

# LE RÉCEPTEUR DU CALCIUM : DE LA BIOLOGIE À LA CLINIQUE

par

P. HOUILLIER\*

Pour la plupart, les cellules des organismes pluricellulaires ne sont pas directement en contact avec le milieu extérieur. Au contraire, leur environnement immédiat est ce qu'il est convenu d'appeler, depuis Claude Bernard, le milieu intérieur. Le maintien de la composition du milieu intérieur dans des limites relativement étroites est une des conditions de la survie des cellules et, au-delà, de l'organisme qu'elles composent. Les processus utilisés pour maintenir raisonnablement stable la composition de cet environnement sont extrêmement variés, et leur exposé dépasse largement le cadre de cette revue mais ils nécessitent tous de percevoir, analyser et intégrer les caractéristiques de l'environnement intérieur et leurs changements de manière à mettre en place les adaptations à visée homéostatique appropriées.

Au-delà de la simple survie, le comportement des individus doit également être adapté à l'environnement externe et, pour cela, le percevoir. Encore faut-il que les informations pertinentes puissent être captées, transmises et, finalement, intégrées. Afin de capter ces informations, les organismes multicellulaires ont progressivement développé une panoplie toujours plus complète et complexe de récepteurs ayant pour but d'informer sur l'état de l'environnement et/ou de ses changements.

Le récepteur du calcium CaR est un récepteur multiligands qui, par ses sites d'expression, joue un rôle important dans le maintien de la composition du milieu intérieur et, également, dans la perception de (certains aspects de) l'environnement.

\* Université Paris-Descartes, INSERM, Centre de Recherche des Cordeliers, UMRS 872 ; CNRS, ERL7226 ; Service de Physiologie, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris.

## LA FAMILLE C DES RÉCEPTEURS COUPLÉS AUX PROTÉINES G : UNE FAMILLE D'INFIDÈLES

Lorsque la notion de récepteur a émergé au début du xx<sup>e</sup> siècle, le concept était qu'à un récepteur s'associe un et un seul ligand, s'inspirant en cela des modèles qui avaient été développés pour les enzymes et leurs substrats [1]. En d'autres termes, chaque récepteur était fidèle à son ligand et n'interagissait qu'avec lui. Ce concept a été largement vérifié, de nombreux récepteurs n'acceptant qu'un ligand et un seul, à tel point qu'un récepteur porte souvent le nom de son ligand (le récepteur de la TSH, le récepteur du glucagon, etc.). Néanmoins, certains récepteurs peuvent accepter plus d'un ligand. C'est le cas, par exemple, du récepteur des minéralocorticoïdes qui peut également lier les glucocorticoïdes, ou du récepteur de la PTH qui peut lier la PTH-rP. Plus récemment, plusieurs récepteurs ont été identifiés qui sont capables de lier non pas seulement deux mais une variété de ligands. C'est le cas des récepteurs du goût, exprimés dans les papilles gustatives et, également, le long du tractus digestif.

Ces récepteurs appartiennent à la même famille que le récepteur du calcium (CaR) qui, contrairement à ce que son nom pourrait laisser penser, est également un récepteur capable d'accepter de multiples partenaires.

Ces récepteurs appartiennent à la famille C des récepteurs à 7 domaines transmembranaires qui comprend, également, les huit récepteurs métabotropiques du glutamate, les deux récepteurs B de l'acide gamma-aminobutyrique et le récepteur GPRC6A.

Structurellement (Figure 1), ces récepteurs s'expriment toujours sous forme de dimères (d'homodimère dans le cas de CaR), chaque monomère se caractérise par un grand domaine extracellulaire, incluant une séquence VFT (*venus flytrap*, nom anglais de la dionée) qui contient les domaines de dimérisation ainsi que les sites orthostériques de liaison des agonistes endogènes. Le domaine extracellulaire est relié aux sept domaines transmembranaires par une séquence particulière riche en cystéine (CRD, pour *cystein-rich domain*). Ce dernier domaine contient neuf résidus cystéine, formant quatre ponts disulfure à l'intérieur du domaine et un pont disulfure supplémentaire avec le domaine VFT. Ces neuf résidus cystéine sont strictement indispensables à la fonction du récepteur, indiquant que la rigidité du domaine riche en cystéine et celle de la liaison au domaine VFT sont essentielles pour la fonction des récepteurs de la famille C [2, 3]. 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 de CaR, C-terminale, possède 5 sites de phosphorylation par les protéine kinases C (PKC) et 2 sites de phosphorylation par les protéine kinases A [4]. Les phosphorylations dans les sites cibles des PKC, en particulier T888, inhibent l'activation par CaR de la phospholipase C, une voie majeure de signalisation induite par le récepteur, fournissant ainsi une voie de rétrocontrôle négatif puisque l'activation de CaR aboutit à activer plusieurs PKC.

Le site de liaison orthostérique se situe dans l'espace compris entre les deux lobes du domaine VFT. Par analogie avec ce qui a été observé avec le récepteur métabotrope du glutamate de type 1, l'événement initial de la transmission du signal entre le domaine extracellulaire et le domaine intracellulaire est la fermeture d'un domaine VFT conduisant à la rotation de 70° de l'interface des dimères, ce

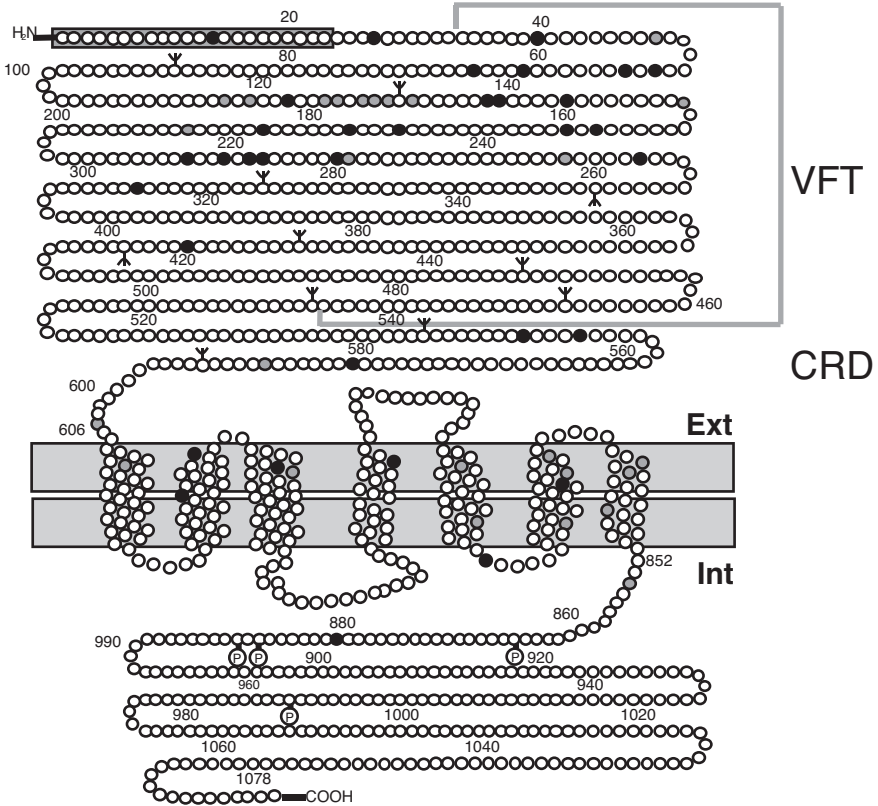


FIG. 1. – Structure prédite du récepteur du calcium (voir le texte pour les détails). VFT : séquence *venys flytrap* ; CRD : *cystein-rich domain*.

qui aboutit au rapprochement des domaines riches en cystéine et des 7 domaines transmembranaires de chacun des monomères [5]. Tout semble se passer comme si le domaine riche en cystéine se comportait comme un levier rigide transférant l'énergie des modifications conformationnelles du domaine VFT vers les domaines transmembranaires, mais le mécanisme exact de l'activation de ces domaines transmembranaires reste à établir plus précisément.

De manière remarquable, le comportement des récepteurs de la famille C vis-à-vis des différents ligands est très hétérogène. Les récepteurs métabotropiques du glutamate ne reconnaissent comme ligand que le L-glutamate. À l'opposé, le récepteur du calcium, le récepteur GPRC6A et les récepteurs du goût T1R1/T1R3 peuvent lier une grande variété d'acides aminés.

Le récepteur du calcium perçoit la concentration de 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 (pour revue, voir [6, 7]). Le récepteur du calcium est également activé par d'autres cations inorganiques dont le magnésium, le baryum, le strontium lorsqu'ils sont présents à concentration millimolaire, ainsi que par le gadolinium à concentration micromolaire [8, 9]. Les liaisons du calcium et du magnésium sont caractérisées par une

coopérativité positive (coefficient de Hill entre 3 et 5 [9-11]). Cette coopérativité explique que des modifications minimales de la concentration d'agonistes puissent être détectées par le récepteur.

Le récepteur du calcium détecte également les concentrations de L-acides aminés. Cela étant, les acides aminés se comportent plus comme des modulateurs de la sensibilité du récepteur vis-à-vis de ses ligands naturels (calcium et magnésium) que comme des agonistes directs du récepteur. Les plus puissants activateurs du récepteur du calcium sont les acides aminés aromatiques L-phénylalanine et L-tryptophane, suivis par les acides aminés aliphatiques et les acides aminés polaires [12].

D'autres modulateurs positifs du récepteur du calcium ont été identifiés, dont des cations polyvalents (spermine, spermidine), des peptides  $\beta$ -amyloïdes, des antibiotiques aminoglycosidiques, ainsi que les augmentations du pH ou de la force ionique du milieu extracellulaire [13, 14]. Enfin, en plus de ces modulations allostériques qui s'exercent sur le domaine VFT, le récepteur du calcium possède un site allostérique activateur ainsi qu'un site allostérique inhibiteur dans les domaines transmembranaires [15, 16].

Les sites de liaison du calcium à son récepteur sont certainement situés dans le domaine VFT [10, 17]. Cependant, les résidus précisément impliqués dans la liaison du calcium n'ont pas encore été identifiés avec certitude. Cinq résidus (S147, S170, D190, Y218, E297) sont probablement impliqués dans la liaison du calcium puisque leur mutation entraîne une diminution significative de la sensibilité du récepteur au calcium et aux autres cations. Trois résidus supplémentaires (Q193, F270 et S296), situés dans l'espace entre les deux lobes du domaine VFT, font également partie des sites de liaison des cations [18]. Enfin, et plus récemment, deux autres sites de liaison ont été identifiés en position E378 et E398 [19]. Les sites de liaison des acides aminés sont encore plus imprécis. Néanmoins, les résidus T145 et S170 pourraient être impliqués de même que les sérines S169-171 [19-21].

## **CaR : UNE PROTÉINE CLÉ DE L'HOMÉOSTASIE DU CALCIUM, ET AU-DELÀ**

La concentration extracellulaire de calcium libre (ionisé) est une grandeur étroitement régulée : elle est normalement comprise entre 2,10 et 2,50 mmol/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 [22]. 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 permet de corriger rapidement tout écart de la calcémie à sa valeur d'équilibre. Une baisse de la calcémie provoque, en quelques secondes, une augmentation de la sécrétion de PTH et, en quelques minutes, de ses effets biologiques : sous l'influence de cet excès de sécrétion, la résorption osseuse nette et la réabsorption tubulaire rénale du calcium filtré augmentent. Ainsi, la calcémie se normalise, entraînant de ce fait le retour de la sécrétion de PTH à sa valeur initiale, ce qui permet au système de se maintenir en équilibre (Figure 2). Inversement, une élévation de la calcémie induit rapidement une diminution de la sécrétion et de la concentration sérique de PTH, de manière à faciliter le retour de la calcémie à sa valeur normale. Une seconde hormone, la

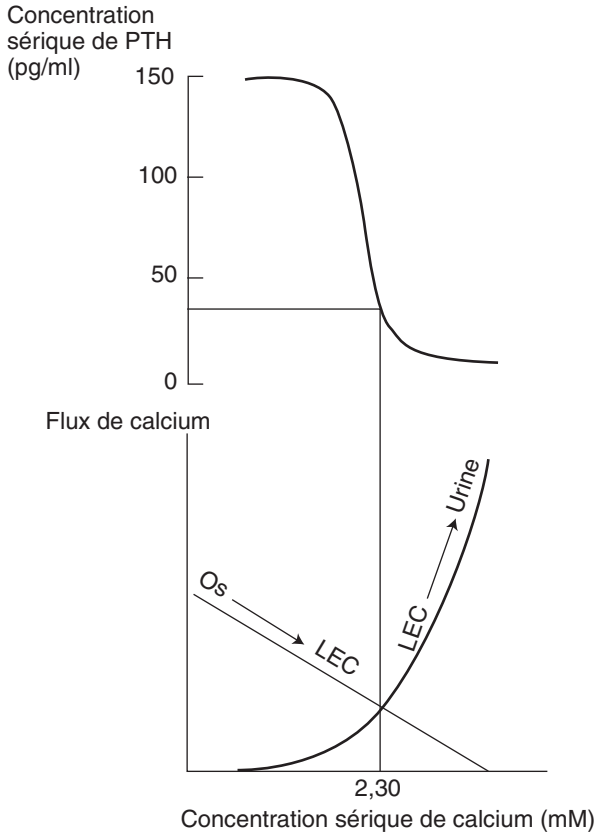


FIG. 2. – Mécanismes impliqués dans le maintien d'une calcémie normale chez les mammifères. En l'absence d'apports alimentaires, la calcémie est maintenue à une valeur stable parce que la perte rénale obligatoire de calcium est exactement compensée par la libération osseuse d'une quantité équivalente. La quantité de calcium perdue par voie urinaire et la quantité de calcium libérée par l'os sont, en partie sous le contrôle de l'hormone parathyroïdienne, ce qui explique que la calcémie d'équilibre soit plus basse en l'absence de cette hormone qu'en sa présence. La concentration d'hormone parathyroïdienne à un instant donné dépend largement de la calcémie. Une diminution de la calcémie inhibe le récepteur du calcium présent dans les cellules parathyroïdiennes et, ainsi, augmente la sécrétion et la concentration de l'hormone qui, en retour, agit sur le tubule rénal en activant la réabsorption de calcium et l'os en augmentant la libération de calcium. Cela aboutit au retour de la calcémie à sa valeur d'équilibre. Le récepteur du calcium exprimé dans le tubule rénal participe également à l'augmentation de la réabsorption du calcium lorsque la calcémie diminue. En revanche, il n'y a pas d'argument en faveur d'un rôle homéostatique du récepteur du calcium exprimé par certaines cellules osseuses.

1,25(OH)<sub>2</sub>vitamine D ou calcitriol, exerce un rôle important dans le contrôle de la calcémie et du bilan de calcium. Étant une hormone stéroïde, son délai d'action sur le rein, l'os et l'intestin ne lui permet cependant pas d'intervenir dans le maintien à court terme de la calcémie. Une concentration de calcitriol normale est néanmoins nécessaire à l'expression normale des effets biologiques de la PTH [23].

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. De l'interaction entre ces deux variables dépend l'état d'équilibre du système. De surcroît, 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 et la peau [24] (Figure 3).

### CaR est un déterminant majeur de la sécrétion d'hormone parathyroïdienne

Une relation étroite a été démontrée chez l'homme normal, in vivo [25-28] et in vitro [28, 29] entre la concentration de calcium ionisé ( $\text{Ca}^{2+}$ ) extracellulaire et la sécrétion de PTH : cette relation est une sigmoïde inverse, qui peut être décrite à l'aide de quatre paramètres : les valeurs de sécrétion maximale et minimale, la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  à laquelle la sécrétion de PTH est la moitié de la suppression maximale (point moyen de sécrétion ou « *set-point* »), et la pente maximale de la relation (au voisinage du *set-point*) (voir Figure 2).

La valeur de sécrétion maximale représente la réserve de sécrétion des parathyroïdes lorsqu'elles sont soumises à une hypocalcémie aiguë suffisamment intense. La valeur de sécrétion minimale n'est jamais nulle, même en présence de calcémies très élevées : ainsi, une augmentation de la masse de tissu parathyroïdien entraîne une

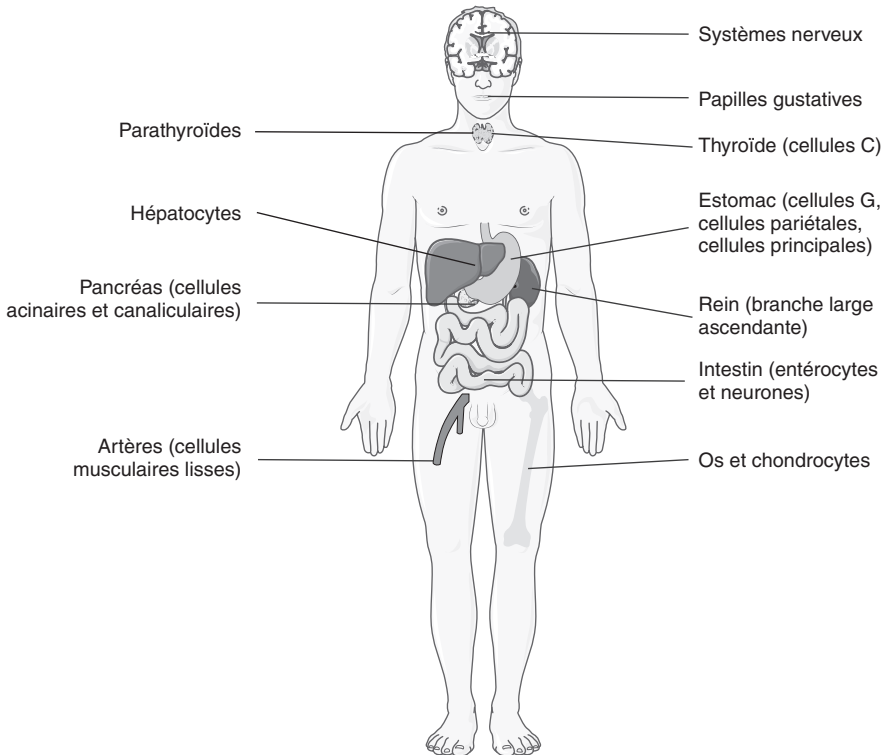


FIG. 3. – Principaux sites d'expression du récepteur du calcium CaR chez l'homme.

augmentation proportionnelle de la sécrétion de PTH en situation d'hypercalcémie, alors même que la réponse cellulaire individuelle à l'hypercalcémie n'est pas altérée.

Le *set-point* des cellules parathyroïdiennes normales est aux alentours de 1,10 à 1,15 mmol [29, 30], valeurs proches de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire à jeun (1,15 à 1,35 mmol). Ce paramètre joue un rôle important dans le maintien de la valeur de la calcémie à l'intérieur de la zone normale. In vivo, la valeur de  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire à jeun est cependant plus élevée que la valeur du *set-point*, et la sécrétion basale de PTH est environ le quart de la sécrétion maximale [25]. Ainsi, en situation normale, la capacité d'augmentation de la sécrétion de PTH afin de contrer une hypocalcémie est grande, permettant d'empêcher efficacement la survenue d'une hypocalcémie dans la vie quotidienne. Du fait de la situation du *set-point* dans la zone de plus grande pente de la relation, de faibles variations de calcémie entraînent de grandes variations de la sécrétion de PTH, permettant ainsi de maintenir la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  à l'intérieur de valeurs étroites.

La première réponse des glandes parathyroïdes à une modification de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire est déterminée par la relation sigmoïde entre la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire et la sécrétion de PTH. Cette réponse intervient rapidement (en quelques secondes), tant in vivo [31] qu'in vitro [32, 33]. Par ailleurs, l'intensité de la réponse parathyroïdienne semble dépendre non seulement de l'amplitude de la variation de la calcémie, mais aussi de la rapidité avec laquelle la calcémie se modifie : une diminution brutale de 2 à 3 % de la calcémie induit une augmentation de la sécrétion de PTH qui peut atteindre 400 % (soit une amplification de 150 à 200), alors qu'une diminution lente, mais de même intensité, de la calcémie provoque une réponse nettement plus modérée [34].

Le comportement des cellules parathyroïdiennes vis-à-vis de la concentration plasmatique de calcium est très particulier et insolite par rapport aux autres types de cellules endocrines. En effet, d'une part, la plupart des cellules endocrines ne sont pas affectées par les modifications de la concentration de calcium extracellulaire et, d'autre part, l'élévation de la concentration de calcium cytosolique ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) stimule habituellement les sécrétions hormonales. Inversement, il existe, dans les cellules parathyroïdiennes, une relation étroite, positive, entre la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire et  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ; de plus, l'élévation de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  inhibe la sécrétion de PTH. Cette relation très particulière est sous-tendue par l'expression, par les cellules parathyroïdiennes, du récepteur du calcium CaR. L'activation de CaR provoque une augmentation de la fréquence et de l'amplitude des variations de la concentration intracellulaire de calcium, une activation de protéine kinases C, phospholipases A2 et D, et une inhibition de protéine kinase A. Dans la membrane plasmique, CaR est exprimé avec des protéines chaperonnes telles que cavéoline-1 et filamine [35-37] ; par l'intermédiaire d'interactions variables avec ces protéines, CaR active également des voies MAP kinase et JNK.

La modulation de l'activation de CaR par le calcium extracellulaire ne régule pas seulement la sécrétion de PTH mais également l'expression du gène de la préproPTH et la prolifération des cellules parathyroïdiennes. Un élément de réponse au calcium (CaRE, pour *calcium response element*) est situé 3,6 kb en amont du gène de la préproPTH et régule négativement l'expression du gène. Enfin, la diminution de l'expression de CaR s'accompagne d'une hyperplasie parathyroïdienne.

Le rôle essentiel joué par CaR dans le contrôle de la sécrétion de PTH, le maintien de la calcémie et l'abondance de tissu parathyroïdien est illustré par les modifications observées lors des pertes ou gains de fonction de ce récepteur (*voir* ci-dessous).

## CaR est un déterminant majeur de la réabsorption tubulaire rénale de calcium

L'hormone parathyroïdienne, dont la concentration augmente lorsque la calcémie diminue, augmente la réabsorption tubulaire rénale de calcium, en agissant sur son récepteur de type 1 présent dans la branche ascendante large de l'anse de Henle et dans le tubule distal/tubule connecteur. Elle augmente également la synthèse du calcitriol par les cellules du tubule proximal.

Peu après la découverte du récepteur du calcium, son expression dans le rein a été établie. Cependant, aujourd'hui encore, la localisation précise du récepteur du calcium dans les cellules tubulaires rénales fait l'objet de débats. Certains auteurs ont décrit l'expression du récepteur du calcium dans un grand nombre de structures tubulaires : le tubule proximal, la branche large ascendante de l'anse de Henle, le tubule distal et les cellules intercalaires A du canal collecteur [38]. D'autres auteurs ont décrit une expression beaucoup plus restreinte, limitée aux cellules de la branche ascendante au large de l'anse de Henle dans lesquelles le récepteur est exprimé dans la membrane basolatérale [A. Loupy et coll., manuscrit soumis pour publication].

Il existe donc un accord sur le fait que les cellules de la branche large ascendante expriment le récepteur du calcium. Ce site est également un des segments tubulaires importants pour la réabsorption de calcium : environ 25 % du calcium filtré est réabsorbé à cet endroit.

Le mécanisme responsable de la réabsorption de calcium dans ce segment est maintenant bien connu : la réabsorption nécessite l'existence d'une différence de potentiel transépithéliale, lumière positive, et d'une perméabilité au calcium de la voie paracellulaire. La création de la différence de potentiel repose sur les propriétés de perméabilité ionique des membranes apicale et basolatérale. En effet, l'absorption de chlorure de sodium par le cotransporteur apical NKCC2 est suivie de la rétrodiffusion du potassium du cytosol vers la lumière tubulaire par un canal présent dans la membrane apicale, ROMK2. Cette rétrodiffusion hyperpolarise la membrane apicale. L'ion chlorure, qui est entré dans la cellule en même temps que le sodium et le potassium, en sort en empruntant un canal situé dans la membrane basolatérale, CIC-kb. La diffusion électrogénique du chlore dépolairise la membrane basolatérale. Du fait de la réabsorption de chlorure de sodium, le potentiel des membranes apicale et basolatérale est donc différent, créant ainsi la différence de potentiel transépithéliale, moteur de la réabsorption du calcium. La perméabilité au calcium de la voie paracellulaire requiert, au minimum, l'expression des protéines claudine-16 et -19, situées dans la jonction serrée de l'épithélium.

Tous les auteurs s'accordent sur le fait que l'activation du récepteur du calcium diminue la réabsorption de calcium par les cellules de la branche large ascendante. Cependant, les opinions divergent quant aux mécanismes impliqués. La théorie classique, développée par le groupe de Steve Hebert, est que l'activation du récepteur du calcium inhibe l'activité du canal ROMK ; par voie de conséquence, elle diminue la différence de potentiel transépithéliale, puis la réabsorption de calcium [39]. Cette théorie est soutenue par le fait que certains auteurs, mais pas tous, ont observé qu'une concentration de calcium élevée, du côté basolatéral, diminue la différence de potentiel transépithéliale [40]. Cet effet du calcium périrubulaire n'a cependant pas été reproduit par des agonistes plus spécifiques du récepteur du calcium.



D'autres auteurs n'ont observé aucune variation du transport de chlorure de sodium ou de la différence de potentiel transépithéliale en réponse aux variations d'activité du récepteur du calcium, suggérant que ce récepteur module directement la perméabilité au calcium de la voie paracellulaire [41, 42]. Récemment, nous avons utilisé des modulateurs très spécifiques de l'activité du récepteur du calcium et observé qu'ils permettent effectivement de faire varier le transport transépithélial de calcium sans altérer ni le transport de chlorure de sodium ni la différence de potentiel transépithéliale. Des mesures directes de la perméabilité épithéliale au calcium ont montré que le récepteur du calcium est un inhibiteur de cette perméabilité [A. Loupy et coll., manuscrit soumis pour publication].

### **CaR est impliqué dans le développement osseux mais n'altère pas le métabolisme du calcium**

L'inactivation complète de *CaR* est létale [43] : les animaux privés des deux copies du gène de *CaR* 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 [43]. En utilisant une stratégie de double inactivation de *CaR* et soit du gène de la PTH, soit d'un gène maître du développement parathyroïdien, *Gcm2*, deux groupes ont indépendamment montré en 2003 que, lorsque l'hyperparathyroïdie est prévenue, l'inactivation complète de *CaR* n'est plus létale et que le phénotype osseux disparaît [44, 45]. Ces résultats suggèrent que *CaR*, 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 de *CaR* 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 de *CaR* restreinte aux cellules de la lignée ostéoblastique a été étudiée récemment [46]. Les souris n'exprimant plus *CaR* 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 [46]. En revanche, aucune anomalie de la calcémie n'a été décrite chez ces animaux [46].

L'invalidation spécifique de *CaR* 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 [46].

### **CaR est exprimé dans le tube digestif**

*CaR* est abondamment exprimé par les cellules épithéliales et les neurones du système nerveux entérique dans l'estomac, l'intestin grêle et le côlon. Plus précisément, *CaR* est exprimé par les cellules pariétales gastriques qui sécrètent l'acide chlorhydrique, les cellules principales sécrétrices de pepsinogène et les cellules muqueuses de la surface de l'épithélium gastrique [47]. Il est également exprimé par les cellules G de l'antrum gastrique sécrétrices de gastrine [48, 49], par la membrane basolatérale des cellules villosités et cryptiques de l'intestin grêle, les cellules de

Brünner et les cellules épithéliales cryptiques du côlon [50]. Enfin, il est exprimé par les cellules des acini et des canaux pancréatiques [51] et les hépatocytes [52].

Gardant en mémoire que CaR est un récepteur du calcium mais également de certains acides aminés, plusieurs rôles peuvent lui être attribués dans le tube digestif. Ainsi, la libération d'acides aminés par la digestion des protéines dans l'estomac stimule la sécrétion de gastrine (et de pepsinogène) [53]. L'élévation de la concentration sanguine d'acides aminés qui se produit dès que les acides aminés issus de la digestion commencent à être absorbés par l'épithélium intestinal augmente également la sécrétion de gastrine et celle de cholécystokinine [53], cette dernière régulant la sécrétion enzymatique pancréatique. Les acides aminés dans le sang porte peuvent activer grâce à CaR la sécrétion biliaire par les hépatocytes [52]. CaR, exprimé par les neurones myentériques, pourrait ralentir le transit et favoriser l'absorption des nutriments. Enfin, CaR exprimé dans le côlon favorise l'absorption nette d'eau et d'électrolytes en inhibant la sécrétion du fluide riche en chlore par les cellules cryptiques.

Curieusement, l'implication de CaR intestinal dans le contrôle de l'absorption intestinale de calcium n'est toujours pas clairement établie.

### **D'autres fonctions de CaR**

De nombreux autres effets rénaux ont été attribués à CaR. Par exemple, l'hypercalcémie provoque une augmentation de l'excrétion urinaire d'eau, de NaCl et d'ion H<sup>+</sup>. Plusieurs études ex vivo ont permis de reproduire sur le tubule rénal isolé les effets de l'hypercalcémie sur ces trois transports [40, 54, 55]. Néanmoins, les preuves que ces effets soient réellement dus à l'activation de CaR sont loin d'être toutes réunies. Nous avons récemment étudié les effets respectifs de l'hypercalcémie et de calcimimétiques chez des animaux thyroparathyroïdectomisés et recevant de la PTH à dose fixe [R. de la Faille et coll., manuscrit soumis pour publication]. Les effets de l'hypercalcémie sont conformes à ce qui a déjà été observé dans d'autres études : elle provoque une nette augmentation de l'excrétion urinaire de calcium, de NaCl, d'eau et d'acide, indépendamment des variations de la concentration de PTH. Les effets des calcimimétiques sont beaucoup plus restreints, limités aux variations de l'excrétion urinaire de calcium et de la calcémie, sans aucun effet sur les autres bilans. Cette dissociation entre les effets de l'hypercalcémie et ceux des agonistes allostériques de CaR est compatible avec l'existence d'autres récepteurs du calcium que CaR.

## **LES PATHOLOGIES DE CaR**

### **Hypercalcémie familiale bénigne (OMIM 14598)**

L'hypercalcémie familiale bénigne (hypercalcémie hypocalciurie familiale) est une maladie autosomique dominante avec un haut degré de pénétrance caractérisée par une hypercalcémie le plus souvent asymptomatique qui dure toute la vie, associée à une excrétion rénale de calcium comparativement basse [56, 57]. Typiquement,

la concentration circulante de parathormone est normale, inappropriée et la magnésémie est modérément élevée ou dans les valeurs hautes de la normale ; néanmoins, la concentration de PTH peut être élevée chez 20 % des sujets rendant alors le diagnostic avec une hyperparathyroïdie primitive nettement plus délicat [58]. Les seuls symptômes présents sont, parfois, une pancréatite et une chondrocalcinose. Le comportement rénal du calcium est clairement anormal chez ces sujets, puisque la calciurie est soit basse, soit normale, mais jamais aussi élevée qu'on ne pourrait l'attendre compte tenu de la valeur de la calcémie [56, 57, 58]. Cette hypocalciurie (relative ou absolue) se traduit biologiquement par une excrétion fractionnelle du calcium inférieure à 1 % et est indépendante de la présence de la PTH, puisqu'elle persiste chez les sujets ayant subi une parathyroïdectomie totale. L'explication de cette hypocalciurie réside très vraisemblablement dans le fait que le récepteur du calcium présent dans les parathyroïdes s'exprime aussi dans la membrane basolatérale des cellules de la branche large ascendante de l'anse de Henle. Lorsque CaR est l'objet d'une mutation inactivatrice, d'une part les cellules parathyroïdiennes deviennent résistantes à l'action inhibitrice de la calcémie sur la sécrétion de PTH, ce qui explique que la sécrétion de PTH s'élève, entraîne l'apparition de l'hypercalcémie qui permet le retour de la sécrétion de PTH à une valeur normale [59] ; d'autre part, la même mutation du même récepteur dans les cellules de la branche large ascendante explique que l'hypercalcémie n'entraîne pas l'inhibition normalement attendue de la réabsorption de calcium dans l'anse de Henle et que la calciurie ne s'élève pas.

### **Hypercalcémie néonatale sévère (OMIM 239200)**

De mariages consanguins dans des fratries atteintes d'hypercalcémie familiale bénigne ou de l'union de deux individus non apparentés atteints d'HFB peuvent naître des enfants ayant une hyperparathyroïdie primitive néonatale sévère [57] dont les manifestations sont précoces et bruyantes. Classiquement, ces enfants ont une hypercalcémie marquée, menaçant le pronostic vital et souffrent de retard de croissance, de déshydratation, de déminéralisation osseuse, de déformations de la cage thoracique, de multiples fractures et d'hypotonie dans les premières semaines de vie, ces complications nécessitant souvent une parathyroïdectomie totale salvatrice [57]. La calcémie peut atteindre des valeurs extrêmement élevées et la concentration de PTH est souvent supérieure à 500 pg/ml. Ce tableau est fidèlement reproduit chez la souris par l'invalidation homozygote du gène du CaR [43].

Le mode de transmission de ces deux maladies avait suggéré qu'elles puissent représenter un dosage différent d'une même mutation, l'hypercalcémie familiale bénigne étant la forme hétérozygote et l'hyperparathyroïdie néonatale sévère la forme homozygote. Ces hypothèses ont été, en partie, confirmées : classiquement, un allèle du gène codant le récepteur du calcium (qui siège sur le bras long du chromosome 3 chez l'homme) [60] est muté dans l'hypercalcémie familiale bénigne alors que les deux allèles sont le siège d'une mutation dans l'hyperparathyroïdie néonatale sévère, chaque parent ayant transmis son allèle muté à l'enfant.

Plusieurs centaines de mutations ont été décrites à ce jour. Habituellement, chaque famille possède sa propre mutation [61] qui est, le plus fréquemment, une mutation de type «faux-sens» dans la partie codante du génome aboutissant à un changement d'acide aminé. Le plus souvent, les mutations siègent dans les exons 2 et 3 qui codent

pour la grande portion aminoterminal extracellulaire et sont donc susceptibles d'affecter la liaison du calcium extracellulaire au récepteur. Lorsqu'un récepteur muté est exprimé dans un œuf de xénope, une réponse très atténuée aux variations du calcium extracellulaire est effectivement observée [62]. Plus rarement, les familles possèdent une anomalie non pas sur le chromosome 3 mais sur le chromosome 19. Un premier locus a été localisé en 19p13.3 [63]. Un second locus a été identifié en 19q13 dans une famille atteinte de la variante Oklahoma du syndrome d'hypercalcémie familiale bénigne [64] ; cette variante se caractérise par une concentration sérique de PTH élevée chez les patients âgés de plus de 30 ans et la possible survenue d'une ostéomalacie [65]. Cette hétérogénéité génétique indique soit l'existence d'autres récepteurs du calcium, soit l'implication, dans la pathogénie du syndrome, d'étapes situées en aval du CaR.

Finalement, l'hyperparathyroïdie néonatale sévère ne résulte pas toujours de l'union de sujets hétérozygotes (apparentés ou non) atteints d'hypercalcémie familiale bénigne puisque des cas, de plus en plus nombreux, ont été observés où le patient est hétérozygote pour la mutation (mutation de novo ou transmission par un seul des deux parents). Une explication possible est que le récepteur produit par le gène muté exerce un effet dominant négatif sur le récepteur sain. Dans ces conditions, CaR étant exprimé dans la membrane plasmique sous forme dimérique, seul un quart des dimères fonctionne normalement, réduisant considérablement la capacité des cellules à percevoir les variations de la concentration extracellulaire de calcium et à y répondre de manière appropriée. Certaines mutations (R185Q et R795W) exercent effectivement, *in vitro*, un tel effet dominant négatif [66]. Les facteurs responsables du phénotype dû à telle ou telle mutation ne sont, en réalité, que très partiellement connus.

### **Hypocalcémie autosomique dominante (OMIM 601298)**

L'hypocalcémie autosomique dominante se caractérise par une hypocalcémie assez fréquemment symptomatique (paresthésies, crises de tétanie, convulsions), associée à une concentration sérique de PTH normale basse ou franchement basse, toujours inadaptée à l'hypocalcémie et, souvent, une hypomagnésémie ; la calciurie est normale ou élevée, toujours inappropriée à la valeur de calcémie. Surtout, le traitement par vitamine D peut s'accompagner d'une augmentation marquée de la calciurie, de la survenue d'une néphrocalcinose et d'une insuffisance rénale [67, 68]. L'hypercalciurie est vraisemblablement la conséquence de l'activation constitutionnelle du CaR rénal qui déprime la réabsorption tubulaire du calcium filtré, soulignant le rôle essentiel de cette protéine dans le contrôle de la calciurie.

Dans la plupart des familles décrites, les sujets atteints ont une mutation hétérozygote (de type faux-sens) dans les exons codant le domaine extracellulaire du récepteur [67, 68]. Néanmoins, plusieurs mutations affectant les domaines transmembranaires ont été décrites [69, 70] ; une grande délétion de la portion carboxyterminale du récepteur a été décrite dans une famille atteinte d'hypocalcémie autosomique dominante, associée à un effet dominant positif du récepteur muté sur le récepteur sauvage [71].

L'expression dans des œufs de xénope du récepteur possédant ces mutations aboutit à une augmentation de la production d'inositol triphosphate, par rapport au

récepteur de type sauvage, à la fois aux faibles et fortes concentrations de calcium extracellulaire, témoignant du gain de fonction conféré par la mutation. Un tel comportement explique parfaitement l'insuffisance de sécrétion de parathormone pour des valeurs basses de calcémie et donc le tableau biologique d'hypocalcémie chronique [68].

La principale difficulté rencontrée dans ce syndrome est d'ordre thérapeutique, puisque le traitement de l'hypocalcémie par le calcium et la vitamine D entraîne une élévation massive de la calciurie exposant aux risques de néphrocalcinose et d'insuffisance rénale. L'existence de ces risques doit conduire à ne proposer ce traitement qu'aux patients symptomatiques.

Deux groupes ont indépendamment décrit l'association d'une hypocalcémie autosomique dominante et d'un syndrome de Bartter [72, 73] chez des patients porteurs hétérozygotes de mutations faux-sens de CaR (L125P, C131W, A843E). Cette association est cependant rarissime. L'hypothèse émise pour expliquer que des mutants hyperactifs de CaR provoquent une perte rénale de Ca était que l'activation de CaR inhibe la réabsorption de NaCl dans l'anse de Henle. En raison de résultats expérimentaux tendant à prouver que CaR ne modifie pas, en réalité, le transport de NaCl par le tubule rénal et que CaR n'est exprimé que dans la branche large de l'anse de Henle, une autre explication doit être trouvée. Il est possible que les mutations décrites produisent des mutants qui interagissent directement avec un ou plusieurs des transporteurs de NaCl, interactions qui sont prévenues dans le cas d'une protéine normale.

### **CaR et maladies auto-immunes**

L'auto-immunité est une cause fréquente d'hypoparathyroïdie, le plus souvent sous la forme d'une hypoparathyroïdie isolée et plus rarement dans le cadre de syndromes plus complexes, tels que les syndromes polyglandulaires auto-immuns [74, 75]. La première identification d'anticorps anti-parathyroïdiens remonte à 1966 [76]. La mise en évidence d'anticorps anti-CaR a suivi de peu la découverte de CaR [77]. Plusieurs contributions ont, depuis, décrit la présence d'anticorps anti-CaR chez des patients hypoparathyroïdiens, sans qu'il soit possible de démontrer la pathogénicité de ces anticorps [78-81]. Plus originale a été la contribution de Kifor et coll. démontrant que certains autoanticorps pouvaient être activateurs de CaR, sans détruire les parathyroïdes, et expliquer ainsi l'hypocalcémie [82]. Le même groupe a également apporté la possibilité d'autoanticorps inactivateurs de CaR et responsables d'un syndrome acquis d'hypercalcémie hypocalciurique [83]. Cette possibilité a été ultérieurement confirmée [84, 85].

### **Polymorphismes de CaR**

Six polymorphismes nucléotidiques ont été observés dans le gène *CAR* : l'un est situé dans l'intron 5 juste avant l'exon 6 (IVS 5-88t/c) et les autres dans l'exon 7 (A826T, C851S, A986S, R990G, Q1011E). Il y a peu d'arguments en faveur de la réelle pathogénicité de ces polymorphismes nucléotidiques mais il est possible que le polymorphisme R990G favorise l'expression d'une hypercalciurie et donc la survenue d'une maladie lithiasique rénale [86].

## CaR et tumorigénèse [87]

En raison de son abondance dans les cellules parathyroïdiennes, le rôle du récepteur du calcium a évidemment été évalué dans les différents modèles de tumeurs parathyroïdiennes. L'expression du gène et de la protéine a régulièrement été trouvée diminuée dans les tumeurs de patients ayant une hyperparathyroïdie primitive. Cette association a été évoquée pour expliquer que l'effet inhibiteur de l'hypercalcémie sur la sécrétion d'hormone parathyroïdienne soit diminué chez ces patients. De même, la diminution de l'expression du récepteur du calcium a été impliquée dans les phénomènes de prolifération de cellules parathyroïdiennes. Cependant, s'il est clair que, chez la souris, l'absence totale de la protéine du récepteur du calcium entraîne une augmentation considérable de la masse de tissu parathyroïdien et de la sécrétion d'hormone parathyroïdienne, le lien de causalité entre la diminution de l'expression du récepteur et la prolifération du tissu parathyroïdien est moins claire chez l'homme.

De manière notable, les modifications de l'expression du récepteur du calcium dans les tumeurs parathyroïdiennes ne sont pas la conséquence de mutation du gène.

Un élément en défaveur du caractère initiateur de la diminution de l'expression du récepteur du calcium dans les tumeurs parathyroïdiennes est précisément que cette diminution est observée dans des situations aussi différentes, dans leur pathogénie, que l'adénome parathyroïdien, l'hyperplasie primaire, le carcinome parathyroïdien et l'hyperparathyroïdie secondaire à l'insuffisance rénale chronique. Dans le même ordre d'idées, les traitements utilisant des agonistes allostériques du récepteur du calcium sont efficaces, dans l'hyperparathyroïdie primaire ainsi que dans l'hyperparathyroïdie secondaire à l'insuffisance rénale, pour diminuer la sécrétion d'hormone parathyroïdienne ; en revanche, le fait qu'ils puissent entraîner, chez l'homme, une diminution de la masse de tissu parathyroïdien est controversé.

Un rôle pathogène du récepteur du calcium a été évoqué dans plusieurs autres tumeurs. Dans les cellules de cancer du sein et de cancer de la prostate, l'activation du récepteur du calcium stimule la production tumorale de PTH-rP qui, elle-même, favorise l'apparition de métastases osseuses [88, 89]. Cet effet est l'opposé de ce qui est observé dans les cellules normales, en particulier les cellules mammaires, où l'activation du récepteur du calcium diminue la sécrétion de PTH-rP. Ce dernier effet a été évoqué pour expliquer le caractère préventif des régimes riches en calcium vis-à-vis de la survenue de cancer du sein [90, 91].

À l'opposé, les cellules de cancer du côlon se caractérisent par une diminution de l'expression du récepteur du calcium dont l'intensité est reliée au caractère évolutif du cancer. Ici également, le récepteur du calcium a été proposé pour expliquer le rôle préventif des régimes alimentaires riches en calcium sur la survenue de cancer colique [92].

## AGIR SUR CaR POUR TRAITER...

L'intérêt de la communauté médicale vis-à-vis de CaR s'est évidemment accru lorsque sont apparus des médicaments ciblant CaR. Actuellement, un seul activateur de CaR est disponible en thérapeutique humaine (cinacalcet hydrochloride, commer-

cialisé en France sous le nom de Mimpara®). Cette molécule active CaR de manière allostérique et permet ainsi de diminuer la sécrétion d'hormone parathyroïdienne. Son usage a été approuvé dans le traitement de l'hyperparathyroïdie secondaire du patient atteint d'insuffisance rénale chronique terminale en dialyse ainsi que dans le traitement des patients atteints de carcinome parathyroïdien. Plus récemment, son indication a été étendue au traitement de l'hyperparathyroïdie primitive dont le traitement chirurgical n'est pas possible ou pas souhaitable. Dans toutes ces indications, il a démontré sa capacité à diminuer la sécrétion de PTH et, par voie de conséquence, la calcémie [93, 94].

Les effets des calcimimétiques ont été abondamment étudiés dans des modèles d'animaux urémiques. Dans ces modèles, les calcimimétiques permettent de diminuer non seulement la concentration sanguine de PTH et la calcémie, mais leur administration diminue également l'abondance de l'ARNm de la PTH [95], augmente l'expression de CaR et de VDR dans les cellules parathyroïdiennes [96], prévient le développement de l'hyperplasie parathyroïdienne [97], provoque la régression de l'hyperplasie lorsque celle-ci existe déjà [98] en favorisant l'apoptose des cellules parathyroïdiennes [99], réduit les conséquences osseuses de l'hyperparathyroïdie urémique [100]. Les calcimimétiques peuvent également ralentir la progression de la maladie rénale chronique, ainsi que la pression artérielle et la concentration de LDL-cholestérol [101] et diminuer le développement de calcifications vasculaires et d'athérosclérose [102].

Chez l'homme, le seul effet clairement démontré du cinacalcet est de diminuer la concentration sanguine de PTH, la calcémie, la phosphatémie et le produit calcium-phosphate sanguin [103]. Les potentiels effets sur l'hyperplasie parathyroïdienne et les effets vasculaires, chez l'homme, ne sont encore pas établis, de même que l'effet sur les événements cardiovasculaires. Une étude observationnelle récente, portant sur un peu plus de 19 000 sujets dialysés, les uns traités par cinacalcet, les autres pas, a rapporté que la mortalité globale et la mortalité par événement cardiovasculaire étaient significativement plus faibles chez les patients traités par cinacalcet [104] que chez les patients ne recevant pas ce traitement. Ces résultats doivent être interprétés avec la prudence requise en raison du caractère observationnel de l'étude. Les résultats des études ADVANCE [105] et EVOLVE pourraient permettre de répondre, au moins en partie, à ces questions avec plus d'assurance.

Au cours de l'hyperparathyroïdie primitive, le cinacalcet diminue efficacement la calcémie mais ne peut pas être considéré comme apportant un équivalent médical d'une parathyroïdectomie parce que, contrairement à cette dernière, il n'entraîne pas d'amélioration de la densité minérale osseuse [106].

Les antagonistes de CaR ne sont pas encore introduits en thérapeutique humaine. Ils sont actuellement développés par plusieurs compagnies pharmaceutiques, dans l'optique du traitement de l'ostéoporose, l'hypothèse étant qu'un médicament capable d'induire une hypersécrétion transitoire et brève de PTH endogène pourrait avoir les mêmes effets anaboliques osseux que l'administration quotidienne de PTH recombinante [107, 108]. Il est cependant probable que l'effet hypercalcémiant de ces médicaments limitera leur utilisation. Nous avons récemment observé que les antagonistes allostériques de CaR augmentent significativement la calcémie chez des animaux, même en l'absence d'hormone parathyroïdienne (Tableau I) [A. Loupy et coll., manuscrit soumis pour publication].

TABLEAU I. – EFFETS DES AGONISTES ET ANTAGONISTES ALLOSTÉRIQUES DE CaR DANS LES MODÈLES EXPÉRIMENTAUX ET CHEZ L'HOMME.

EFFET ÉTUDIÉ	MODÈLES EXPÉRIMENTAUX	HOMME
<b>AGONISTES ALLOSTÉRIQUES</b>		
Calcémie	Diminue	Diminue
Sécrétion de PTH	Diminue	Diminue
Abondance de l'ARNm de la PTH	Diminue	?
Expression tissulaire de CaR	Augmente	?
Hyperplasie parathyroïdienne	Prévient	?
Apoptose des cellules parathyroïdiennes	Induit	?
Ostéite fibreuse	Réduit	?
Progression de la maladie rénale	Ralentit	?
Pression artérielle	Diminue	?
LDL-cholestérol	Diminue	?
Calcifications vasculaires	Diminue ou ralentit	?
Athérosclérose	Diminue ou ralentit	?
Mortalité	?	?
<b>ANTAGONISTES ALLOSTÉRIQUES</b>		
Sécrétion de PTH	Augmente	Augmente
Calcémie	Augmente	Augmente
Densité minérale osseuse	Augmente	?
Calciurie	Sans effet	?

## PERSPECTIVES

La somme des connaissances accumulées en moins de 20 ans, depuis la découverte de CaR, est phénoménale. L'intérêt que suscite ce récepteur va encore croître avec la possibilité de modifier sa fonction avec des thérapeutiques appropriées et, idéalement, ciblées vers tel ou tel organe. Son mode de fonctionnement, le rôle pathogène de ses mutants et ses fonctions dans des organes tels que le cerveau, le système cardiovasculaire, l'intestin ou le sein sont loin d'être compris de manière satisfaisante et vont continuer à faire l'objet d'actives recherches. Il reste également beaucoup à apprendre quant aux fonctions réelles de CaR dans l'os et le rein et la possibilité, vraisemblable, que CaR ne soit qu'un des récepteurs du calcium, et non pas LE récepteur du calcium, ouvre des perspectives stimulantes.

*Conflit d'intérêt* : Pascal Houillier a exercé des fonctions de consultant et a reçu des fonds de recherche d'Amgen.



## BIBLIOGRAPHIE

1. FISCHER E. Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme. *Ber Ges Dtsch Chem*, 1894, 27 : 2985-2993.
2. FAN GF, RAY K, ZHAO XM et al. Mutational analysis of the cysteines in the extracellular domain of the human Ca<sup>2+</sup> receptor : effects on cell surface expression, dimerization and signal transduction. *FEBS Lett*, 1998, 436 : 353-356.
3. RONDARD P, LIU J, HUANG S et al. Coupling of agonist binding to effector domain activation in metabotropic glutamate-like receptors. *J Biol Chem*, 2006, 281 : 24653-24661.
4. BAI M, TRIVEDI S, LANE CR et al. Protein kinase C phosphorylation of threonine at position 888 in Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor (CaR) inhibits coupling to Ca<sup>2+</sup> store release. *J Biol Chem*, 1998, 273 : 21267-21275.
5. KUNISHIMA N, SHIMADA Y, TSUJI Y et al. Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor. *Nature*, 2000, 407 : 971-977.
6. Tfelt-Hansen J, Brown EM. The calcium-sensing receptor in normal physiology and pathophysiology : a review. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2005, 42 : 35-70.
7. BROWN EM. Clinical lessons from the calcium-sensing receptor. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*, 2007, 3 : 122-133.
8. BROWN EM, GAMBA G, RICCARDI D et al. Cloning and characterization of an extracellular Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature*, 1993, 366 : 575-580.
9. RUAT M, SNOWMAN AM, HESTER LD et al. Cloned and expressed rat Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor. *J Biol Chem*, 1996, 271 : 5972-5975.
10. BRÄUNER-OSBORNE H, JENSEN AA, SHEPPARD PO et al. The Agonist-binding Domain of the Calcium-sensing Receptor Is Located at the Amino-terminal Domain. *J Biol Chem*, 1999, 274 : 18382-18386.
11. BAI M, QUINN S, TRIVEDI S et al. Expression and characterization of inactivating and activating mutations in the human Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor. *J Biol Chem*, 1996, 271 : 19537-19545.
12. CONIGRAVE AD, QUINN SJ, BROWN EM. L-amino acid sensing by the extracellular Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97 : 4814-4819.
13. QUINN SJ, KIFOR O, TRIVEDI S et al. Sodium and ionic strength sensing by the calcium receptor. *J Biol Chem*, 1998, 273 : 19579-19586.
14. QUINN SJ, BAI M, BROWN EM. pH Sensing by the calcium-sensing receptor. *J Biol Chem*, 2004, 279 : 37241-37249.
15. NEMETH EF, STEFFEY ME, HAMMERLAND LG et al. Calcimimetics with potent and selective activity on the parathyroid calcium receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95 : 4040-4045.
16. NEMETH EF, DELMAR EG, HEATON WL et al. Calcilytic compounds : potent and selective Ca<sup>2+</sup>-receptor antagonists that stimulate secretion of parathyroid hormone. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001, 299 : 323-331.
17. HAMMERLAND LG, KRAPCHO KJ, GARRETT JE et al. Domains determining ligand specificity for Ca<sup>2+</sup>-receptors. *Mol Pharmacol*, 1999, 55 : 642-648.
18. SILVE C, PETREL C, LEROY C et al. Delineating a Ca<sup>2+</sup> binding pocket within the venus flytrap module of the human calcium-sensing receptor. *J Biol Chem*, 2005, 280 : 37917-37923.
19. HUANG Y, ZHOU Y, YANG W et al. Identification and dissection of Ca<sup>2+</sup>-binding sites in the extracellular domain of Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor. *J Biol Chem*, 2007, 282 : 19000-19010.
20. MUN HC, CULVERSTON EL, FRANKS AH et al. A double mutation in the extracellular Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor's venus flytrap domain that selectively disables L-amino acid sensing. *J Biol Chem*, 2005, 280 : 29067-29072.
21. LEE HJ, MUN HC, LEWIS NC et al. Allosteric activation of the extracellular Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor by L-amino acids enhances ERK1/2 phosphorylation. *Biochem J*, 2007, 404 : 141-149.
22. NORDIN BEC. Calcium, phosphate and magnesium metabolism : Clinical Physiology and Diagnostic Procedures. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1976.
23. KUROKAWA H. The kidney and calcium homeostasis. *Kidney Int*, 1994, 45 : S97-S105.

24. BROWN EM. Physiology and pathophysiology of the extracellular calcium-sensing receptor. *Am J Med*, 1999, *106* : 238-253.
25. BRENT GA, LeBOFF MS, SEELY EW et al. Relationship between the concentration and rate of change of calcium and serum intact parathyroid hormone levels in normal humans. *J Clin Endocrinol Metab*, 1988, *67* : 944-950.
26. PAILLARD M, GARDIN J, BORENSZTEIN P et al. Determinants of parathormone secretion in primary hyperparathyroidism. *Horm Res*, 1989, *32* : 89-92.
27. PAPAPOULOS SE, MANNING RM, HENDY GN et al. Studies of circulating parathyroid hormone in man using a homologous amino-terminal specific immunoradiometric assay. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 1980, *13* : 57-67.
28. RUDBERG C, AKERSTROM G, LJUNGHALL S et al. Regulation of parathyroid hormone release in primary and secondary hyperparathyroidism - studies in vivo and in vitro. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 1982, *101* : 408-413.
29. BROWN EM, GARDNER DG, BRENNAN MF et al. Calcium-regulated parathyroid hormone release in primary hyperparathyroidism : studies in vitro with dispersed parathyroid cells. *Am J Med*, 1979, *66* : 923-931.
30. GARDIN JP, PATRON P, FOUQUERAY B et al. Maximal PTH secretory rate and set point for calcium in normal subjects and patients with primary hyperparathyroidism. In vivo studies. *Miner Electrolyte Metab*, 1988, *14* : 221-228.
31. BLUM JW, TRECHSEL U, BORN W et al. Rapidity of plasma 1,25-dihydroxyvitamin D responses to hypo- and hypercalcemia in steers. *Endocrinology*, 1983, *113* : 523-526.
32. BROWN EM, LEOMBRUNO R, THATCHER J et al. The acute secretory response to alterations in extracellular calcium concentration and dopamine in perfused bovine parathyroid cells. *Endocrinology*, 1985, *116* : 1123-1132.
33. WALLFELT C, LINDH E, LARSSON R et al. Kinetic evidence for cytoplasmic calcium as an inhibitory messenger in parathyroid hormone release. *Biochim Biophys Acta*, 1988, *969* : 257-262.
34. BROWN EM. Extracellular Ca<sup>2+</sup> sensing, regulation of parathyroid cell function, and role of Ca<sup>2+</sup> and other ions as extracellular (first) messengers. *Physiol Rev*, 1991, *71* : 371-411.
35. HJALM G, MACLEOD RJ, KIFOR O et al. Filamin-A binds to the carboxyl-terminal tail of the calcium-sensing receptor, an interaction that participates in CaR-mediated activation of mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*, 2001, *276* : 34880-34887.
36. AWATA H, HUANG C, HANDLOGTEN ME et al. Interaction of the calcium-sensing receptor and filamin, a potential scaffolding protein. *J Biol Chem*, 2001, *276* : 34871-34879.
37. KIFOR O, DIAZ R, BUTTERS R et al. The calcium-sensing receptor is localized in caveolin-rich plasma membrane domains of bovine parathyroid cells. *J Biol Chem*, 1998, *273* : 21708-21713.
38. RICCARDI D, PARK J, LEE WS et al. Cloning and functional expression of a rat kidney extracellular calcium/polyvalent cation-sensing receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, *92* : 131-136.
39. HEBERT SC. Extracellular calcium-sensing receptor : implications for calcium and magnesium handling in the kidney. *Kidney Int*, 1996, *50* : 2129-2139.
40. DE JESUS FERREIRA MC, BAILLY C. Extracellular Ca<sup>2+</sup> decreases chloride reabsorption in rat CTAL by inhibiting cAMP pathway. *Am J Physiol*, 1998, *275* : F198-203.
41. DESFLEURS E, WITTNER M, SIMEONE S et al. Calcium-sensing receptor : regulation of electrolyte transport in the thick ascending limb of Henle's loop. *Kidney Blood Press Res*, 1998, *21* : 401-412.
42. MOTOYAMA HI, FRIEDMAN PA. Calcium-sensing receptor regulation of PTH-dependent calcium absorption by mouse cortical ascending limbs. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2002, *283* : F399-406.
43. HO C, CONNER DA, POLLAK MR et al. A mouse model for familial hypocalciuric hypercalcemia and neonatal severe hyperparathyroidism. *Nature Genet*, 1995, *11* : 389-394.
44. KOS CH, KARAPLIS AC, PENG JB et al. The calcium-sensing receptor is required for normal calcium homeostasis independent of parathyroid hormone. *J Clin Invest*, 2003, *111* : 1021-1028.
45. TU Q, PI M, KARSENTY G et al. Rescue of the skeletal phenotype in CasR-deficient mice by transfer onto the Gcm2 null background. *J Clin Invest*, 2003, *111* : 1029-1037.
46. CHANG W, TU C, CHEN TH et al. The extracellular calcium-sensing receptor (CaSR) is a critical modulator of skeletal development. *Sci Signal*, 2008, *1* : ra1.

47. HEBERT SC, CHENG S, GEIBEL J. Functions and roles of the extracellular Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor in the gastrointestinal tract. *Cell Calcium*, 2004, 35 : 239-247.
48. BUCHAN AM, SQUIRES PE, RING M et al. Mechanism of action of the calcium-sensing receptor in human antral gastrin cells. *Gastroenterology*, 2001, 120 : 1128-1139.
49. RAY JM, SQUIRES PE, MELOCHE RM et al. L-type calcium channels regulate gastrin release from human antral G cells. *Am J Physiol*, 1997, 273 : G281-288.
50. CHATTOPADHYAY N, CHENG I, ROGERS K et al. Identification and localization of extracellular Ca(2+)-sensing receptor in rat intestine. *Am J Physiol*, 1998, 274 : G122-130.
51. BRUCE JI, YANG X, FERGUSON CJ et al. Molecular and functional identification of a Ca<sup>2+</sup> (polyvalent cation)-sensing receptor in rat pancreas. *J Biol Chem*, 1999, 274 : 20561-20568.
52. CANAFF L, PETIT JL, KISIEL M et al. Extracellular calcium-sensing receptor is expressed in rat hepatocytes. coupling to intracellular calcium mobilization and stimulation of bile flow. *J Biol Chem*, 2001, 276 : 4070-4079.
53. CONIGRAVE AD, BROWN EM. Taste receptors in the gastrointestinal tract. II. L-amino acid sensing by calcium-sensing receptors : implications for GI physiology. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2006, 291 : G753-761.
54. RENKEMA KY, VELIC A, DIJKMAN HB et al. The calcium-sensing receptor promotes urinary acidification to prevent nephrolithiasis. *J Am Soc Nephrol*, 2009, 20 : 1705-1713.
55. SANDS JM, NARUSE M, BAUM M et al. Apical extracellular calcium/polyvalent cation-sensing receptor regulates vasopressin-elicited water permeability in rat kidney inner medullary collecting duct. *J Clin Invest*, 1997, 99 : 1399-1405.
56. MARX SJ, ATTIE MF, LEVINE MA et al. The hypocalciuric or benign variant of familial hypercalcemia : clinical and biochemical features in fifteen kindreds. *Medicine*, 1981, 60 : 397-412.
57. MARX SJ, SPIEGEL AM, LEVINE MA et al. Familial hypocalciuric hypercalcemia : the relation to primary parathyroid hyperplasia. *N Engl J Med*, 1982, 307 : 416-426.
58. CHRISTENSEN SE, NISSEN PH, VESTERGAARD P et al. Discriminative power of three indices of renal calcium excretion for the distinction between familial hypocalciuric hypercalcaemia and primary hyperparathyroidism : a follow-up study on methods. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2008, 69 : 713-720.
59. AUWERX J, DEMEDTS M, BOUILLON R. Altered parathyroid set point to calcium in familial hypocalciuric hypercalcemia. *Acta Endocrinologica (Copenh)*, 1984, 106 : 215-218.
60. CHOU YH, BROWN EM, LEVI T et al. The gene responsible for familial hypocalciuric hypercalcemia maps to chromosome 3q in four unrelated families. *Nat Genet*, 1992, 1 : 295-300.
61. CHATTOPADHYAY N, MITHAL A, BROWN E. The calcium-sensing receptor : a window into the physiology and pathophysiology of mineral ion homeostasis. *Endocrine Rev*, 1996, 17 : 289-307.
62. POLLAK MR, BROWN EM, CHOU YH et al. Mutations in the Ca<sup>2+</sup> sensing receptor gene cause familial hypocalciuric hypercalcemia and neonatal severe hyperparathyroidism. *Cell*, 1993, 75 : 1297-1303.
63. HEATH III H, JACKSON CE, OTTERUD B et al. Genetic linkage analysis in familial benign (hypocalciuric) hypercalcemia : evidence for locus heterogeneity. *Am J Hum Genet*, 1993, 53 : 193-200.
64. LLOYD SE, PANNETT AAJ, DIXON PH et al. Localization of familial benign hypercalcemia, Oklahoma variant (FBHok), to chromosome 19q13. *Am J Hum Genet*, 1999, 64 : 189-195.
65. MCMURTRY CT, SCHRANCK FW, WALKENHORST DA et al. Significant developmental elevation in serum parathyroid hormone levels in a large kindred with familial benign (hypocalciuric) hypercalcemia. *Am J Med*, 1992, 93 : 247-258.
66. BAI M, TRIVEDI S, KIFOR O et al. Intermolecular interactions between dimeric calcium-sensing receptor monomers are important for its normal function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96 : 2834-2839.
67. PEARCE SHS, WILLIAMSON C, KIFOR O et al. A familial syndrome of hypocalcemia with hypercalciuria due to mutations in the calcium-sensing receptor. *N Engl J Med*, 1996, 335 : 1115-1122.
68. POLLAK MR, BROWN EM, ESTEP HL et al. Autosomal dominant hypocalcaemia caused by a Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor gene mutation. *Nat Genet*, 1994, 8 : 303-307.
69. BARON J, WINER KK, YANOVSKI JA et al. Mutations in the Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor gene cause autosomal dominant and sporadic hypoparathyroidism. *Human Mol Genet*, 1996, 5 : 601-606.

70. DE LUCA F, RAY K, MANCILLA EE et al. Sporadic hypoparathyroidism caused by de Novo gain-of-function mutations of the Ca(2+)-sensing receptor. *J Clin Endocrinol Metab*, 1997, 82 : 2710-2715.
71. LIENHARDT A, GARABEDIAN M, BAI M et al. A large homozygous or heterozygous in-frame deletion within the calcium-sensing receptor's carboxyterminal cytoplasmic tail that causes autosomal dominant hypocalcemia. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000, 85 : 1695-1702.
72. WATANABE S, FUKUMOTO S, CHANG H et al. Association between activating mutations of calcium-sensing receptor and Bartter's syndrome. *Lancet*, 2002, 360 : 692-694.
73. VARGAS-POUSSOU R, HUANG C, HULIN P et al. Functional characterization of a calcium-sensing receptor mutation in severe autosomal dominant hypocalcemia with a Bartter-like syndrome. *J Am Soc Nephrol*, 2002, 13 : 2259-2266.
74. BETTERLE C. Parathyroid and autoimmunity. *Ann Endocrinol (Paris)*, 2006, 67 : 147-154.
75. WHYTE M. Autoimmune hypoparathyroidism. In : J Bilezikian, R Marcus, M Levine. *The Parathyroids*. San Diego, Academic Press, 2001, pp 791-805.
76. BLIZZARD RM, CHEE D, DAVIS W. The incidence of parathyroid and other antibodies in the sera of patients with idiopathic hypoparathyroidism. *Clin Exp Immunol*, 1966, 1 : 119-128.
77. LI Y, SONG YH, RAIS N et al. Autoantibodies to the extracellular domain of the calcium sensing receptor in patients with acquired hypoparathyroidism. *J Clin Invest*, 1996, 97 : 910-914.
78. GOSWAMI R, BROWN EM, KOCHUPILLAI N et al. Prevalence of calcium sensing receptor autoantibodies in patients with sporadic idiopathic hypoparathyroidism. *Eur J Endocrinol*, 2004, 150 : 9-18.
79. SODERBERGH A, MYHRE AG, EKWALL O et al. Prevalence and clinical associations of 10 defined autoantibodies in autoimmune polyendocrine syndrome type I. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, 89 : 557-562.
80. MAYER A, PLOIX C, ORGIAZZI J et al. Calcium-sensing receptor autoantibodies are relevant markers of acquired hypoparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, 89 : 4484-4488.
81. GAVALAS NG, KEMP EH, KROHN KJ et al. The calcium-sensing receptor is a target of autoantibodies in patients with autoimmune polyendocrine syndrome type 1. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007, 92 : 2107-2114.
82. KIFOR O, MCELDUFF A, LEBOFF MS et al. Activating antibodies to the calcium-sensing receptor in two patients with autoimmune hypoparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, 89 : 548-556.
83. KIFOR O, MOORE FD Jr, DELANEY M et al. A syndrome of hypocalciuric hypercalcemia caused by autoantibodies directed at the calcium-sensing receptor. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003, 88 : 60-72.
84. PALLAIS JC, KIFOR O, CHEN YB et al. Acquired hypocalciuric hypercalcemia due to autoantibodies against the calcium-sensing receptor. *N Engl J Med*, 2004, 351 : 362-369.
85. MAKITA N, SATO J, MANAKA K et al. An acquired hypocalciuric hypercalcemia autoantibody induces allosteric transition among active human Ca-sensing receptor conformations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104 : 5443-5448.
86. 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, 13 : 2517-2523.
87. SAIDAK Z, MENTAVERRI R, BROWN EM. The role of the calcium-sensing receptor in the development and progression of cancer. *Endocr Rev*, 2009, 30 : 178-195.
88. SANDERS JL, CHATTOPADHYAY N, KIFOR O et al. Extracellular calcium-sensing receptor (CaR) expression and its potential role in parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) secretion in the H-500 rat Leydig cell model of humoral hypercalcemia of malignancy. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 269 : 427-432.
89. SANDERS JL, CHATTOPADHYAY N, KIFOR O et al. Ca(2+)-sensing receptor expression and PTHrP secretion in PC-3 human prostate cancer cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2001, 281 : E1267-1274.
90. VAN 'T VEER P, VAN LEER EM, RIETDIJK A et al. Combination of dietary factors in relation to breast-cancer occurrence. *Int J Cancer*, 1991, 47 : 649-653.
91. NEGRI E, LA VECCHIA C, FRANCESCHI S et al. Intake of selected micronutrients and the risk of breast cancer. *Int J Cancer*, 1996, 65 : 140-144.
92. GARLAND C, SHERELLE RB, BARRETT-CONNOR E et al. Dietary vitamin D and calcium and risk of colorectal cancer : a 19-year prospective study in men. *Lancet*, 1985, 1 : 307-309.

93. BLOCK GA, KLASSEN PS, LAZARUS JM et al. Mineral metabolism, mortality, and morbidity in maintenance hemodialysis. *J Am Soc Nephrol*, 2004, *15* : 2208-2218.
94. PEACOCK M, BILEZIKIAN JP, KLASSEN PS et al. Cinacalcet hydrochloride maintains long-term normocalcemia in patients with primary hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005, *90* : 135-141.
95. NECHAMA M, BEN-DOV IZ, SILVER J et al. Regulation of PTH mRNA stability by the calcimimetic R568 and the phosphorus binder lanthanum carbonate in CKD. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2009, *296* : F795-800.
96. RODRIGUEZ ME, ALMADEN Y, CANADILLAS S et al. The calcimimetic R-568 increases vitamin D receptor expression in rat parathyroid glands. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2007, *292* : F1390-1395.
97. WADA M, NAGANO N, FURUYA Y et al. Calcimimetic NPS R-568 prevents parathyroid hyperplasia in rats with severe secondary hyperparathyroidism. *Kidney Int*, 2000, *57* : 50-58.
98. CHIN J, MILLER SC, WADA M et al. Activation of the calcium receptor by a calcimimetic compound halts the progression of secondary hyperparathyroidism in uremic rats. *J Am Soc Nephrol*, 2000, *11* : 903-911.
99. MIZOBUCHI M, OGATA H, HATAMURA I et al. Activation of calcium-sensing receptor accelerates apoptosis in hyperplastic parathyroid cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, *362* : 11-16.
100. WADA M, ISHII H, FURUYA Y et al. NPS R-568 halts or reverses osteitis fibrosa in uremic rats. *Kidney Int*, 1998, *53* : 448-453.
101. OGATA H, RITZ E, ODONI G et al. Beneficial effects of calcimimetics on progression of renal failure and cardiovascular risk factors. *J Am Soc Nephrol*, 2003, *14* : 959-967.
102. IVANOVSKI O, NIKOLOV IG, JOKI N et al. The calcimimetic R-568 retards uremia-enhanced vascular calcification and atherosclerosis in apolipoprotein E deficient (apoE<sup>-/-</sup>) mice. *Atherosclerosis*, 2009, *205* : 55-62.
103. BLOCK GA, MARTIN KJ, DE FRANCISCO AL et al. Cinacalcet for secondary hyperparathyroidism in patients receiving hemodialysis. *N Engl J Med*, 2004, *350* : 1516-1525.
104. BLOCK GA, ZAUN D, SMITS G et al. Cinacalcet hydrochloride treatment significantly improves all-cause and cardiovascular survival in a large cohort of hemodialysis patients. *Kidney Int*, 2010, *78* : 578-589.
105. FLOEGE J, RAGGI P, BLOCK GA et al. Study design and subject baseline characteristics in the ADVANCE Study : effects of cinacalcet on vascular calcification in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*, 2010, *25* : 1916-1923.
106. PEACOCK M, BOLOGNESE MA, BOROFSKY M et al. Cinacalcet treatment of primary hyperparathyroidism : biochemical and bone densitometric outcomes in a five-year study. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009, *94* : 4860-4867.
107. GOWEN M, STROUP GB, DODDS RA et al. Antagonizing the parathyroid calcium receptor stimulates parathyroid hormone secretion and bone formation in osteopenic rats. *J Clin Invest*, 2000, *105* : 1595-1604.
108. MARIE PJ. The calcium-sensing receptor in bone cells : a potential therapeutic target in osteoporosis. *Bone*, 2010, *46* : 571-576.