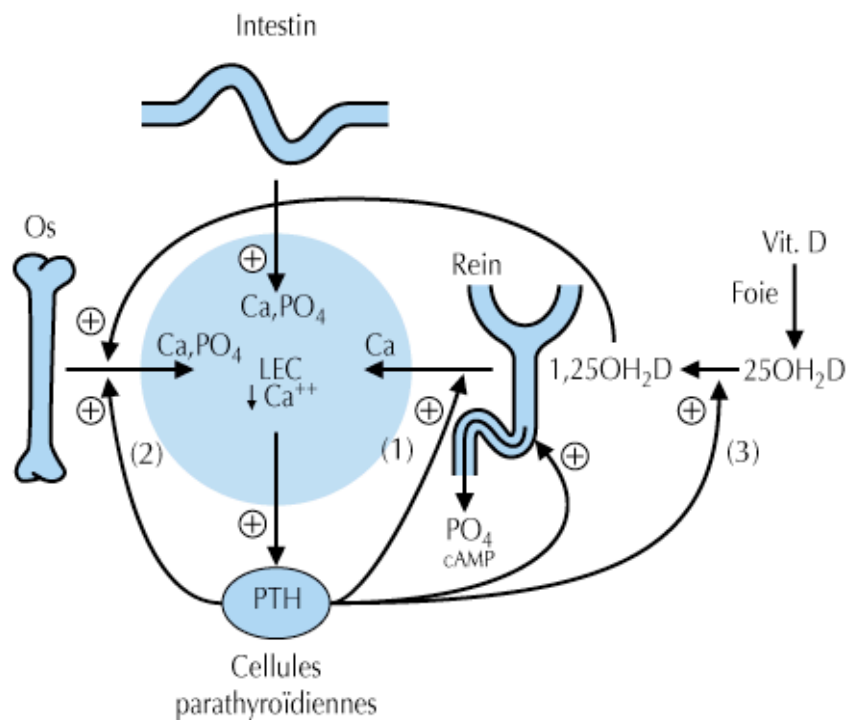
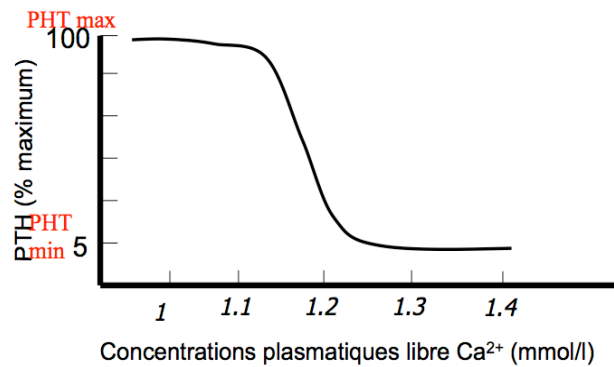
- Régulation du calcium

La régulation dépend de 3 principales hormones : parathormone (PTH), 1,25dihydrocholecalciférol (calcitriol), calcitonine.

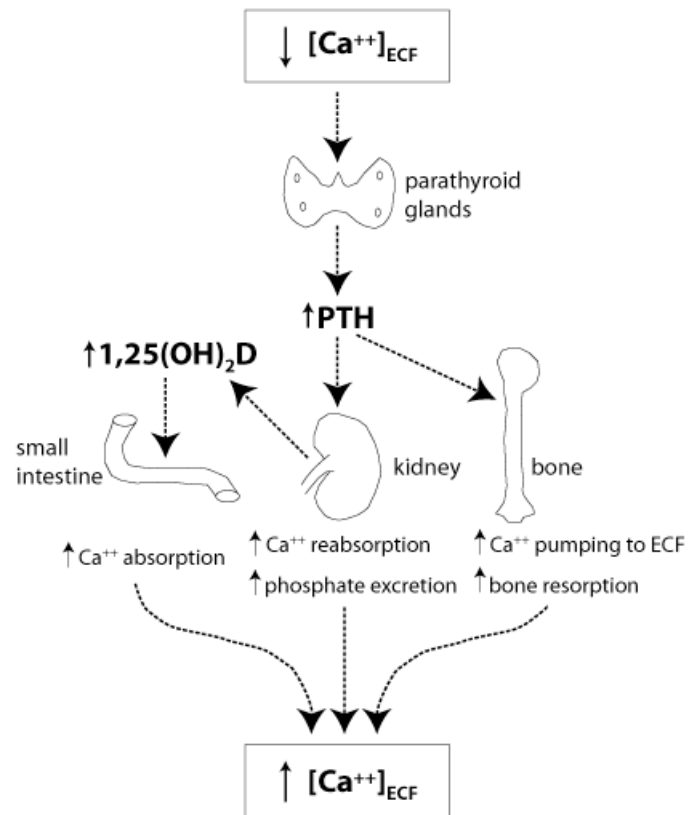
### 1. . Parathormone

La PTH une hormone polypeptidique hypercalcémiant sécrétée par les cellules principales des parathyroïdes. Elle stimule la résorption osseuse par les ostéoclastes. Elle se fixe sur un récepteur membranaire, favorisant l'entrée de calcium dans la cellule et activant l'adénylcyclase (d'où formation d'AMP cyclique et inhibition de l'entrée du calcium dans la mitochondrie). De plus, elle augmente la réabsorption du calcium au niveau du tubule distal et elle diminue la réabsorption du phosphore. Elle stimule au niveau intestinal une 1alphahydroxylase rénale et transforme le calcidiol en calcitriol augmentant indirectement l'absorption intestinale de calcium. La sécrétion de PTH est corrélée de manière négative avec la concentration sérique du calcium ionisé, par le biais de récepteurs membranaires sensible au calcium (65). Il existe une relation sigmoïde entre la calcémie et la libération de PTH, ce qui explique que pour de faibles variations de la calcémie, il existe une libération rapide et ample de PTH. Cette perception du calcium extracellulaire se fait par l'intermédiaire du CaSR (Calcium Sensing Receptor).





**Figure 1.** Principales hormones et tissus impliqués dans la régulation de la calcémie. La diminution du calcium ionisé extracellulaire (LEC Ca<sup>2+</sup>) augmente la sécrétion de PTH par les cellules parathyroïdiennes. La PTH stimule (1) la réabsorption rénale de calcium, (2) la résorption osseuse et (3) l'alpha-hydroxylation de la vitamine D qui accroît l'absorption digestive de calcium.



**Figure 2. Régulation du calcium (1)**

## 2. . Le calcitriol

Le calcitriol est un métabolite actif formé après transformation du déhydrocholestérol en cholécalférol (vitamine D3) au niveau de la peau grâce aux rayons UV, puis la vitamine D3 est transformée en 25(OH) vitD3 (calcidiol) par une 25hydroxylase hépatique et enfin la 25(OH) vitD3 est transformée en 1,25(OH)<sub>2</sub>vitD3 (calcitriol) par une 1alphahydroxylase rénale stimulée par la PTH et l'hypocalcémie.

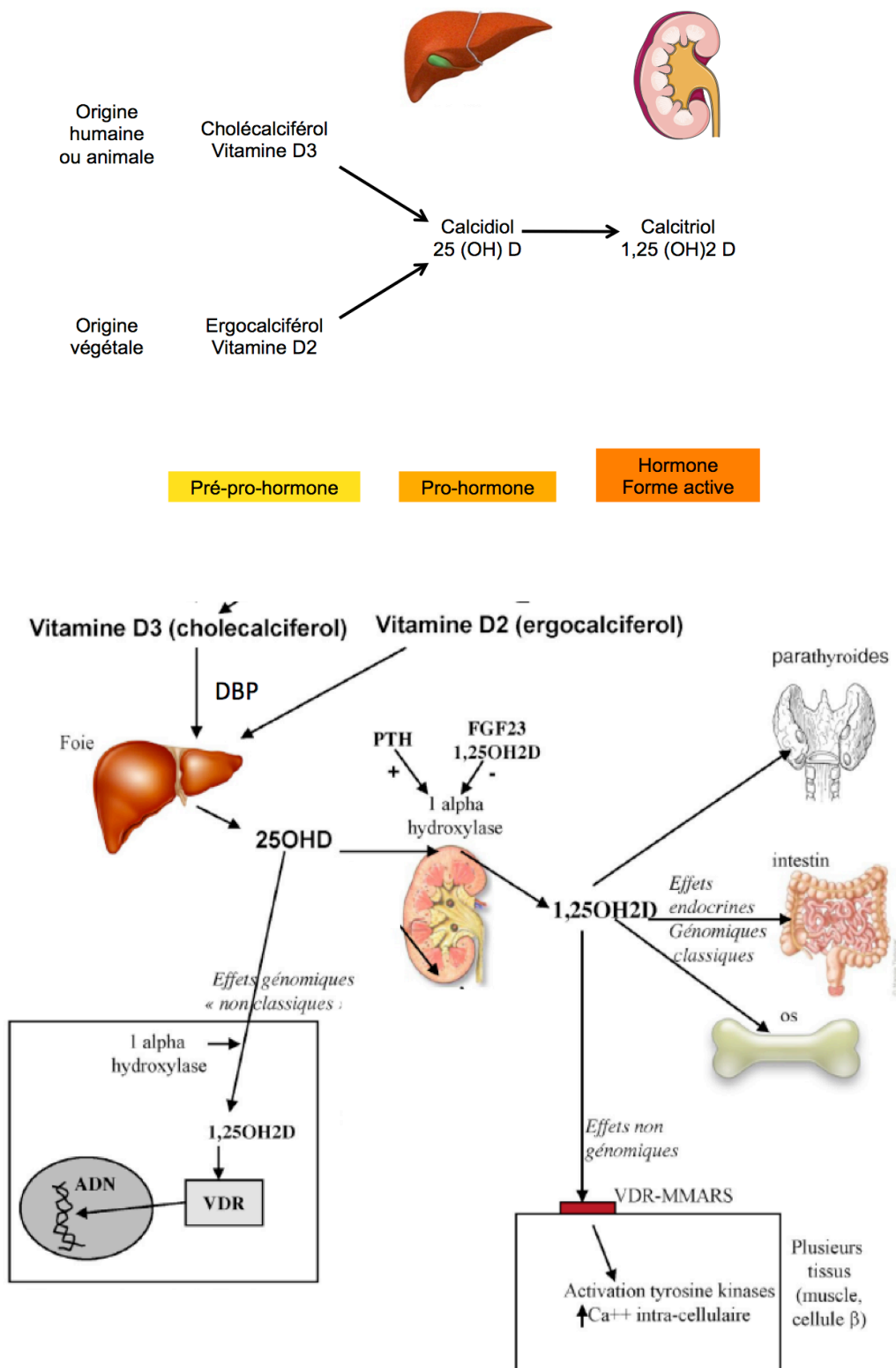


Figure 3. Action du calcitriol (2)

Le calcitriol a

- une action intestinale en augmentant en fonction des besoins l'absorption intestinale de calcium et du phosphore,
- une action osseuse en stimulant la résorption osseuse ostéoclastique et
- une action rénale en favorisant la réabsorption du calcium par le tubule distal et en augmentant la  $\text{tmPO}_4$ .

La PTH stimule la production de calcitriol et l'hypocalcémie entraîne une augmentation de sa production directement et indirectement par la PTH.

### 3. La calcitonine

La calcitonine est un polypeptide sécrété par les cellules claires des parafollicules thyroïdiens, seule hormone hypocalcémiante. Elle a une action sur l'os en inhibant la résorption osseuse ostéoclastique et en transformant les ostéocytes en ostéoblastes, induisant ainsi une fixation du calcium sur l'os. Elle a également une action rénale en diminuant la réabsorption tubulaire du calcium. Sa régulation se fait en fonction de la calcémie. Cette fonction hypocalcémiante de la calcitonine est modeste chez l'Homme et n'a été vérifiée que chez les cartilagineux (comme le saumon). Elle a cependant été utilisée dans le traitement des hypercalcémies modérées.

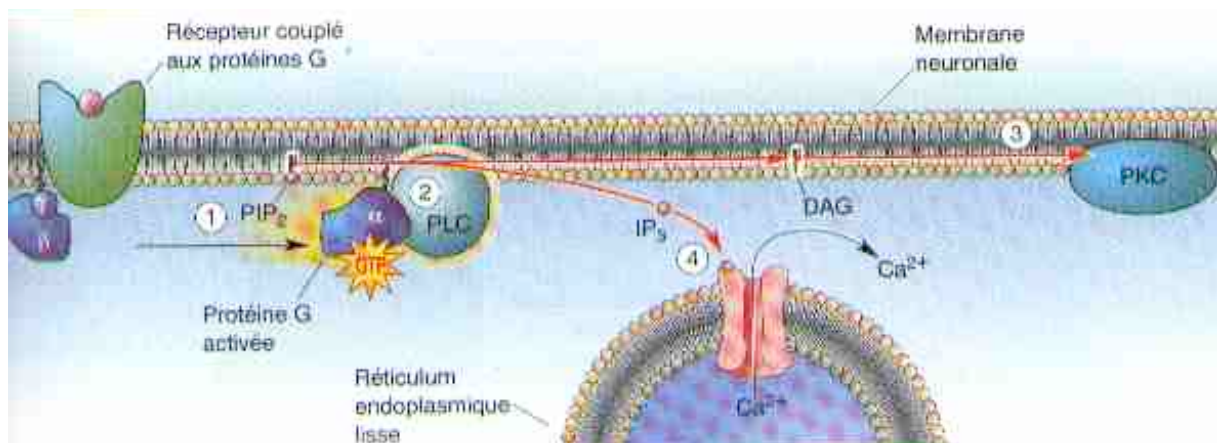
## II. LE RECEPTEUR DU CALCIUM

- CASR (Récepteur Sensible au Calcium)

Le gène du *CASR* a été cloné pour la première fois en 1993 (3) (4).

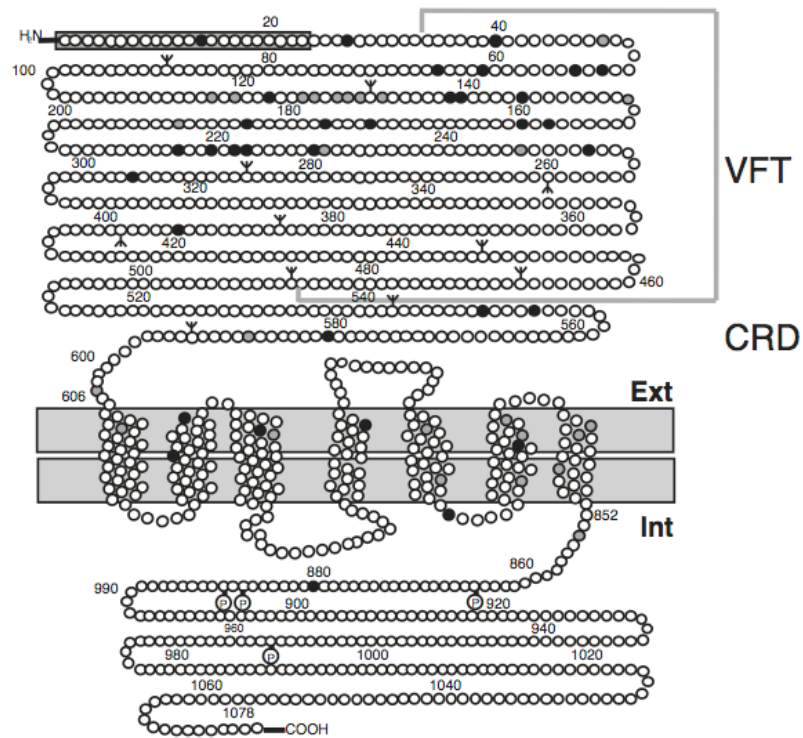
Le gène du *CASR* est localisé en 3q21-24. Il est composé de 7 exons, dont seuls les 6 derniers codent pour le récepteur. Ce récepteur fait partie de la famille des récepteurs couplés aux protéines G. Le CaSR est constitué de 1078 acides aminés (aa). Structurellement, ces récepteurs s'expriment toujours sous forme de dimères (d'homodimères dans le cas du CaSR). Chaque monomère se caractérise par un grand domaine extracellulaire N-terminal (612 aa), relié à une partie composée de 7 domaines

transmembranaires (250 aa) (5) (6). Les domaines transmembranaires sont impliqués dans l'interaction avec les protéines G et donc dans la transmission de l'information vers l'espace cytosolique. L'extrémité cytosolique C-terminale (216 aa) du CaSR possède 5 sites de phosphorylation par les protéine kinases C (PKC) et 2 sites de phosphorylation par les protéine kinases A. Il existe 93% d'homologie entre les CaSR humains, bovins et de souris (7) (8) (9). Le récepteur du calcium perçoit la concentration du calcium dans le milieu extracellulaire et répond aux variations de cette concentration, exerçant ainsi un rôle majeur dans le contrôle du métabolisme du calcium extracellulaire (10). La liaison du ligand au CaSR a pour conséquence la stimulation de la protéine G dépendante (par l'intermédiaire de Galphaq/11-) de l'activité de la phospholipase C. Elle détermine une accumulation de l'inositol 1.4.5-triphosphate (IP<sub>3</sub>) et la libération rapide des ions de calcium (Ca<sup>++</sup>)<sub>i</sub> de leurs sites de stockage intracellulaire, suivie d'un influx des ions de calcium extracellulaires (Ca<sup>++</sup>). L'augmentation du (Ca<sup>++</sup>)<sub>i</sub> a pour conséquence l'activation de la protéine kinase C (PKC), qui active en retour la voie de la mitogene-activated protein kinase (MAPK). Le CaSR active également la voie MAP kinase par l'intermédiaire d'une isoforme de G<sub>i</sub> (protéine G ayant une sous-unité α<sub>i</sub>, présentant plusieurs isoformes) qui inhibe l'adénylate cyclase et active la famille des *Src tyrosine kinases*.



**Figure 4: L'activation de la protéine G stimule la phospholipase C (PLC), enzyme membranaire qui agit au niveau des phospholipides. La PLC transforme le PIP<sub>2</sub> (Phosphatidyl-inositol 4,5 biphosphate) en DAG (diacyl glycérol) et IP<sub>3</sub> (Inositol 2, 4, 5 triphosphate). Le DAG stimule la protéine kinase C (PKC). L'IP<sub>3</sub> agit au niveau des compartiments de stockage intracellulaire de calcium pour libérer le calcium. Le calcium agit à son tour sur différentes enzymes (11).**

La concentration extracellulaire de calcium libre (ionisé) est un paramètre étroitement régulé : elle est normalement comprise entre 2,10 et 2,50 mmol/L (84-100mg/L) dans un groupe de sujets normaux, mais chez un individu donné, elle ne varie jamais de plus de 5 % autour de sa valeur d'équilibre.



**Figure 5. Le récepteur du calcium (12)**

Le contrôle à court terme de la calcémie fait essentiellement intervenir une hormone peptidique, l'hormone parathyroïdienne (PTH) : son bref délai d'action sur le tubule rénal et l'os autorise une correction rapide de tout écart de la calcémie à sa valeur d'équilibre (13). En situation aiguë, la sécrétion de PTH apparaît donc être le déterminant primordial de la calcémie qui est, elle même, le déterminant principal de la sécrétion de PTH. La calcémie affecte un grand nombre d'autres fonctions cellulaires, en particulier dans le rein mais également dans la thyroïde (cellules C), les ostéoclastes et les ostéoblastes, le tube digestif.

- Localisation et action du CaSR

1. Tissus participant à l'homéostasie calcique

- Parathyroïdes (cellules principales) : L'hypocalcémie stimule production de PTH
- Thyroïde (cellules C) : L'hypocalcémie diminue la calcitonine et la gastrine/acidité gastrique,
- Rein (dans tous les segments) : L'hypocalcémie favorise la réabsorption du calcium par le tube contourné distal (diminue la calciurie) et augmente l'excrétion du phosphore par le tube contourné proximal
- Os (ostéoblastes et clastes) : L'hypocalcémie favorise la libération de calcium par les ostéoclastes et leur différenciation + inhibe la différenciation/prolifération des ostéoblastes
- Intestin : absorption du calcium

2. Tissus ne participant pas à l'homéostasie calcique

- Fibroblastes et kératinocytes
- Cellules épithéliales ovariennes, Cellules G gastriques
- Cellules hypophysaires somatotropes et corticotropes,
- Cellules placentaires, Cellules hématopoïétiques,
- Système nerveux central
- Cellules entéroendocrines, adipocytes, cellules myocardiques (A)

Type cellulaire	Action
Cellules principales parathyroïdiennes	Réduction de libération et de synthèse de PTH
Cellules C thyroïdiennes	Augmentation de libération et de synthèse de calcitonine
Tubule rénal	Diminution de réabsorption de calcium
Ostéoblastes, ostéoclastes	Action inconnue
Fibroblastes	Action inconnue
Système nerveux central	Action inconnue
Cellules G gastriques	Action inconnue
Cellules épithéliales ovariennes	Action inconnue
Cellules ovariennes, placentaires	Action inconnue
Cellules hématopoïétiques	Action inconnue
Cellules hypophysaires à GH, ACTH	Action inconnue

**Figure 6 : Fonctions tissulaires du CaSR (14)**

- Hypercalcémie familiale bénigne (hypercalcémie hypocalciurie familiale, syndrome de Marx-Auerbach)

#### 1. Définition

L'hypercalcémie familiale bénigne est une maladie autosomique dominante avec un haut degré de pénétrance, décrite pour la première fois en 1966 (15). Elle est caractérisée par une hypercalcémie le plus souvent asymptomatique qui dure toute la vie, associée à une excrétion rénale de calcium comparativement basse. Elle est principalement due à une mutation inactivatrice du récepteur du calcium (16). La mutation du gène du *CASR* rend celui-ci moins sensible à la calcémie et diminue son effet inhibiteur sur la sécrétion de PTH au niveau des parathyroïdes, ainsi que sur la réabsorption du calcium au niveau rénal. Les cellules perçoivent donc un niveau de calcémie plus bas qu'elles ne le devraient et répondent en conséquence. Une fois ce seuil dépassé, la moindre variation de la calcémie aura les mêmes conséquences que sur le récepteur normal.



Typiquement, la concentration circulante de parathormone est normale, inappropriée à l'hypercalcémie, et la magnésémie est modérément élevée ou dans les valeurs hautes de la normale. Néanmoins, la concentration de PTH est élevée chez 20 % des sujets rendant alors le diagnostic différentiel avec une hyperparathyroïdie primitive plus délicat, surtout s'il existe une carence en vitamine D susceptible de majorer l'hyperparathormonémie. Les seuls symptômes parfois observés sont une pancréatite (17) (18) (19) (20) (21), une chondrocalcinose (22). La calciurie est basse ou normale, mais jamais aussi élevée qu'on pourrait l'attendre compte tenu de la valeur de la calcémie. Cette hypocalciurie (relative ou absolue) se traduit biologiquement par une excrétion fractionnelle du calcium inférieure à 1 % (clairance calcium/créatinine :  $[(\text{Calciurie 24 h (mmol/L)} \times \text{Volume urinaire 24 h (L)}) / (\text{Calcémie (mmol/L)} \times (\text{Créatininémie (mmol/L)} / (\text{Créatininurie 24 h (mmol/L)} \times \text{Volume urinaire 24 h (L)})))]$ ). Elle est indépendante de la présence de la PTH, puisqu'elle persiste chez les sujets ayant eu une parathyroïdectomie totale. Il n'y a en principe pas d'augmentation du volume parathyroïdien (23), bien que cela ait été décrit.

**Tableau 1 : 6 études reliant mutation du *CASR* et augmentation du volume parathyroïdien**

<b>Auteur, publication, année</b>	<b>Nombre cas</b>	<b>Parathyroïdes</b>	<b>Nombre mutés</b>
<b>Catani F, J Bone Miner Res, 1999 (24)</b>	20	20 adénomes parathyroïdiens	0
<b>Burski, JCEM 2002 (25)</b>	1	Adénome parathyroïdien	1
<b>Brachet, JCEM 2009 (26)</b>	1	Adénome parathyroïdien	1
<b>Yabuta T, Asian J.Surg 2009 (27)</b>	1	Adénome parathyroïdien	1
<b>Frank-Raue, Clin. Endocrinol. 2011 (28)</b>	139	4 adénomes parathyroïdiens	8
<b>Eldeiry, Endocr. Pract. 2012 (29)</b>	2	Adénomes parathyroïdiens	2
<b>Forde, BMJ Case rep. 2014 (30)</b>	1	Adénome parathyroïdien	1

En effet, dans une étude réalisée en 2011 en Allemagne (28), la mutation a été recherchée chez 139 patients présentant une hypercalcémie et suspects d'avoir une hyperparathyroïdie primaire. Sur 8 patients atteints de 6 mutations différentes du gène du *CASR*, 4 avaient été opérés d'hyperparathyroïdie, et chez chacun d'entre eux un adénome parathyroïdien a été confirmé histologiquement ; chez tous ces patients la calcémie a diminué en postopératoire jusqu'à devenir normale chez 3 d'entre eux.

De plus, a été publié en 2002 le cas d'une patiente présentant une hypercalcémie sévère persistante sans réels symptômes. Une mutation du *CASR* a été identifiée, ainsi qu'un adénome parathyroïdien coexistant. Après parathyroïdectomie, il persistait une hypercalcémie modérée. Ceci était donc un cas où 2 pathologies endocriniennes coexistaient (25).

Dans une étude parue en 1999, l'étude du *CASR* par séquençage direct sur 20 pièces opératoires correspondant à un adénome parathyroïdien n'a mis en évidence aucune mutation. Cette étude concluait qu'une mutation somatique du gène du *CASR* ne jouait pas de rôle majeur dans l'apparition d'adénomes parathyroïdiens sporadiques (24).

Cependant il existe une baisse de l'expression parathyroïdienne du *CASR* dans les hyperparathyroïdies primaires et secondaires dont l'importance est corrélée au pouvoir de prolifération du tissu. La conséquence de cette baisse d'expression du *CASR* est une élévation du seuil de régulation calcique de la PTH à un même niveau. Ce serait donc le degré d'expression du *CASR* qui serait abaissé, la transduction du signal du *CASR* s'avérant normale (31).

Il n'a pas été montré de lien entre carcinome parathyroïdien et mutation du *CASR*.

## 2. Génotype

Une mutation inactivatrice présente à l'état hétérozygote engendre un syndrome d'hypercalcémie hypocalciurie familial, tandis qu'à l'état homozygote elle engendre une hypercalcémie néonatale sévère, avec engagement du pronostic vital. Il existe cependant quelques cas décrits dans la littérature (32) (33) (34), comme celui d'une jeune fille de 16 ans présentant une mutation inactivatrice du récepteur du calcium à l'état homozygote avec un phénotype d'hypercalcémie familiale bénigne masqué par une carence en vitamine D jusque là (35).

### 3. Causes du syndrome d'hypercalcémie-hypocalciurie

#### **-FHH1:**

L'hypercalcémie hypocalciurie familiale de type 1 correspond à des mutations inactivatrices du gène du *CASR*, dont la signalisation passe par une sous-unité de protéine G  $\alpha_{11}$  ( $G\alpha_{11}$ ), entraînant une réduction de la sensibilité des cellules parathyroïdiennes et rénales au calcium. Les FFH1 représentent 65% des FFH. 64 mutations ont été identifiées dont 17 récurrentes. La majorité de ces mutations, situées dans les exons 3, 4 et 7, concerne la portion extracellulaire du récepteur. De nombreuses mutations ont été découvertes ces dernières années (36) (37). La transmission se fait sur un mode autosomique dominant.

Aucune différence de phénotype n'a été identifiée. Seul le site R227 pourrait être le siège d'une relation génotype/phénotype. A l'état hétérozygote, la mutation R227Q, moins inactivatrice in vitro est responsable d'une HHF, alors que R227L est plus inactivatrice et responsable d'hyperparathyroïdie néonatale (38).

#### **-FHH2:**

L'hypercalcémie hypocalciurie familiale de type 2 correspond à une mutation de *GNA11* codant pour  $G\alpha_{11}$  (situé sur le chromosome 19p13.3). Elle représente 10% des FFH.

*GNA11* a 7 exons codants qui englobent une sous-unité alpha d'une protéine G. Les patients avec un défaut de cette protéine ont une diminution de la sensibilité au calcium extracellulaire. Il existe une hypocalciurie importante. La transmission est autosomique dominante.

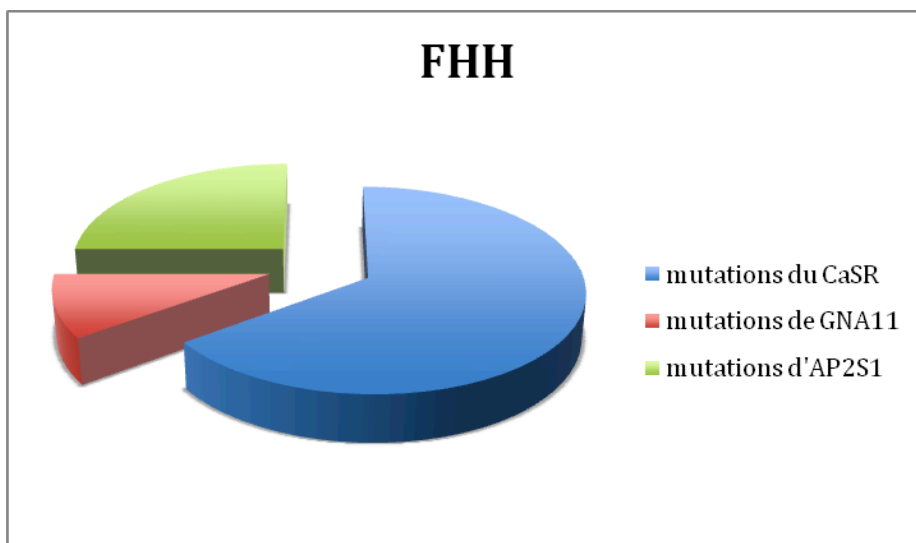
#### **-FHH3:**

L'hypercalcémie hypocalciurie de type 3 résulte de mutations d'*AP2S1* (Arg15) (situé sur le chromosome 19q13.3).

- Mutation de l'*Adaptor protein complex 2 sub-unit sigma* altérant l'endocytose du *CASR*.
- Il existe une élévation de la PTH avec l'âge, une hypophosphorémie et une ostéomalacie.
- L'AP2 est un hétérotétramère de sous-unités  $\alpha, \beta, \mu$  et  $\sigma$ , liant la clathrine à la

membrane des vésicules. Les mutations d'*AP2 sigma subunit* diminuent la sensibilité des cellules exprimant le CaSR au calcium extracellulaire et réduit l'endocytose du *CASR*, en raison d'une perte d'interaction avec l'extrémité C-terminale (dileucine), ce qui diminue la signalisation intracellulaire.

– Un travail récent du JCEM (39) a étudié la prévalence des mutations du gène *AP2S1* et le phénotype de la FHH3 dans une cohorte avec hypercalcémie hypocalciurie familiale sans mutation du *CASR*. Cinq des 39 patients avaient une mutation (p.R15) de *AP2S1* et le phénotype ne différait pas de FHH1.



**Figure 8. Cause du syndrome d'hypercalcémie hypocalciurie familiale**

On note que l'hypercalcémie hypocalciurie induite par des anticorps anti-*CASR* peut mimer ce tableau clinique. Il n'existe en revanche pas d'antécédents familiaux d'hypercalcémie, mais on trouve fréquemment une association à d'autres maladies auto-immunes. Aucune mutation du *CASR* n'est alors identifiée, mais des anticorps bloquants le *CASR* sont trouvés.

- Polymorphisme du gène du *CASR*

- Un polymorphisme du *CASR* est identifié chez 50 à 70% des patients hypercalcémiques.
- Les polymorphismes A986S mais aussi R990G et Q1011E sont associés à une calcémie plus élevée.
- La répartition des polymorphismes diffère selon les populations (40).
- Le polymorphisme A986S s'avère être corrélé au niveau de la calcémie qui est plus élevé tout en restant dans les limites de la normale, selon Cole dans une étude parue en 2001 qui portait sur 387 femmes saines. Il existait une fréquence de 15% de polymorphisme A986S. La calcémie était significativement plus haute chez ces patientes que chez les patientes non porteuses d'un variant

( $p=0,0001$ ) (41).

- Dans une méta-analyse publiée en 2011 (42), et portant sur 2820 patients, les patients avec un polymorphisme A986S avaient une calcémie significativement plus élevée que les patients sans anomalie génétique. Il n'y avait pas de différence significative concernant le taux de PTH.

- Il existe une association hypercalciurie et polymorphisme Arg990gly (43) (44).

Dans une étude parue en 2007 (45), les femmes porteuses du variant R990G avaient un risque significativement accru d'avoir une excrétion de calcium plus importante par rapport aux femmes non porteuses. La calciurie était plus importante en cas de présence de R990G à l'état hétérozygote (7.3 mmol/24h, soit 280 mg/24h) et à l'état homozygote (10,7 mmol/24h, soit 428 mg/24h) qu'en cas d'absence de ce polymorphisme (5.8 mmol/24h, soit 232 mg/24h) ( $p=0.005$ ).

- L'intervention du polymorphisme A986S dans la détermination de la densité osseuse n'est pas certaine, mais il serait plus fréquent chez les femmes ménopausées ostéoporotiques (46) sans qu'aucune relation avec la densité minérale osseuse n'ait été relevée chez les femmes jeunes (47). La prévalence des fractures chez les patients atteints d'hyperparathyroïdie primaire serait accrue en cas de polymorphisme A986S ( $p<0.05$ ) (48).

- Le polymorphisme R990G semble associé à un risque plus élevé d'hypertriglycéridémie et pourrait être un prédicteur génétique potentiel d'hypertriglycéridémie. Par ailleurs il a été montré que l'hypercalciurie augmente avec l'hyperinsulinisme, ce qui pourrait constituer un biais (49).

Dans une étude chinoise (50), 972 sujets avec hypertriglycéridémie et 1197 sujets sans étaient inclus. Il n'y avait pas de différence significative de prévalence des variants A986S et Q1011E entre les 2 groupes. Il existait significativement plus de variants R990G dans le groupe avec hypertriglycéridémie. Le variant R990G était significativement plus fréquent chez les patients obèses dans le groupe hypertriglycéridémie que dans le groupe sans hypertriglycéridémie.

- Une étude publiée en 2001 par une équipe japonaise portant sur 105 patients atteints d'hyperparathyroïdie primaire mettait en évidence pour la première fois un lien entre la présence du polymorphisme R990G et la sévérité de l'hyperparathyroïdie primaire (51), et une autre étude parue en 2000 et portant sur 122 japonais dialysés montrait une relation avec l'hyperparathyroïdie secondaire de l'insuffisance rénale (52).

- Une étude parue en Octobre 2013 montrait une prévalence plus importante du polymorphisme R990G chez les patients avec hyperparathyroïdie primaire dans une population chinoise comportant 164 personnes atteintes d'hyperparathyroïdie primaire et 230 témoins (53).

### **III. BUT DU TRAVAIL**

De nouvelles mutations inactivatrices du gène du *CASR* ont été découvertes récemment.

La principale difficulté tient au diagnostic différentiel entre un syndrome hypercalcémie-hypocalciurie dont 20% ont une PTH accrue, avec les 10 % des hyperparathyroïdies à PTH normale (54).

Le phénotype des patients mutés est variable (55). Compte-tenu de ces avancées récentes, il paraissait utile d'analyser rétrospectivement une cohorte de patients présentant un profil biologique compatible avec un syndrome hypercalcémie-hypocalciurie afin de confirmer les éléments biologiques les plus prédictifs d'une mutation devant une hypercalcémie atypique et d'identifier d'éventuelles corrélations génotype/phénotype.

L'objectif principal était de comparer le génotype des patients selon leur niveau de calcémie.

L'objectif secondaire était de comparer le phénotype des patients selon leur génotype.

## PATIENTS ET METHODES

### I. PATIENTS

L'étude du *CASR* a été réalisée chez 165 patients dans 3 centres (Amiens 30, Nîmes 2, Lille 133). L'étude était rétrospective multicentrique. Le critère d'inclusion était la recherche d'une mutation du gène du récepteur du calcium au laboratoire d'oncogénétique du CHRU de Lille. Cette recherche était effectuée chez des patients ayant eu un trouble du métabolisme phosphocalcique non expliqué par une authentique hyperparathyroïdie primaire. Treize patients ont été exclus des analyses statistiques : il s'agissait des patients témoins du service de pneumologie, chez qui il n'existait pas d'antécédent d'anomalie du bilan phosphocalcique mais qui avaient eu une analyse du *CASR* en raison d'un apparenté ayant une mutation de l'alpha1antitrypsine. Trente-quatre patients ont été secondairement exclus pour les raisons suivantes : hypocalcémie et mutation activatrice du récepteur du *CASR* (n=11), insuffisance rénale définie par une créatininémie supérieure à 15 mg/L (n=4), traitement par lithium, bisphosphonates ou diurétiques (n=1), patients avec anticorps anti*CASR*, données d'anamnèse insuffisantes (n=13), hyperparathyroïdie opérée quel que soit le génotype (n=5).

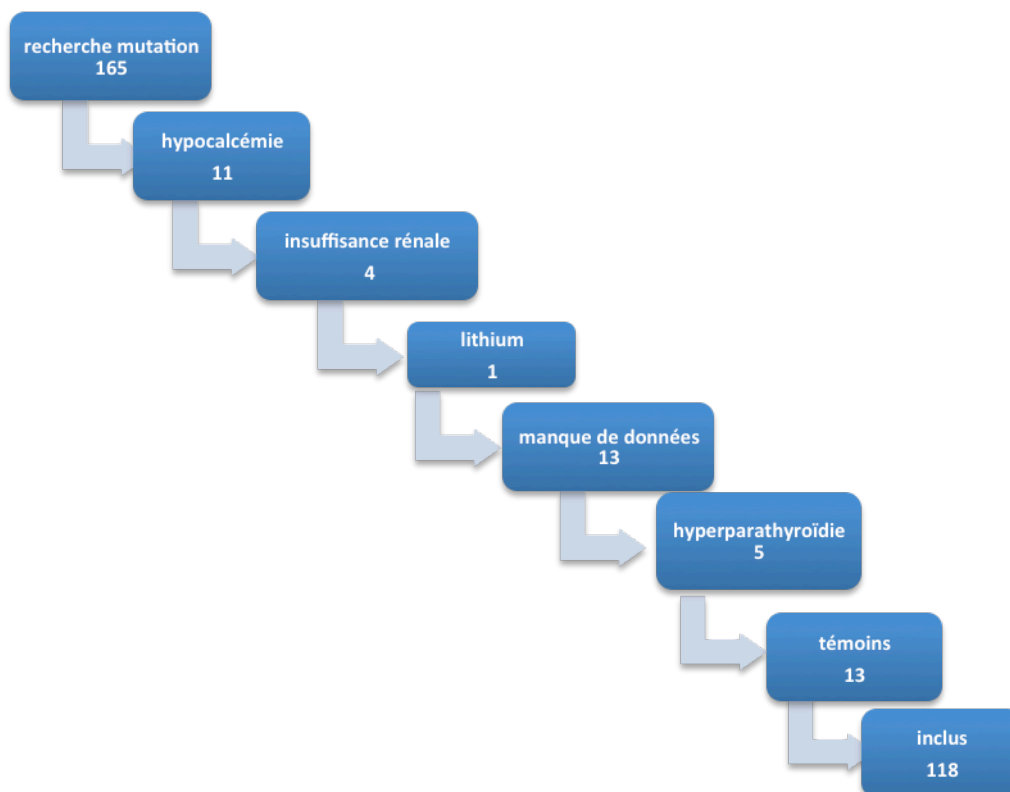


Figure 9 : inclusion des patients dans notre étude

## II. DESIGN DE L'ETUDE

Il s'agit d'une étude rétrospective de cohorte. Les patients ayant bénéficié d'une étude du gène du *CASR* ont été comparés selon leur niveau de calcémie et selon leur génotype pathogène ou non. Les patients ayant une hyperparathyroïdie ont été exclus.

L'analyse statistique a d'abord été effectuée en groupant les patients

- Selon la calcémie : 3 groupes ont été effectués :
  - calcémie inférieure à 100 mg/l et antécédent d'anomalie du bilan phosphocalcique
  - calcémie entre 100 et 105 mg/l
  - calcémie supérieure ou égale à 105 mg/l

Pour nous assurer que notre groupe témoin (calcémie < 100 mg/L mais avec anomalie du bilan phosphocalcique) était satisfaisant, nous l'avons comparé en termes de calcémie et de génotype à un groupe de témoins dont le génotype avait été étudié pour une raison autre qu'un trouble du bilan phosphocalcique.

Ce groupe présentait une calcémie inférieure à 100 mg/L et n'avait pas d'antécédent d'anomalie du bilan phosphocalcique. Il s'agissait d'apparentés de patients de pneumologie (service du Pr Scherpereel, CHRU Lille) ayant une mutation de l'alpha1-antitrypsine, chez qui la recherche de cette même mutation mais aussi celle des mutations du *CASR* qui modulent l'expression de la maladie avaient été effectuées.

Les calcémies et la répartition du génotype ne différaient pas entre les 2 groupes, seul le groupe témoin initial dont l'étude pouvait être complète notamment en termes de calciurie et de PTH a été conservé.



- Selon le génotype : 4 groupes ont été effectués
- absence de mutation du gène *CASR*
- présence d'un variant à l'état hétérozygote (A986S, R990G, ou Q1011E)
- présence d'un variant à l'état homozygote ou de 2 variants à l'état hétérozygote (hétérozygote composite)
- présence d'une mutation du *CASR*

Puis nous avons effectué des regroupements afin de réaliser d'autres analyses statistiques sur des groupes de taille suffisante :

- Absence de mutation pathogène et présence d'une mutation pathogène
- Réalisation de courbes ROC concernant le rapport calcium/PTH et calcium/phosphore

### III. PARAMETRES ANALYSES

Pour chaque patient, 33 données ont été initialement retranscrites : nom, âge, sexe, génotype, présence d'autres anomalies géniques susceptibles d'expliquer la calcémie, calcémie ionisée, antécédents personnels de lithiases rénales, protidémie, albuminémie, calciurie, phosphaturie, TRP (Taux de Réabsorption du Phosphore), créatinine, créatininurie /24h, clairance du calcium, clairance du phosphore, clairance de la créatinine, clairance calcium/créatinine, magnésémie, magnésurie, PTH, 25OHvitD, phosphatases alcalines osseuses, télépeptide, cross laps sanguin, hydroxyprolinurie, ostéocalcine, ostéodensitométrie, échographie, scintigraphie, , antécédents familiaux, traitements interférents. Ces données ont permis de ne pas méconnaître une calcémie faussée, d'exclure les patients avec traitement interférent.

Onze critères ont été finalement pris en compte pour l'analyse de la cohorte, ceux-ci étant jugés les plus discriminants et avec le moins de données manquantes : calcémie, calciurie, créatininémie, clairance de la créatinine, clairance calcium/clairance créatinine, PTH, 25OHvitD, DMO, lithiases rénales, âge, sexe pour l'objectif principal, et 12 pour l'objectif secondaire (critère calcémie en plus).

- Techniques de dosages et d'analyse

Concernant les critères pris en compte, les techniques de dosages étaient les suivantes :

- calcémie : colorimétrie sur tube hépariné
- créatinine : colorimétrie et test enzymatique sur tupe hépariné
- créatininurie : test colorimétrie sur tube plastique à fond rond, sur 24h
- calciurie : test colorimétrique sur tube plastique à fond rond, sur 24h
- PTH : test par immuno-chimiluminescence sur tube EDTA, sur l'automate Architect (Abbott) (réactif PTH référence 8k25)
- 25OHvitD : test par immuno-chimiluminescence sur tube sec, dosage sur l'automate Liaison (DiaSorin) (réactif 25 OH Vitamine D référence 310600).

La recherche de la mutation du récepteur du calcium avait été effectuée au centre de biologie et pathologie du CHRU de Lille, à partir d'un prélèvement sanguin sur tube EDTA, obtenu après consentement éclairé du patient. Il s'agissait, à partir du sang reçu, d'extraire l'ADN des leucocytes. Puis une amplification par PCR des zones d'intérêts (les différents exons du gène *CASR*) est réalisée. Les fragments amplifiés correspondent environ à 400 paires de bases. Puis une nouvelle étape d'amplification est réalisée à partir de produits déjà amplifiés : c'est l'étape d'extension, dans laquelle sont utilisés des didéoxyDNTP marqués par des fluorophores. Un séquençage selon la méthode de Sanger est réalisé sur un séquenceur capillaire automatique, 3730 XL (Applied Biosystem) par électrophorèse capillaire.

Puis la séquence trouvée est comparée à la séquence connue du gène, NM\_000388.3 à Lille. Le logiciel d'analyse utilisé était SEQSCAPE.

- Ostéodensitométrie

Les ostéodensitométries étaient réalisées dans le service de médecine nucléaire du CHRU sur un appareil de marque Hologic 81360, modèle Discovery A et avec le logiciel 12.6 :3.

Un Tscore supérieur à -1 correspondait à une densité minérale osseuse normale, un Tscore entre -1 et -2.5 à une ostéopénie, et un Tscore inférieur à -2.5 à une ostéoporose. Les valeurs étudiées au niveau du col fémoral et du rachis. Les données concernant le poignet étaient trop peu souvent mesurées.

46 patients avaient des données manquantes soit, 38,9% de la population totale.

- Lithiases

Pour chaque patient nous avons cherché un antécédent de colique néphrétique ou la présence de lithiases rénales à l'échographie.

Ces données manquaient pour 8 patients, soit 6,8% de la population totale.

#### **IV. RECUEIL DES DONNEES**

Les données relevées provenaient des dossiers informatiques ou papiers, aussi bien à Lille qu'à Amiens et Nîmes.

#### **V. LES TESTS STATISTIQUES**

La population totale a été décrite avec l'aide du logiciel SAS (Statistical Analysis System) 9.3.

Pour l'étude descriptive, la normalité a été vérifiée par le test de Shapiro-Wilk.

Les patients ont été dans un premier temps répartis en 3 groupes selon la calcémie. L'analyse du sexe, de l'ostéodensitométrie, s'est faite en comparaison de fréquence.

L'analyse de la présence de lithiase suivait une loi normale. Un test paramétrique de Fisher en comparaison de moyenne a été fait, avec analyse de la variance.

L'analyse des autres données suivait une loi non normale. Un test non paramétrique de Kruskal-Wallis a été réalisé, en comparaison de distribution.

Les patients ont ensuite été répartis en 4 groupes selon leur génotype et les mêmes analyses ont été réalisées.

Les résultats avec  $p < 0,05$  étaient considérés comme statistiquement significatifs.

Lorsque le résultat était significatif en comparant les 3 groupes, une analyse des groupes 2 à 2 était réalisée.

## RESULTATS

### I. DESCRIPTION DE LA COHORTE

La cohorte comportait 118 patients : 86 femmes et 32 hommes.

**Tableau 2 : Descriptif de la population totale**

Groupes selon calcémie	Fréquence	Pourcentage (%)
Ca < 100 et anomalies	15	12,7
Ca 100-105	28	23,7
Ca ≥ 105	75	63,5
Total	118	100

<b>Sexe féminin</b>	86	72,8
---------------------	----	------

Groupes selon génotype		
Normal	45	38,1
Variant hétérozygote	44	37,3
Dont A986S	35	29,7
R990G	5	4,2
Q1011E	4	3,4
Variant homozygote ou hétérozygote composite	8	6,8
Mutés	21	17,8
Total	118	100

DMO		
Normale	20	16,9
Ostéopénie	34	28,8
Ostéoporose	18	15,2
Non documentée	46	38,9
Total	118	100

<b>Lithiases</b>		
Présence	16	13,5
Non documenté	8	6,8
Total	118	100

Le tableau 2 ci-dessus représente la composition de la population totale.

- Comparaison du groupe témoin de pneumologie et du groupe témoin avec antécédent d'anomalie du bilan phosphocalcique

**Tableau 3. Comparaison des phénotypes et des génotypes entre les témoins du service de pneumologie et ceux avec antécédent d'anomalie du bilan phosphocalcique**

	<b>&lt;100 et pas d'anomalie du BPC</b>	<b>&lt;100 et anomalie du BPC</b>	<b>p</b>
<b>Age</b>	37 (36,39)	62 (45,74)	<b>0,0001</b>
<b>Calcémie (mg/L)</b>	92 (91,94)	95 (92,98)	0,0566
<b>Créatininémie (mg/L)</b>	8 (7,9)	8,5 (8,9)	0,3473
<b>Phosphore</b>	29 (26,37)	35 (30,49)	0,0670
<b>Sexe masculin</b>	23,1%	33,3%	0,2763
<b>Génotype</b>			1
- Normal	46%	46%	
- Variant hétéro	46%	46%	
- Variant homo ou hétéro compo	8%	7%	
- Mutés	0%	0%	

Les autres paramètres n'ont pas été étudiés entre ces deux groupes en raison de l'absence de différence significative entre les 4 sous-groupes de calcémie pour ceux-ci. La différence significative concernant l'âge est liée au motif de consultation en pneumologie (infertilité possiblement liée à une maladie pulmonaire). Par ailleurs, les effectifs sont faibles. Le génotype ne différait pas entre ces 2 groupes. En

effet, au sein du groupe témoin de pneumologie, 7 patients n'avaient pas d'anomalie du gène du *CASR*, 5 patients avaient un variant à l'état hétérozygote (3 variants A986S et 2 variants R990G), et 1 patient avait un variant à l'état homozygote (A986S).

Notre groupe témoin était donc satisfaisant en raison de l'absence de différence significative entre ces 2 groupes, hormis l'âge qui n'influe pas sur le génotype. Notre groupe témoin avec calcémie inférieure à 100 mg/L et anomalie transitoire du bilan phosphocalcique pourrait donc être assimilé à la population générale.

## II. OSTEODENSITOMETRIE

Tableau 4 : Comparaison de la densité minérale osseuse selon la calcémie

Calcémie (mg/L) \ % de patients ayant une DMO	Normale	Ostéopénique	Ostéoporotique	p
<100	11.1	22.2	66.7	
100-105	16.7	61.1	22.2	<b>0,0351</b>
≥ 105	35.6	46.7	17.8	

La prévalence de l'ostéoporose était plus importante dans le groupe de patients ayant une calcémie <100 mg/l que dans le groupe de patients ayant une calcémie ≥105 mg/L et celle de l'ostéopénie significativement (p=0.0351) plus fréquente dans le groupe ayant une calcémie comprise entre 100 et 105 ou ≥ 105 mg/l que dans le groupe ayant une calcémie <100 mg/L.

En comparant les groupes 2 à 2 (tableau 5 ci-dessous) on remarquait une différence significative (p=0,0438) entre les groupes de calcémie <100 mg/L et ≥ 105 mg/L avec respectivement 66,7 et 17,8% d'ostéoporose et 22,2 et 46% d'ostéopénie, l'ostéoporose étant paradoxalement plus fréquente dans le groupe calcémie<100 mg/L.

Tableau 5 : Comparaison de la densité minérale osseuse selon la calcémie en comparaison 2 à 2.

Calcémie (mg/L)	% de patients ayant une DMO			p
	Normale	Ostéopénie	Ostéoporose	
<100	11,1	22,2	66,7	0,2301
100-105	16,7	61,1	22,2	

Calcémie (mg/L)	% de patients ayant une DMO			p
	Normale	Ostéopénie	Ostéoporose	
<100	11,1	22,2	66,7	0,0438
≥ 105	35,6	46,7	17,8	

Calcémie (mg/L)	% de patients ayant une DMO			p
	Normale	Ostéopénie	Ostéoporose	
100-105	16,7	61,1	22,2	0,3614
≥ 105	35,6	46,2	17,8	

La comparaison des ostéodensitométries selon le génotype (tableau 6) montre une prévalence d'ostéoporose et d'ostéopénie significativement différente ( $p=0,03$ ) selon le génotype avec une prévalence importante d'ostéopénie chez les sujets non mutés et l'absence d'anomalie osseuse chez les mutés, confirmant l'absence de caractère délétère des anomalies du gène du *CASR* sur le plan osseux dans cette cohorte.

Tableau 6 : Comparaison de la densité minérale osseuse selon le génotype

	Normale (%)	Ostéopénie (%)	Ostéoporose (%)
Normal	19.35	61.29	19.35
Variant hétéro	20.69	44.83	34.48
Variant homo ou composite	75	0	25
Muté	62.5	25	5.56

La comparaison de la distribution des résultats de DMO chez les mutés et les non mutés (absence d'anomalie génétique, variant hétérozygote, homozygote ou hétérozygote composite) n'était pas significative ( $p=0,10$ ) mais on observait là encore une fréquence plus élevée d'ostéodensitométrie normale chez les mutés que chez les non mutés, comme le montre le tableau 7 (ci-dessous).

**Tableau 7 : Comparaison de la densité minérale osseuse selon la présence ou non d'une mutation du CASR**

	Normale	Ostéopénie	Ostéoporose	p
Non mutés	23,4	50	26,5	0,10
Mutés	62,5	25	12,5	

### III. LITHIASES RENALES

**Tableau 8 : présence de lithiases rénales selon la calcémie**

Calcémie (mg/l)	Pas de lithiase	Lithiase	p
<100	76.9	23.1	0,3614
100-105	80.8	19.2	
≥ 105	88.7	11.3	

La prévalence des néphrolithiases n'était pas différente ( $p=0,3614$ ) en fonction de la calcémie malgré une prévalence 2 fois plus élevée dans le groupe ayant une calcémie < 100 mg/l.

**Les lithiases ne diffèrent pas ( $p=0.6737$ ) selon le type d'anomalie du CASR dans cette cohorte (Tableau 9).** Cependant, elles sont présentes dans tous les groupes, la prévalence la plus basse étant observée comme attendu chez les sujets mutés (6%), deux fois plus basse que chez les sujets non mutés. Paradoxalement les sujets hétérozygotes isolés ou composites ont une prévalence de lithiases similaire ou légèrement plus élevée que les non mutés, reflétant probablement l'effet hypercalciuriant des variants hétérozygotes les plus connus.



Tableau 9 : présence de lithiases selon le génotype

% de patients montrant une	absence de lithiase	lithiase	p
Normal	89.05	13.95	0,6737
Variant hétéro	80.95	19.05	
Variant homo ou hétéro compo	87.5	12.5	
Muté	94.12	5.88	

La comparaison a également été faite en groupant les non mutés (absence d'anomalie génétique, variant hétérozygote, homozygote ou hétérozygote composite) et les mutés, et n'a pas montré de différence significative ( $p=0,4582$ ).

#### IV. COMPARAISON DES PARAMETRES BIOLOGIQUES SELON LA CALCÉMIE

Tableau 10 : Comparaison des paramètres biologiques selon la calcémie

Médiane IQR	<100mg/L	100-105 mg/L	≥ 105 mg/L	p
Age	62 (45-74)	67,5 (44-79)	64 (53-79)	0,7748
Phosphore	35(30-49)	33(26,5-39)	28(24-32)	<b>0,0001</b>
CaU	128(80-255)	111(62-177)	118,5(61-188)	0,7616
Creat	8,5(8-9)	9(8-10,9)	9(7-11)	0,6931
Clcreat	77(63-86)	74,5(64,5-107)	85,2(66-121)	0,4998
PTH	73(43-91)	39(22,5-85)	88(56-110)	<b>0,002</b>
25OHvitD	25(18-40)	18,5(13,5-24,5)	26(17-34)	0,0856
Ca/PTH	1,3(1-2,3)	2,6(1,2-4,5)	1,22(1-2)	<b>0,0107</b>
Ca /Phosphore	2,6(1,9-3,2)	3,1(2,6-3,9)	3,9(3,4-4,8)	<b>&lt;0,0001</b>
ClCaCreat	0,01(0,01-0,02)	0,01(0,01-0,02)	0,01(0,01-0,02)	0,3787

La comparaison des paramètres biologiques entre les 3 groupes selon le niveau de calcémie (tableau 10) mettait en évidence une différence significative de PTH, de rapports calcium/phosphore et calcium/PTH avec des valeurs respectivement plus élevées chez les patients avec calcémie  $\geq 105$  mg/L.

- Comparaison des paramètres biologiques 2 à 2 selon la calcémie

**Tableau 11 : Paramètres biologiques comparés 2 à 2 selon la calcémie**

	<100	100-105	p
<b>Phosphore</b>	35(30-49)	33(26-39)	0,1890
<b>PTH</b>	73(43-91)	39(22,5-85)	<b>0,0482</b>
<b>Ca/PTH</b>	1,31(1,03-2,28)	2,64(1,22-4,54)	<b>0,0233</b>
<b>Ca/Ph</b>	2,65(1,88-3,23)	3,11(2,64-3,86)	<b>0,0303</b>

	<100	>105	p
<b>Phosphore</b>	35(30-49)	28(24-32)	<b>0,0003</b>
<b>PTH</b>	73(43-91)	88(56-110)	0,1139
<b>Ca/PTH</b>	1,31(1,03-2,28)	1,22(1,03-2)	0,8413
<b>Ca/Ph</b>	2,65(1,88-3,23)	3,95(3,45-4,79)	<b>&lt;0,0001</b>

	100-105	>105	p
<b>Phosphore</b>	33(26-39)	28(24-32)	<b>0,0038</b>
<b>PTH</b>	39(22,5-85)	88(56-110)	<b>0,0010</b>
<b>Ca/PTH</b>	2,64(1,22-4,54)	1,22(1,03-2)	<b>0,0041</b>
<b>Ca/Ph</b>	3,11(2,64-3,86)	3,95(3,45-4,79)	<b>&lt;0,0001</b>

Ces tableaux montrent une différence significative de PTH entre les 3 groupes avec une PTH plus élevée dans le groupe de calcémie supérieure à 105 mg/L et le groupe de calcémie inférieure à 100mg/L que dans le groupe de calcémie entre 100 et 105 mg/L. De plus le rapport calcium/PTH est significativement différent entre les patients avec calcémie supérieure à 105 mg/L et 100-105 mg/L et entre les groupes de patients avec calcémie 100-105 mg/L et inférieure à 100 mg/L.

- Distribution du génotype selon la calcémie

**Tableau 12 : Génotype selon la calcémie**

Calcémie (mg/l)	% de patients présentant un génotype				p
	Normal	Variant hétéro	Variant homo ou hétéro composite	Muté	
<100	46,67	46,67	6,67	0	0,1273
100-105	35,71	50	0	14,29	
≥ 105	37,33	30,67	9,33	22,67	

Ce tableau 12 montre la répartition des génotypes selon la calcémie de nos patients. La différence de génotype entre ces groupes n'était pas significative mais on remarque que 50% des patients ayant une calcémie entre 100 et 105mg/L étaient porteurs d'un variant à l'état hétérozygote et que 23% des

patients avec calcémie supérieure ou égale à 105mg/L avaient une mutation inactivatrice du récepteur du calcium. Une mutation du *CASR* et la présence d'un variant du gène à l'état hétérozygote ont été trouvés respectivement chez aucun et 46% des patients avec calcémie inférieure à 100 mg/l ; 14% et 50% des patients avec calcémie entre 100 et 105mg/L et 22% et 20% des patients avec calcémie supérieure ou égale à 105mg/L.

## V. COMPARAISON DES PARAMETRES SELON LA PRESENCE OU NON D'UNE MUTATION DU *CASR*

**Tableau 13 : Comparaison des paramètres biologiques selon la présence ou non d'une mutation du *CASR***

	Non mutés	Mutés	p
<b>Age</b>	68(55-79)	61(35-71)	0,0915
<b>Phosphore</b>	29(24-35)	28(27-34)	0,9151
<b>CaU</b>	123(65-188)	120(45-183,2)	0,7365
<b>Creat</b>	9(8-10)	8(6-7,1)	0,3410
<b>Clcreat</b>	77,5(64-108)	105(76,4-127)	0,0594
<b>Calcium</b>	106(102-112)	108(105-116)	0,0539
<b>PTH</b>	83(52-107)	50(32-91)	<b>0,0348</b>
<b>25OHvitD</b>	23(15,5-33)	27(21-35)	0,2072
<b>Ca/PTH</b>	1,32(1-2,18)	2,2(1,2-3,2)	<b>0,0158</b>
<b>Ca/Phosphore</b>	3,7(2,9-4,5)	3,8(3,1-4,4)	0,6041
<b>ClCaCreat</b>	0,01(0,01-0,02)	0,01(0-0,02)	0,2743

Le tableau 13 (ci-dessus) montre la comparaison des paramètres biologiques entre le groupe des patients ayant une mutation du *CASR* et ceux sans mutation. Il n'existait pas de différence significative entre les deux groupes pour l'âge, la phosphatémie, la calciurie, la créatininémie, la clairance de la créatinine, la clairance calcium/créatinine et la 25OHvitD.

Il existait une concentration de PTH statistiquement plus élevée chez les patients ne présentant pas de mutation du *CASR* que chez ceux ayant une mutation. De plus, le rapport calcium/PTH était significativement ( $p=0,0158$ ) plus élevé chez les patients avec une mutation du *CASR* que chez les patients non mutés. Il n'y avait pas de différence significative de la calcémie entre les deux groupes.

## VI. COMPARAISON DES PARAMETRES PHENOTYPIQUES SELON LE GENOTYPE

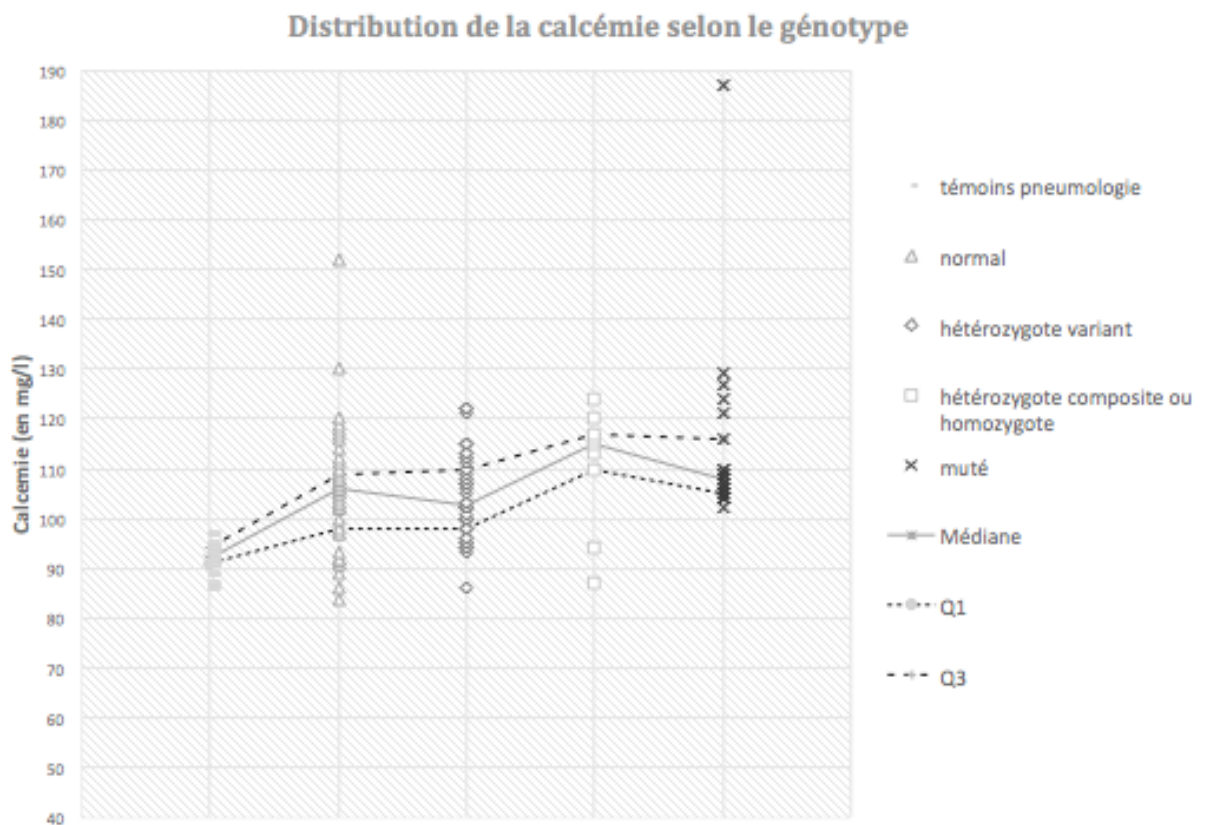
- Distribution de la calcémie selon le génotype

Le tableau 14 rapporte la distribution de la calcémie selon le génotype :

**Tableau 14 : comparaison de la calcémie selon le génotype**

	Médiane (mg/L)	p
Normal	106 (102,110)	0,1273
Variant hétérozygote	105 (100,111)	
Variant homozygote ou hétérozygote composite	115 (111,118)	
Muté	108 (105,116)	

Il n'existait donc pas de différence significative du taux de calcémie selon le génotype des patients.



**Figure 10: Distribution de la calcémie selon le génotype**

- Distribution de la PTH selon le génotype

**Tableau 15 : PTH selon le génotype**

	Normal	Variant hétérozygote	Variant homozygote ou hétérozygote composite	Mutés	p
<b>PTH (pg/mL)</b>	91(52-133)	74,5(38-96)	85(64,5-146,5)	50(32-91)	<b>0,0188</b>

Ce tableau 15 montre une valeur de PTH plasmatique significativement plus faible (50(32,91)) chez les patients mutés que chez les patients ayant un variant à l'état hétérozygote, un variant à l'état hétérozygote composite ou homozygote ou l'absence d'anomalie de *CASR*.

- Distribution de la calcémie/PTH selon le génotype

**Tableau 16 : Comparaison du rapport calcium/PTH selon le génotype**

	Ca/PTH	p
Normal	1.2 (0,8-1,9)	<b>0,0078</b>
Variant hétérozygote	1.4 (1,1-2,8)	
Variant homozygote et hétéro composite	1.2 (0,8-1,8)	
Mutés	2.2 (1,2-3,2)	

Il existait une **différence significative du rapport calcium/PTH selon le génotype** ( $p=0,0078$ ) avec un rapport plus élevé chez les mutés (2,16(1,19 ; 3,19)) que chez les personnes avec un gène *CASR* sans anomalie.

Les patients non mutés (gène *CASR* sans anomalie ou variant) et mutés ont été comparés selon ce rapport et il existait une différence significative ( $p=0,0158$ ) avec un rapport calcium/PTH plus élevé chez les mutés que chez les non mutés.

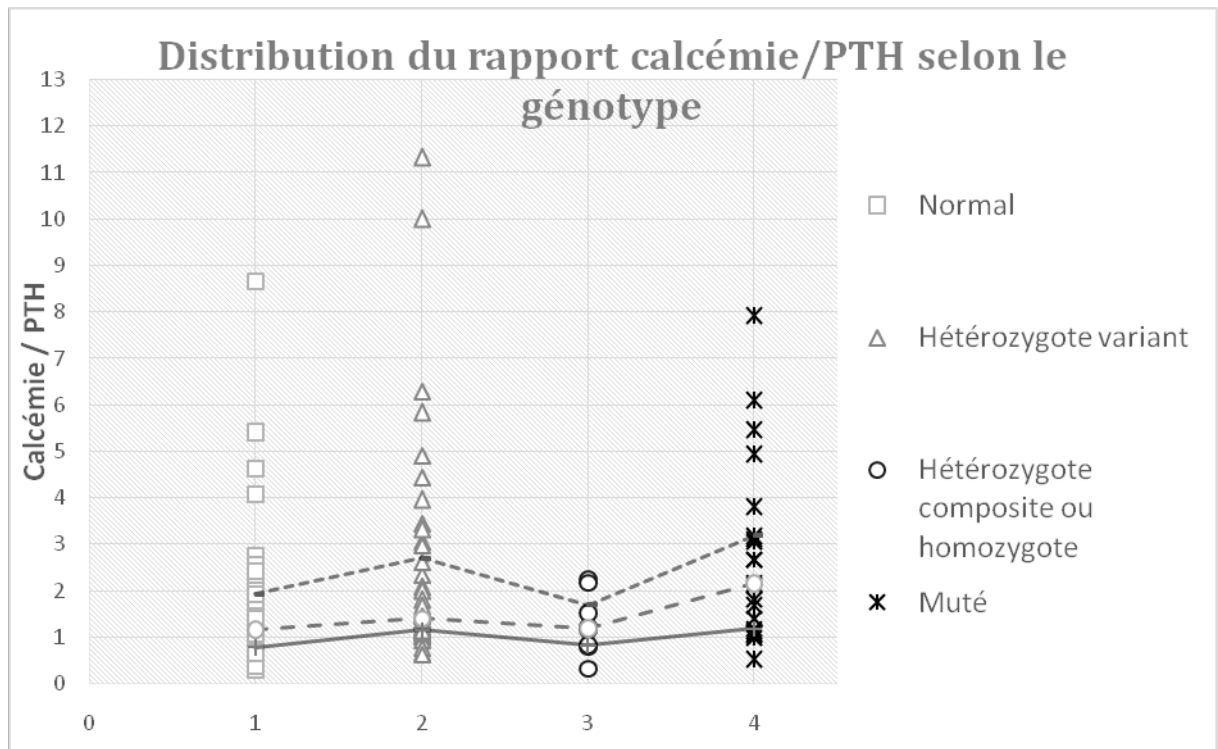


Figure 11 : distribution du rapport calcémie/PTH selon le génotype

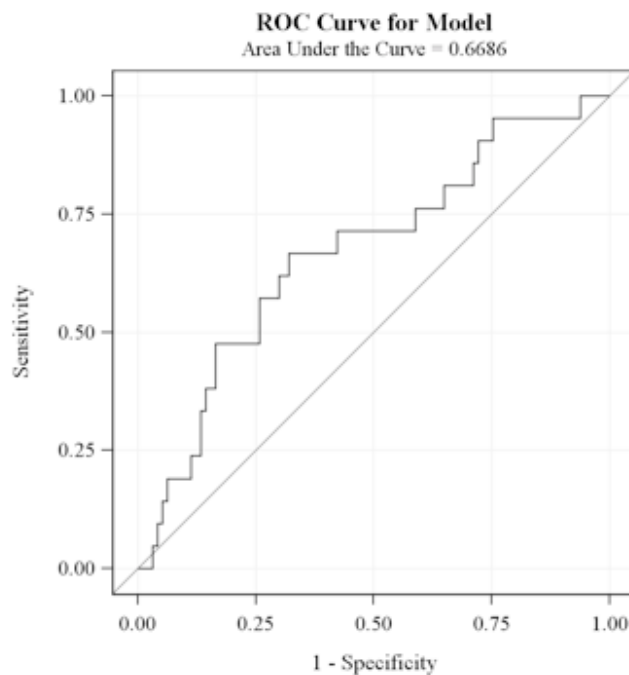


Figure 12 : Détermination de la sensibilité et la spécificité du rapport calcémie/ PTH par une courbe ROC pour identifier les mutés

Cette courbe ROC montre que le rapport calcémie/PTH est un test diagnostique moyennement performant mais intéressant pour identifier les patients ayant une mutation du *CASR*.

L'aire sous la courbe est de 0,67. Le meilleur seuil de la courbe semblait être 1,7. Ce point a une sensibilité de 0,67 et une spécificité de 0,68.

- Comparaison des valeurs selon le génotype

**Tableau 17 : Comparaison des paramètres biologiques selon le génotype**

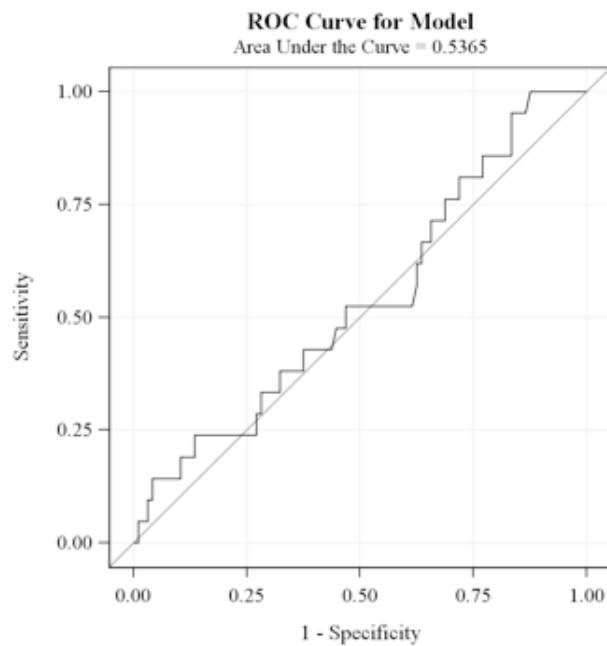
	<b>Normal</b>	<b>Variant hétérozygote</b>	<b>Variant homozygote ou hétérozygote composite</b>	<b>Mutés</b>	<b>p</b>
<b>Age</b>	62(53-79)	68(52-79)	77(65-88)	61(35-71)	0,1802
<b>Phosphore</b>	29(24-35)	29,5(25,5-37)	28(25-32,5)	28(27-34)	0,9545
<b>CaU</b>	148(80-215)	95(58-153)	89(44,7-160,8)	120(45-183,2)	0,1434
<b>Creat</b>	9(8-11)	9(8-10)	8,5(7-9,5)	8(6,7-11)	0,6144
<b>Clcreat</b>	79(66-107,5)	74,5(64-110)	84(66,7-118,5)	105(76,4-127)	0,2835
<b>ClCaCreat</b>	0,01(0,01-0,03)	0,01(0,01-0,02)	0,01(0-0,02)	0,01(0-0,02)	0,0571
<b>25OHvitD</b>	23(14,5-32,5)	23(15,5-32,5)	27(20-34,7)	27(21-35)	0,5473
<b>Ca/Phosphore</b>	3,7(2,9-4,5)	2,8(2,8-4,1)	4,2(3,5-4,7)	3,8(3-4,4)	0,6433

Il n'y avait statistiquement pas de différence entre les groupes pour l'âge, la phosphatémie, la calciurie, la créatinine, la clairance de la créatinine et la 25OHvitD. Il n'y avait également pas de différence entre les groupes pour le clairance du calcium/créatinine.

La calcémie n'était pas statistiquement différente entre le groupe sans mutation, les hétérozygotes pour un variant, les hétérozygotes composites pour des variants et les homozygotes et les mutés.

La PTH était statistiquement différente entre le groupe sans mutation, les hétérozygotes pour un variant, les hétérozygotes composites et les homozygotes pour des variants et les mutés.

Il existait une différence significative du rapport calcium/PTH entre le groupe sans mutation, les patients porteurs d'un variant du *CASR* à l'état hétérozygote, les patients porteurs d'un variant à l'état homozygote et hétérozygote composite et les patients porteurs d'une mutation.



**Figure 13 : Détermination de la sensibilité et la spécificité du rapport Calcémie/Phosphore par une courbe ROC pour identifier les mutés**

Cette courbe ROC montre que le rapport **calcémie/phosphore** est un **test médiocre** pour diagnostiquer les patients ayant une mutation du *CASR*.

L'aire sous la courbe est de 0,53. Le meilleur seuil de la courbe semble être 3,78. Ce point a une sensibilité de 0,52 et une spécificité de 0,53.



- Comparaison de la calcémie, la PTH et du rapport calcémie/PTH selon le génotype, 2 à 2.

Tableau 18 : Comparaison 2 à 2 selon le génotype

	Normal	Variant hétéro	p
<b>PTH</b>	91(52-133)	74,5(38-96)	<b>0,0287</b>
<b>Ca/PTH</b>	1,17(0,79-1,93)	1,40(1,15-2,79)	<b>0,0171</b>
<b>Ca</b>	106(102-110)	105,5(100-111,5)	0,7609

	Normal	Variant homo ou hétéro compo	p
<b>PTH</b>	91(52-133)	85(64,5-146,5)	0,6818
<b>Ca/PTH</b>	1,17(0,79-1,93)	1,20(0,82-1,85)	0,8619
<b>Ca</b>	106(102-110)	115,5(111,5-118,5)	<b>0,0152</b>

	Normal	Mutés	p
<b>PTH</b>	91(52-133)	50(32-91)	<b>0,0091</b>
<b>Ca/PTH</b>	1,17(0,79-1,93)	2,16(1,19-3,19)	<b>0,0033</b>
<b>Ca</b>	106(102-110)	108(105-116)	0,0569

	Variant hétéro	Variant homo ou hétéro compo	p
<b>PTH</b>	74,5(38-96)	85(64,5-146,5)	0,1517
<b>Ca/PTH</b>	1,40(1,15-2,79)	1,20(0,82-1,85)	0,1789
<b>Ca</b>	105,5(100-111,5)	115,5(111,5-118,5)	<b>0,0175</b>

	Variant hétéro	Mutés	p
<b>PTH</b>	74,5(38-96)	50(32-91)	0,3295
<b>Ca/PTH</b>	1,40(1,15-2,79)	2,16(1,19-3,19)	0,2170
<b>Ca</b>	105,5(100-111,5)	108(105-116)	<b>0,0241</b>

	Variant homo ou hétéro compo	Mutés	p
<b>PTH</b>	85(64,5-146,5)	50(32-91)	<b>0,0454</b>
<b>Ca/PTH</b>	1,20(0,82-1,85)	2,16(1,19-3,19)	<b>0,0404</b>
<b>Ca</b>	115,5(111,5-118,5)	108(105-116)	0,2217

Ces tableaux montrent qu'il existe une différence significative du rapport calcium/PTH entre les patients mutés pour le *CASR* et les patients témoins ( $p=0,0033$ ) mais que cette différence n'est pas significative entre les patients mutés et ceux présentant un variant de *CASR* à l'état hétérozygote.

De plus, on ne mettait pas en évidence de différence significative de la calcémie entre les patients mutés et normaux pour *CASR*.

# DISCUSSION

## I. DISCUSSION METHODOLOGIQUE : FORCE ET LIMITES DE L'ETUDE

Dans ce travail, nous avons colligé les données phénotypiques et génotypiques des patients ayant bénéficié d'une analyse du gène *CASR*, au CHRU de LILLE. Le nombre de patients de notre série n'est pas négligeable. L'étude minutieuse des dossiers a permis d'en extraire des informations importantes, tant au niveau clinique, biologique, que morphologique, afin de mieux identifier les corrélations génotype-phénotype de ces patients.

Cependant, notre étude était rétrospective et des données manquaient dans certains dossiers, pouvant biaiser le résultat. Les données de l'ostéodensitométrie étaient manquantes dans 38% des cas. La calciurie était peu renseignée dans les courriers, mais retrouvée la plupart du temps dans les dossiers papiers (5% de données manquantes).

Nous aurions aimé exploiter d'autres données, mais, l'étude étant rétrospective, les données étaient trop peu recherchées ou renseignées dans les dossiers : c'était le cas pour la magnésémie et la magnésurie, les marqueurs de remodelage osseux (64,5% de données manquantes pour le cross laps sanguin par exemple), la phosphaturie (manquait dans plus de 50% des cas).

Les patients ayant été opérés d'une hyperparathyroïdie primaire ont été exclus.

Les antécédents familiaux, bien que recueillis dans les dossiers, n'ont pas été pris en compte en raison du caractère rétrospectif de l'étude et de l'absence de vérification de symptômes pouvant faire évoquer dans la famille une anomalie du bilan phosphocalcique ou une mutation du *CASR*.

## II. DISCUSSION DES RESULTATS EN REGARD DES DONNEES DE LA LITTERATURE

- calcémie

Notre population avait une calcémie globalement élevée puisque 87,3% des patients avaient une calcémie supérieure à 100mg/L au moment du prélèvement. Ceci s'explique par le fait qu'actuellement la recherche d'une mutation du *CASR* est demandée devant une hypercalcémie et une hypocalciurie principalement. Cette hypercalcémie est bien décrite dans la littérature sans qu'une calcémie moyenne ne soit clairement identifiée. 13% des patients, non hypercalcémiques, avaient eu antérieurement une hypercalcémie ou des anomalies phosphocalciques.

Dans notre travail il n'existait pas de différence significative de la calcémie selon le génotype, que ce soit chez les patients sans mutation ou avec un variant à l'état homozygote, hétérozygote ou hétérozygote composite. Ceci nous amènerait à dire que **le niveau d'hypercalcémie n'est pas un bon critère** pour identifier une mutation inactivatrice du récepteur du *CASR*.

On notera tout de même que la médiane de calcémie chez les patients mutés est de 108 mg/L, ce qui correspond à ce qui est décrit dans la littérature. De plus, les génotypes pathogènes n'ont été identifiés que chez les patients dont la calcémie était supérieure à 100 mg/L.

50% des patients dont la calcémie est <100mg/L présentent des variants.

- Variants

On remarque que parmi les 44 patients portant un variant à l'état hétérozygote, 35 présentaient un variant A986S, soit 79,5%.

La fréquence plus élevée de ce variant est concordante avec les données de la littérature.

Selon la dbSNP (The Single Nucleotide Polymorphism Database), le variant A986S est trouvé chez 14,8% des occidentaux et 4% des africains. Le variant A990G est trouvé chez 7,3% des occidentaux et 4,3% des africains. Selon la même source, le variant Q1011E est trouvé chez 7% de la population générale.

Dans notre population témoin du service de pneumologie, sur 13 patients, 5 patients avaient un variant A986S, soit 38% de la population, et 2 avaient un variant R990G, soit 15% d'entre eux.

Une étude parue en 2001 étudiait la fréquence du polymorphisme A986S chez 97 jeunes suédoises (âge moyen 16,9 ans). Il existait ce polymorphisme chez 26% d'entre elles (56).

Une étude canadienne parue en 2000 trouvait une prévalence de 15,4% du polymorphisme A986S chez 387 témoins (57).

- Ostéodensitométrie
  - Densitométrie normale

Ce travail a montré chez les patients mutés l'absence d'atteinte osseuse accrue, avec une ostéodensitométrie montrant une fréquence plus élevée d'ostéodensitométrie normale chez les mutés que chez les non mutés.

Une étude parue en 2014 a permis d'étudier les densités osseuses chez 50 patients ayant une hypercalcémie hypocalciurie familiale de type 1. Comparé au groupe contrôle, ces patients avaient des chiffres de densité minérale osseuse plus élevés (58). Il apparaissait que le volume trabéculaire était diminué mais la densité osseuse augmentée. Cela pourrait être dû à une détérioration de la résorption endostéale ou à une corticalisation d'os trabéculaire. Le volume osseux diminué suggérait un accroissement de la détérioration périostée, mais la résistance osseuse n'est pas détruite.

La relation entre atteinte osseuse et mutation inactivatrice du récepteur du calcium n'est donc pas prouvée, contrairement aux cas d'hyperparathyroïdie primaire.

Une étude avait identifié l'action d'antagonistes allostériques du *CASR* chez des animaux et trouvait une augmentation de la densité minérale osseuse (59).

EFFET ÉTUDIÉ	MODÈLES EXPÉRIMENTAUX	HOMME
<b>ANTAGONISTES ALLOSTÉRIQUES</b>		
Sécrétion de PTH	Augmente	Augmente
Calcémie	Augmente	Augmente
Densité minérale osseuse	Augmente	?

Le *CASR* est impliqué dans le développement osseux mais n'altère pas le métabolisme du calcium. L'inactivation complète du *CASR* est létale : les animaux privés des deux copies du gène du *CASR* meurent dans les 2 semaines suivant leur naissance dans un tableau de désordre majeur du métabolisme calcique, associant une hypercalcémie sévère due à une hypersécrétion considérable d'hormone parathyroïdienne et une déminéralisation osseuse. En utilisant une stratégie de double inactivation du *CASR* et soit du gène de la PTH, soit d'un gène majeur du développement parathyroïdien, *Gcm2*, deux groupes ont indépendamment montré en 2003 que, lorsque l'hyperparathyroïdie est prévenue, l'inactivation complète du *CASR* n'est plus létale et que le phénotype osseux disparaît. Ces résultats suggèrent que le *CASR*, exprimé dans l'os, n'est important ni pour le développement osseux ni pour le métabolisme du calcium. Néanmoins, ces résultats sont à considérer avec prudence puisque le modèle d'inactivation du *CASR* utilisé s'est révélé n'être que partiel, plusieurs organes exprimant une protéine tronquée, dépourvue des acides aminés codés par l'exon 5 mais pouvant néanmoins être partiellement fonctionnelle. L'inactivation du *CASR* restreinte aux cellules de la lignée ostéoblastique a été étudiée récemment. Les souris n'exprimant plus le *CASR* dans les ostéoblastes ont un retard de croissance, une déminéralisation et un défaut de formation osseuse marqués, ces effets étant attribués à une augmentation de l'apoptose des ostéoblastes. En revanche, aucune anomalie de la calcémie n'a été décrite chez ces animaux. L'invalidation spécifique du *CASR* dans les chondrocytes est létale chez l'animal, responsable d'un rachitisme très évolué, attribué à un blocage de la différenciation des chondrocytes et à un défaut secondaire de leur minéralisation (60).

#### - Prévalence de l'ostéoporose et de l'ostéopénie

La comparaison des ostéodensitométries selon le génotype montrait que la prévalence de l'ostéoporose et de l'ostéopénie était significativement différente.

Il existait une ostéoporose plus importante chez les patients avec un variant à l'état hétérozygote (34%) et hétérozygote composite ou homozygote (25%) que chez les mutés (6%) ( $p=0,03$ ). Ces résultats laissent penser que l'anomalie clinico-biologique ayant amené à étudier le *CASR* n'avait pas de lien avec les variants qui sont d'ailleurs présents dans 50% de la population ou qu'ils sont en rapport avec la calciurie plus élevée associée à certains de ces variants. L'âge des patients, la

prédominance des femmes contribuent également à l'introduction de biais susceptibles d'expliquer ces différences d'autant que la réalisation d'une DMO n'était pas systématique.

Une étude italienne parue en 2003 avait étudié le profil osseux de 164 femmes ménopausiques sans fracture et 55 femmes avec fracture. Le polymorphisme A986S était constaté chez 28% d'entre elles (R990G chez 9% et Q1011E chez 5,5% des patientes). Le polymorphisme A986S et la durée de la ménopause n'étaient pas des facteurs prédictifs individuels de la densité minérale osseuse. Il n'y avait pas de différence significative de survenue de fracture entre les patientes porteuses d'un variant A986S et les autres (61).

- Lithiases rénales

Notre travail ne montrait pas de différence significative entre les mutés et les non mutés pour le gène *CASR* concernant la survenue de néphrolithiases. Ceci était attendu en raison de l'absence d'hypercalciurie, en dehors des variants R990G, qui ne concernaient que 5 patients.

La même étude que ci-dessus mettait en évidence l'absence d'effet d'antagonistes allostériques sur la calciurie dans des modèles expérimentaux.

EFFET ÉTUDIÉ	MODÈLES EXPÉRIMENTAUX	HOMME
<b>ANTAGONISTES ALLOSTÉRIQUES</b>		
Sécrétion de PTH	Augmente	Augmente
Calcémie	Augmente	Augmente
Densité minérale osseuse	Augmente	?
Calciurie	Sans effet	?

La prévalence des néphrolithiases n'était pas différente ( $p=0,3614$ ) en fonction de la calcémie malgré une prévalence 2 fois plus élevée dans le groupe ayant une calcémie  $< 100$  mg/l. Ces résultats pourraient suggérer une pathologie de type tubulopathie avec fuite urinaire de calcium dans ce groupe, ou le rôle de certaines mutations non pathogènes du récepteur sensible au Calcium favorisant l'hypercalciurie, puisque les diagnostics d'hyperparathyroïdie ont été éliminés.

- PTH

Dans cette étude, les valeurs de PTH chez les mutés étaient moins élevées que chez les non mutés. Les comparaisons étaient possibles car il n'existait pas de différence significative de la 25OHvitD entre les groupes. Ce niveau de PTH plus bas est compatible avec l'effet calcisensibilisant des mutations. On notera toutefois que dans tous les groupes les valeurs de PTH atteignaient deux fois la limite supérieure de la norme, peut-être en raison d'une supplémentation insuffisante en vitamine D ou d'une calciurie variable selon d'autres facteurs.

Une étude publiée en Janvier 2015 analysait le génotype *CASR* chez 140 femmes carencées en vitamine D. Les patientes présentant un variant R990G avaient une PTH plus élevée et une calcémie plus faible que les patientes avec un variant A986S (62). Chez les mutés, il est décrit dans la littérature une PTH normale ou légèrement élevée (63), ce que nous constatons également dans notre étude (50(32 ; 91)) pour une norme du laboratoire entre 10 et 60 pg/mL.

- Clairance calcium/créatinine

Nous n'avons pas trouvé de différence significative du rapport clairance calcium/clairance créatinine entre les mutés et les non mutés. Ce rapport est habituellement décrit comme discriminant pour le diagnostic, étant  $<0,01$  dans les FHH et plus élevé dans les hyperparathyroïdies primaires qui étaient ici exclues. Par ailleurs la fiabilité de la mesure de la calciurie, dépendant de la bonne réalisation du recueil urinaire, est variable.

Dans cette étude, ce critère, jusqu'alors mis en avant pour le diagnostic de FHH, ne semble pas discriminant.

- Rapport calcium/PTH

En revanche, ce travail a permis de montrer une différence significative du rapport calcémie/PTH entre les patients porteurs d'une mutation du *CASR* et les patients non mutés, avec un rapport significativement plus élevé chez les mutés.

Ce critère biologique apparaît être pertinent pour la recherche d'une mutation du *CASR*, d'autant qu'il est simple. Il serait nécessaire de comparer ce rapport entre les patients mutés pour le *CASR* et les



patients souffrant d'hyperparathyroïdie primaire afin de définir s'il existe une différence significative de ce rapport et définir une valeur seuil.

Il n'existe pas d'étude dans la littérature de ce rapport concernant les mutations du *CASR*, chez des patients hypercalcémiques non hyperparathyroïdiens.

## CONCLUSION

Dans cette étude, la moitié des patients avec une calcémie inférieure à 105mg/L présentaient un variant du *CASR* et un peu plus d'un patient sur cinq avec une calcémie supérieure ou égale à 105mg/L une mutation du *CASR*. Les valeurs de PTH du groupe muté étaient plus faibles que le groupe non muté mais sans différence de calciurie ou de rapport clairance calcium/créatinine en présence d'un taux de 25OHvitamineD similaire.

Finalement si l'on tient compte du groupe témoin « vrai » étudié en dehors de toute anomalie du métabolisme phosphocalcique, la moitié de la population générale présente un variant du *CASR*. Le pourcentage de patients présentant une mutation pathogène croît avec le niveau de calcémie de 0% pour une calcémie < 100 mg/L à 14% entre 100 et 105 mg/L et 22% au-delà de 105 mg/L.

Une calcémie > 100 mg/L en regard d'une PTH < 100 pg/mL en l'absence de carence vitaminique D (concentration > 20 ng/mL) constitue pour le clinicien le meilleur marqueur orientant vers une anomalie du *CASR*. Un rapport **calcémie/PTH** > 2 est la médiane du groupe de patients mutés, les différents groupes de variants ayant une médiane < 1.5 bien que le groupe des hétérozygotes puisse être plus élevé.

Dans ce travail, le rapport calcium/créatinine, de calcul complexe, n'est pas discriminant compte-tenu de l'effet aujourd'hui connu de certains variants du *CASR* sur la calciurie d'une part et d'une meilleure couverture vitaminique D de la population d'autre part.

Ce travail confirme le phénotype variable des patients porteurs d'une anomalie du *CASR*.

Il serait intéressant d'étudier le génotype et le rapport calcium/PTH des patients opérés d'une hyperparathyroïdie et qui ont été exclus de l'analyse dans ce travail.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) Calcium homeostasis. Endocrine Regulation of  $[Ca^{++}]_{ECF}$   
<http://courses.washington.edu/conj/bess/calcium/calcium.html>
- (2) National institut for medical research <http://www.nimr.mrc.ac.uk/mill-hill-essays/vitamin-d-a-natural-wonder-drug-were-all-avoiding>.
- (3) Brown EM, Gamba G, Riccardi D et al. Cloning and characterization of an extracellular  $Ca(2+)$ -sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature* 1993.
- (4) Ruat M, Molliver ME, Snowman AM, Snyder SH. Calcium sensing receptor : molecular cloning in rat and localization to nerve terminals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995.
- (5) Hu J, Spiegel AM. Naturally occurring mutations of the extracellular  $Ca^{2+}$ -sensing receptor : implications for its structure and function. *Trends Endocrinol Metab* 2003.
- (6) Hendy GN, D'Souza-Li L, Yang B, Canaff L, Cole DE. Mutations of the calcium-sensing receptor (CASR) in familial hypocalciuric hypercalcemia, neonatal severe hyperparathyroidism, and autosomal dominant hypocalcemia. *Hum Mutat* 2000.
- (7) Garrett JE, Capuano IV, Hammerland LG et al. Molecular cloning and functional expression of human parathyroid calcium receptor cDNAs. *J Biol Chem* 1995.
- (8) Hosokawa Y, Pollak MR, Brown EM, Arnold A. Mutational analysis of the extracellular  $Ca(2+)$ -sensing receptor gene in human parathyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1995.
- (9) Ruat M, Snowman AM, Hester LD, Snyder SH. Cloned and expressed rat  $Ca^{2+}$ -sensing receptor. *J Biol Chem* 1996.
- (10) Brown EM, MacLeod RJ. Extracellular calcium sensing and extracellular calcium signaling. *Physiol Rev* 2001.
- (11) M. F. Bear, B. W. Connors, M. A. Paradiso. *Neurosciences. A la découverte du Cerveau.* Editions Pradel - 1997.
- (12) P. Houillier. *Le récepteur du calcium : de la biologie à la clinique.* Médecine sciences publications/Lavoisier-Actualités néphrologiques 2011.
- (13) Nemeth EF. Pharmacological regulation of parathyroid hormone secretion. *Curr PharmDes* 2002.
- (14) F. Faivre-Defrance, S. Marcelli-Tourvieille, M.-F. Odou, N. Porchet, J.-L. Wemeau, M.-C. Vantyghem. *Le récepteur sensible au calcium : physiologie et pathologie.* Annales d'endocrinologie Mars 2006.
- (15) Jackson CE, Boonstra. Hereditary hypercalcemia and parathyroid hyperplasia without definite hyperparathyroidism. *J lab Clin Med* 1966.
- (16) Pollak MR, Brown EM, Chou YH, et al. Mutations in the human  $Ca^{2+}$ -sensing receptor gene cause familial hypocalciuric hypercalcemia and neonatal severe hyperparathyroidism. *Cell* 1993.

- (17) Kirun Gunganah, Ashley Grossman,<sup>1</sup> and Maralyn Druce. Recurrent pancreatitis in a patient with familial hypocalciuric hypercalcaemia treated successfully with cinacalcet. Department of Endocrinology, London, Oxford. *Endocrinol Diabetes Metab Case Rep* 2014.
- (18) Stepanchick A<sup>1</sup>, McKenna J, McGovern O, Huang Y, Breitwieser GE. Calcium sensing receptor mutations implicated in pancreatitis and idiopathic epilepsy syndrome disrupt an arginine-rich retention motif. *Cell Physiol Biochem*. 2010.
- (19) Felderbauer P<sup>1</sup>, Klein W, Bulut K, Ansorge N, Dekomien G, Werner I, Epplen JT, Schmitz F, Schmidt WE. Mutations in the calcium-sensing receptor: a new genetic risk factor for chronic pancreatitis? *Scand J Gastroenterol*. 2006.
- (20) Felderbauer P<sup>1</sup>, Hoffmann P, Einwächter H, Bulut K, Ansorge N, Schmitz F, Schmidt WE. A novel mutation of the calcium sensing receptor gene is associated with chronic pancreatitis in a family with heterozygous SPINK1 mutations. *BMC Gastroenterol*. 2009.
- (21) Damoiseaux P, Tafforeau M, Henkinbrant A. Unique episode of acute pancreatitis manifesting familial hypocalciuric hypercalcaemia]. *Acta Clin Belg*. 1985.
- (22) Volpe A1, Guerriero A, Marchetta A, Caramaschi P, Furlani L. Familial hypocalciuric hypercalcaemia revealed by chondrocalcinosis. *Joint Bone Spine*. 2009.
- (23) Ubetagoyena Arrieta M, Castaño González L, Pérez de Nanclares Leal G, Arruebarrena Lizarraga D, Imaz Murguiondo M, Areses Trapote R. Familial hypocalciuric hypercalcaemia: a new mutation. *An Pediatr (Barc)*. 2011.
- (24) Cetan F, Pinchera A, Pardi E et al. No evidence for mutations in the calcium-sensing receptor gene in sporadic parathyroid adenomas. *J Bone Miner Res* 1999.
- (25) Burski K, Torjussen B, Paulsen AQ, Boman H, Bollerslev J. Parathyroid adenoma in a subject with familial hypocalciuric hypercalcaemia: coincidence or causality? *J Clin Endocrinol Metab* 2002.
- (26) Brachet C<sup>1</sup>, Boros E, Tenoutasse S, Lissens W, Andry G, Martin P, Bergmann P, Heinrichs C. Association of parathyroid adenoma and familial hypocalciuric hypercalcaemia in a teenager. *Eur J Endocrinol*. 2009.
- (27) Yabuta T<sup>1</sup>, Miyauchi A, Inoue H, Yoshida H, Hirokawa M, Amino N. A patient with primary hyperparathyroidism associated with familial hypocalciuric hypercalcaemia induced by a novel germline CaSR gene mutation. *Asian J Surg*. 2009.
- (28) Frank-Raue K(1), Leidig-Bruckner G, Haag C, Schulze E, Lorenz A, Schmitz-Winnenthal H, Raue F.) Inactivating calcium-sensing receptor mutations in patients with primary hyperparathyroidism. *Clin (Endocrinol (Oxf))*. 2011.
- (29) Eldeiry LS<sup>1</sup>, Ruan DT, Brown EM, Gaglia JL, Garber JR. Primary hyperparathyroidism and familial hypocalciuric hypercalcaemia: relationships and clinical implications. *Endocr Pract*. 2012.
- (30) Forde HE<sup>1</sup>, Hill AD<sup>2</sup>, Smith D<sup>3</sup>. Parathyroid adenoma in a patient with familial hypocalciuric hypercalcaemia. *BMJ Case Rep*. 2014.
- (31) <http://www.socnephrologie.org/PDF/enephro/publications/actualites/2011/16-houillier.pdf>
- (32) Elamin WF<sup>1</sup>, de Buyl O. A novel mutation in the calcium-sensing receptor gene in an Irish pedigree showing familial hypocalciuric hypercalcaemia: a case report. *J Med Case Rep*. 2010.

- (33) Zajickova K<sup>1</sup>, Vrbikova J, Canaff L, Pawelek PD, Goltzman D, Hendy GN. Identification and functional characterization of a novel mutation in the calcium-sensing receptor gene in familial hypocalciuric hypercalcemia: modulation of clinical severity by vitamin D status. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007.
- (34) Cole DE<sup>1</sup>, Janicic N, Salisbury SR, Hendy GN. Neonatal severe hyperparathyroidism, secondary hyperparathyroidism, and familial hypocalciuric hypercalcemia: multiple different phenotypes associated with an inactivating Alu insertion mutation of the calcium-sensing receptor gene. 1997.
- (35) Szczawinska D<sup>1</sup>, Schnabel D, Letz S, Schöfl C. A homozygous CaSR mutation causing a FHH phenotype completely masked by vitamin D deficiency presenting as rickets. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014.
- (36) Aparicio López C<sup>1</sup>, Anton-Martin P, Gil-Fournier B, Ramiro-León S, Pérez-Nanclares G, Pérez de Nanclares G, Martínez Menéndez B, Castaño L. Familial hypocalciuric hypercalcemia: new mutation in the CASR gene converting valine 697 to methionine. *Eur J Pediatr.* 2012.
- (37) Ferry S, Traiffort E, Stinnakre J, Ruat M. Developmental and adult expression of rat calcium-sensing receptor transcripts in neurons and oligodendrocytes. *Eur J Neurosci.* 2000.
- (38) Wystrychowski A, Pidasheva S, Canaff L et al. Functional characterization of calcium-sensing receptor codon 227 mutations presenting as either familial (benign) hypocalciuric hypercalcemia or neonatal hyperparathyroidism. *Clin Endocrinol Metab.* 2005.
- (39) Geoffrey N. Hendy, Lucie Canaff, Ron S. Newfield, Liana Tripto-Shkolnik, Betty Y. L. Wong, Bonnie S. P. Lee, and David E. C. Cole. Codon Arg15 Mutations of the AP2S1 Gene: Common Occurrence in Familial Hypocalciuric Hypercalcemia Cases Negative for Calcium-Sensing Receptor (CASR) Mutations. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014.
- (40) Han G, Wang O, Nie M, Zhu Y, Meng X, Hu Y, Liu H, Xing X. Clinical phenotypes of Chinese primary hyperparathyroidism patients are associated with the calcium-sensing receptor gene R990G polymorphism. *Eur J Endocrinol.* 2013.
- (41) Cole DE<sup>1</sup>, Vieth R, Trang HM, Wong BY, Hendy GN, Rubin LA. Association between total serum calcium and the A986S polymorphism of the calcium-sensing receptor gene. *Mol Genet Metab.* 2001.
- (42) Yonghan Hea, 1, Liyuan Hanb, 1, Wen Lic, Xiang Shud, Chen Zhaoa, Ying Hea, Mingxin Bia, Ying Lia, , Changhao Suna,. Effects of the calcium-sensing receptor A986S polymorphism on serum calcium and parathyroid hormone levels in healthy individuals: A meta-analysis. *Gene.* 2012.
- (43) Liu K<sup>1</sup>, Wang X<sup>1</sup>, Ye J<sup>1</sup>, Qin C<sup>1</sup>, Shao P<sup>1</sup>, Zhang W<sup>1</sup>, Li J<sup>1</sup>, Yin C<sup>1</sup>. The G allele of CaSR R990G polymorphism increases susceptibility to urolithiasis and hypercalciuria: evidences from a comprehensive meta-analysis. *Biomed Res Int.* 2015.
- (44) Vezzoli G, Tanini A, Ferrucci L et al. Influence of calcium-sensing receptor gene on urinary calcium excretion in stone-forming patients. *J Am Soc Nephrol.* 2002.
- (45) Vezzoli<sup>1</sup>, A Terranegra<sup>2</sup>, T Arcidiacono<sup>1</sup>, R Biasion<sup>2</sup>, D Coviello<sup>3</sup>, M L Syren<sup>4</sup>, V Paloschi<sup>1</sup>, S Giannini<sup>5</sup>, G Mignogna<sup>6</sup>, A Rubinacci<sup>6</sup>, A Ferraretto<sup>7</sup>, D Cusi<sup>2,8</sup>, G Bianchi<sup>1</sup> and L. R990G polymorphism of calcium-sensing receptor does produce a gain-of-function and predispose to primary hypercalciuria. *G. Soldati Kidney International.* 2007.

- (46) Takacs I, Speer G, Bajnok E et al. Lack of association between calcium-sensing receptor gene "A986S" polymorphism and bone mineral density in Hungarian postmenopausal women. *Bone* 2002.
- (47) Lorentzon M, Lorentzon R, Lerner UH, Nordstrom P. Calcium sensing receptor gene polymorphism, circulating calcium concentrations and bone mineral density in healthy adolescent girls. *Eur J Endocrinol* 2001.
- (48) Eller-Vainicher C<sup>1</sup>, Battista C<sup>1</sup>, Guarnieri V<sup>1</sup>, Muscarella S<sup>2</sup>, Palmieri S<sup>1</sup>, Salcuni AS<sup>1</sup>, Guglielmi G<sup>1</sup>, Corbetta S<sup>1</sup>, Minisola S<sup>1</sup>, Spada A<sup>1</sup>, Hendy GN<sup>1</sup>, Cole DE<sup>1</sup>, Chiodini I<sup>3</sup>, Scillitani A<sup>1</sup>. Factors associated with vertebral fracture risk in patients with primary hyperparathyroidism. *Eur J Endocrinol*. 2014.
- (49) Yoon V<sup>1</sup>, Adams-Huet B, Sakhaee K, Maalouf NM. Hyperinsulinemia and urinary calcium excretion in calcium stone formers with idiopathic hypercalciuria. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013.
- (50) He YH<sup>1</sup>, Kong WL, Wang G, Zhao Y, Bi MX, Na LX, Wang MQ, Perry B, Li Y. The calcium-sensing receptor R990G polymorphism is associated with increased risk of hypertriglyceridemia in obese Chinese. *Gene*. 2014.
- (51) Yamauchi M, Sugimoto T, Yamaguchi T *et al*. Association of polymorphic alleles of the calcium-sensing receptor gene with the clinical severity of primary hyperparathyroidism. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2001.
- (52) Yano S, Sugimoto T, Kanzawa M *et al*. Association of polymorphic alleles of the calcium-sensing receptor gene with parathyroid hormone secretion in hemodialysis patients. *Nephron* 2000.
- (53) Han G<sup>1</sup>, Wang O, Nie M, Zhu Y, Meng X, Hu Y, Liu H, Xing X. Clinical phenotypes of Chinese primary hyperparathyroidism patients are associated with the calcium-sensing receptor gene R990G polymorphism. *Eur J Endocrinol*. 2013.
- (54) Gunn IR, Wallace JR. Urine calcium and serum ionized calcium, total calcium and parathyroid hormone concentrations in the diagnosis of primary hyperparathyroidism and familial benign hypercalcaemia *Ann Clin Biochem* 1992.
- (55) Thakker, R. V. Calcium-sensing receptor: Role in health and disease. *Indian J Endocrinol Metab*. 2012.
- (56) Lorentzon M<sup>1</sup>, Lorentzon R, Lerner UH, Nordström P. Calcium sensing receptor gene polymorphism, circulating calcium concentrations and bone mineral density in healthy adolescent girls. *Eur J Endocrinol*. 2001.
- (57) Cole DE, Vieth R, Trang HM, Wong BY, Hendy GN, Rubin LA. Association between total serum calcium and the A986S polymorphism of the calcium-sensing receptor gene. *Mol Genet Metab* 2001.
- (58) Jakobsen NF<sup>1</sup>, Rolighed L, Moser E, Nissen PH, Mosekilde L, Rejnmark L. Increased trabecular volumetric bone mass density in Familial Hypocalciuric Hypercalcemia (FHH) type 1: a cross-sectional study. *Calcif Tissue Int*. 2014.
- (59) P. Houillier. *Le récepteur du calcium : un rôle central dans le métabolisme calcique* Elsevier Masson SAS 2008.
- (60) Jakobsen NF<sup>1</sup>, Rolighed L, Moser E, Nissen PH, Mosekilde L, Rejnmark L. Increased trabecular volumetric bone mass density in Familial Hypocalciuric Hypercalcemia (FHH) type 1: a cross-sectional study. *Calcif Tissue Int*. 2014.

- (61) Cetani F, Pardi E, Borsari S et al. Calcium-sensing receptor gene polymorphism is not associated with bone mineral density in Italian postmenopausal women. *Eur J Endocrinol* 2003.
- (62) Majid H1, Khan AH1, Moatter T2. R990G Polymorphism of Calcium Sensing Receptor Gene Is Associated with High Parathyroid Hormone Levels in Subjects with Vitamin D Deficiency: A Cross-Sectional Study. *Biomed Res Int*. 2015.
- (63) Nissen PH1, Christensen SE, Heickendorff L, Brixen K, Mosekilde L. Molecular genetic analysis of the calcium sensing receptor gene in patients clinically suspected to have familial hypocalciuric hypercalcemia: phenotypic variation and mutation spectrum in a Danish population. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007.
- (64) Elamin WF1, de Buyl O. A novel mutation in the calcium-sensing receptor gene in an Irish pedigree showing familial hypocalciuric hypercalcemia: a case report. *J Med Case Rep*. 2010.
- (65) Lloyd SE, Pannett AA, Dixon PH, Whyte MP, Thakker RV. Localization of familial benign hypercalcemia, Oklahoma variant (FBHOk), to chromosome 19q13. *Am J Hum Genet* 1999.
- (66) Geoffrey N. Hendy, Lucie Canaff, Ron S. Newfield, Liana Tripto-Shkolnik, Betty Y. L. Wong, Bonnie S. P. Lee, and David E. C. Cole. Codon Arg15 Mutations of the *AP2S1* Gene: Common Occurrence in Familial Hypocalciuric Hypercalcemia Cases Negative for Calcium-Sensing Receptor (*CASR*) Mutations. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014.
- (67) Zhang Z, Sun S, Quinn SJ, et al. The extracellular calcium-sensing receptor dimerizes through multiple types of intermolecular interactions. *J Biol Chem* 2001.
- (68) Corbetta S, Mantovani G, Lania A et al. Calcium-sensing receptor expression and signalling in human parathyroid adenomas and primary hyperplasia. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2000.
- (69) Shoback D, Thatcher J, Leombruno R, Brown E. Effects of extracellular  $Ca^{++}$  and  $Mg^{++}$  on cytosolic  $Ca^{++}$  and PTH release in dispersed bovine parathyroid cells. *Endocrinology* 1983
- (70) Alix L<sup>1</sup>, Guggenbuhl P<sup>2</sup>. Familial hypocalciuric hypercalcemia associated with crystal deposition disease. *Joint Bone Spine*. 2015.
-

**AUTEUR : Nom : VAHE Prénom : Claire**

**Date de Soutenance : 24 Juin 2015**

**Titre de la Thèse : Corrélations phénotype-génotype concernant les mutations inactivatrices du récepteur sensible au calcium à propos de 118 cas**

**Thèse - Médecine - Lille 2015**

**Cadre de classement : DES d'Endocrinologie, Diabétologie, Maladies Métaboliques**

**Mots-clés : CaSR, hypercalcémie hypocalciurie familiale, mutations inactivatrices, phénotype, Calcium/PTH**

**Résumé :**

**Les mutations inactivatrices** du *CASR* peuvent causer une hypercalcémie hypocalciurie familiale (FHH), une hyperparathyroïdie néonatale sévère et une hyperparathyroïdie primaire. La FHH est caractérisée par une hypercalcémie modérée, une hypocalciurie, une clairance calcium/créatinine (CaCl/CrCl) $<0,01$ , une PTH normale ou élevée. Cependant le phénotype est variable. Le but de notre travail était de comparer les phénotypes des patients porteurs ou non d'une mutation inactivatrice du *CASR*.

**Les patients inclus** (118, 86 femmes, âge médian 63 (40-77)), suivis pour une anomalie du bilan phosphocalcique non expliquée par une hyperparathyroïdie ou une hypertension pulmonaire, avaient bénéficié d'un séquençage du gène *CASR* après consentement éclairé. Les patients sous diurétiques, bisphosphonates, lithium, présentant une insuffisance rénale, des anticorps antiCaSR ou une mutation activatrice étaient exclus. Le sexe, l'âge, les lithiases rénales, l'ostéodensitométrie, la calcémie, phosphatémie, créatininémie, 25OHvitD, PTH, calciurie des 24h et CaCl/CrCl étaient comparés selon la calcémie $<100$ , 100-105,  $>105$  mg/L et selon le génotype du *CASR*.

**Les patients mutés** pour *CASR* (21) montraient une PTH plus basse(50 (32-91) vs. 83(52-107) pg/mL) que les non mutés, avec une absence de différence de 25OHvitD (27(21-35) vs. 23(15,5-33)ng/mL), calciurie (120(45-183) vs. 123(65-188)mg/24h) et CaCl/CrCl (0,01(0-0,02) vs. 0,01 (0,01-0,02)). Les patients non mutés incluait 45 patients normaux pour *CASR*, 44 avec variant hétérozygote, 8 avec variant homozygote ou hétérozygote composite. La comparaison de ces 3 sous groupes montrait aussi une différence concernant la PTH (0,0188). Une mutation de *CASR* et un variant étaient identifiés respectivement chez aucun et 53% des patients avec calcémie inférieure à 100mg/L, 14 et 50% des calcémies entre 100 et 105mg/L et 23 et 40% des calcémie $>105$ mg/L.

**Conclusion** : 50% des patients avec calcémie $<105$ mg/l montraient un variant du *CASR* et 22% des patients avec calcémie $>105$ mg/L avaient une mutation de *CASR*, avec une PTH plus faible mais sans différence de calciurie ou de CaCl/CrCl en présence d'une 25OHvit D similaire. Le rapport calcium/PTH pourrait être un meilleur marqueur de la présence d'une mutation de *CASR* que CaCl/CrCl.

**Composition du Jury :**

**Président : Professeur Wemeau**

**Assesseurs** : Professeur Carnaille, Professeur Desailoud, Docteur Odou, Professeur Vantghem