

MICHAËL SIMARD

**RÉGULATION TRANSCRIPTIONNELLE DU CO-
TRANSPORTEUR Na⁺-K⁺-Cl⁻ DE TYPE 2**

Mémoire présenté
à la Faculté des études supérieures et postdoctorales de l'Université Laval
dans le cadre du programme de maîtrise en médecine expérimentale
pour l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2012

RÉSUMÉ

Le cotransporteur $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$ rénal, aussi appelé NKCC2, est une protéine polytopique dont le rôle est de coupler le mouvement des ions Na^+ , K^+ et Cl^- à la surface cellulaire. Il est exprimé exclusivement dans la membrane apicale de l'anse ascendante large de Henle (TALH) où il veille à la réabsorption des ions filtrés. Ce faisant, il contribue à la concentration et à la dilution de l'urine, au rétrocontrôle tubuloglomérulaire et au maintien de la pression artérielle (PA) via celui du volume extracellulaire. À cet effet, l'inactivité de NKCC2 dans le syndrome héréditaire de Bartter se manifeste par des pressions qui sont souvent normales basses. L'activité de NKCC2 augmente lorsque la concentration intracellulaire (C_i) des ions transportés diminue, et ce, grâce à des modifications posttranslationnelles qui incluent la phosphorylation du transporteur. L'activité de NKCC2 est aussi régulée avant l'étape de la traduction en protéine, mais il y a peu de données disponibles à ce chapitre. Le but du présent mémoire était de déterminer si des changements de la concentration intracellulaire des ions Na^+ , K^+ ou Cl^- affectaient aussi l'expression de NKCC2 par des mécanismes opérant aux étapes transcriptionnelle ou posttranscriptionnelle de la synthèse du transporteur. Pour ce faire, nous avons transfecté des cellules immortalisées provenant du TALH avec des régions promotrices de NKCC2, les avons soumises à différentes conditions de culture, et les avons analysées de manière à quantifier l'activité transcriptionnelle de NKCC2 et son expression. Nos résultats montrent qu'à court terme, une diminution de la concentration intracellulaire des ions Na^+ et Cl^- entraîne une augmentation de l'activité transcriptionnelle de NKCC2 et sans doute aussi de la stabilité de son ARNm, alors qu'à moins court terme, elle entraîne une diminution de l'activité transcriptionnelle de NKCC2. Ces données suggèrent donc l'existence de facteurs de transcription dont l'activité est sensible à la concentration intracellulaire des ions transportés par NKCC2 et dont la cible comprend le promoteur du gène. Elles suggèrent aussi que l'effet immédiat d'une diminution de la concentration intracellulaire des ions est d'augmenter l'activité de NKCC2 par différents mécanismes à action rapide, mais que l'effet plus tardif est d'autolimiter la synthèse du cotransporteur à l'étape transcriptionnelle pour empêcher un transport excessif des ions vers l'intérieur de la cellule.

ABSTRACT

The renal $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$ cotransporter, also called NKCC2, is a polytopic protein that couples the movement of the ions Na^+ , K^+ and Cl^- at the cell surface. It is expressed exclusively in the apical membrane of the thick ascending limb of the loop of Henle (TALH) where it reabsorbs a large fraction of the filtered ions. In doing so, NKCC2 contributes to various processes such as urine concentration and dilution, tubuloglomerular feedback and blood pressure maintenance through extracellular fluid volume maintenance. In this regard, the inactivity of NKCC2 in a hereditary disorder called Bartter's syndrome is characterized by low normal blood pressure. Importantly, NKCC2 activity is increased by a reduction in the concentration of Na^+ , K^+ or Cl^- , and this, through posttranslational modifications that include phosphorylation of the carrier. NKCC2 activity is also regulated before the translation step, but there are very little data available in this regard. The purpose of the current memoir was to determine whether changes in the intracellular concentration of Na^+ , K^+ or Cl^- also affected NKCC2 through mechanisms that act at transcriptional or posttranscriptional steps during the process of carrier synthesis. To do so, we transfected immortalized cells derived from the TALH with NKCC2 promoter regions, subjected these cells to various conditions in culture, and tested them to quantify NKCC2 transcriptional activity as well as NKCC2 expression. Our results show that in the short term, a decrease in the intracellular concentration of Na^+ and Cl^- leads to an increase in NKCC2 promoter activity and perhaps in NKCC2 mRNA stability as well, but that in the long term, it leads to a decrease in NKCC2 promoter activity. As such, our data point towards the existence of ion-sensitive transcription factors that can interact with the promoter region of NKCC2 either directly or through various intermediates. They also suggest that the short term effect of decreasing intracellular ion concentration is to increase NKCC2 activity through combined mechanisms, but that the long term effect is to limit carrier synthesis as a means of preventing ions from being transported into cells in excessive quantity.

AVANT-PROPOS

Tout d'abord, je tiens à remercier mon directeur de recherche, le Dr Paul Isenring, pour m'avoir invité à faire une maîtrise dans son laboratoire. Je tiens aussi à le remercier pour tous les encouragements et conseils qu'il m'a procurés durant mes études.

Un merci à mes collègues de travail pour leur aide, leur sens de l'humour et pour leur amitié qui ont rendu mes études supérieures si agréables. J'aimerais remercier tout particulièrement Mariève Jacob-Wagner et Micheline Noël pour leur aide précieuse dans mes expériences de culture cellulaire, de même que Rachelle Frenette-Cotton, Gabriel Carpentier, Nikolas Daigle, Charles Simard, Luc Caron, François Côté, Andrée-Anne Marcoux et Alexandre Garneau pour leur aide et dévouement.

Merci également à tout le personnel du centre de recherche de L'Hôtel-Dieu de Québec pour leur travail exemplaire. Leur aide m'a aussi été précieuse jour après jour.

Je veux aussi remercier spécialement ma famille, Nancy, Jean-Guy, Nicolas et Jérémy, ainsi que mes amis pour leurs encouragements, leur soutien et leur amour. J'aimerais aussi remercier ma copine Véronique pour m'avoir accompagné tout au long de ma maîtrise. Son support et son amour m'ont rassuré et m'ont permis de persévérer dans mon projet. Sa présence m'a été indispensable.

Pour terminer, je remercie le centre de recherche de L'Hôtel-Dieu de Québec et la Société québécoise d'hypertension artérielle pour m'avoir soutenu financièrement durant mes deux années d'étude à la maîtrise. Cet appui aura facilité l'obtention d'une bourse au doctorat.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	II
ABSTRACT	III
AVANT-PROPOS	IV
LISTE DES TABLES	VII
CHAPITRE 1: INTRODUCTION	11
1. Généralités sur le transport membranaire	11
2. Les cotransporteurs cation-Cl ⁻ (CCC).....	14
2.1. La famille des CCCs	14
2.2. Découverte et historique	14
2.3. Structure des CCCs.....	15
2.4. Rôles des CCCs.....	16
3. Les cotransporteurs Na ⁺ -K ⁺ -Cl ⁻ (NKCCs).....	19
4. NKCC2	20
4.1 Organisation génomique.....	20
4.2 Distribution.....	22
4.3 Propriétés fonctionnelles	25
4.4 Régulation.....	27
4.4.1 Régulation de l'expression protéique	27
4.4.2 Glycosylation	29
4.4.3 Oligomérisation	29
4.4.4 Phosphorylation et translocation à la membrane.....	30
4.5 Rôles physiologiques.....	32
4.5.1 Concentration et dilution de l'urine	32
4.5.2 Soutien du rétrocontrôle tubuloglomérulaire	33
4.5.3 Réabsorption de Na ⁺ , de Cl ⁻ et de cations divalents.....	34
4.6 Maladie reliée	36
4.6.1 Syndrome de Bartter	36
4.6.2 Hypertension artérielle	36
5. Objectif et hypothèse de recherche	36

CHAPITRE 2: MATÉRIELS ET MÉTHODES	39
1. Construction des vecteurs d'expression.....	39
2. Culture cellulaire.....	41
3. Transfection et développement des clones cellulaires.....	42
4. Incubation des cellules dans différentes conditions expérimentales.....	43
6. Extraction de l'ARNm et analyse RT-PCR en temps réel.....	44
7. Immunoprécipitation et immunobuvardage de type <i>Western</i>	45
8. Analyses statistiques.....	46
CHAPITRE 3: RÉSULTATS	47
1. Étude d'expression de NKCC2 dans les cellules raTAL.....	47
2. L'effet de milieux en concentration basse en Cl ⁻ ou basse en Na ⁺ sur la transcription de NKCC2.....	49
3. Effet de différentes molécules sur l'activité du promoteur de NKCC2.....	55
4. NKCC2, lui-même un facteur de transcription?.....	58
CHAPITRE 4: DISCUSSION ET CONCLUSION	61
BIBLIOGRAPHIE	65

LISTE DES TABLES

Table 1. Concentrations typiques d'ions intracellulaires et extracellulaires d'une cellule de mammifère	12
Table 2. Liste des vecteurs d'expression.....	40
Table 3. Liste des amorces utilisées.....	41
Table 4. Quantité des réactifs utilisés lors des transfections transitoires et stables	42
Table 5. Composition des différentes solutions utilisées	43

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Vue d'ensemble des protéines de transport membranaire	13
Figure 2. Représentation hydrophatique de NKCC2A de lapin	16
Figure 3. Régulation du volume cellulaire par les cotransporteurs cation-Cl ⁻	18
Figure 4. Variantes d'épissage de NKCC2	222
Figure 5. Représentation d'un néphron.....	24
Figure 6. Distribution des variantes d'épissage de NKCC2	24
Figure 7. Physiologie moléculaire de la réabsorption du sel dans le TALH	35
Figure 8. Études d'expression.....	48
Figure 9. Vecteurs d'expression utilisés dans ce travail	49
Figure 10. Activité promotrice totale de HRE dans divers milieux au fil du temps.....	51
Figure 11. Activité promotrice de NKCC2 dans un milieu faible en Cl ⁻ au fil du temps....	52
Figure 12. Activité promotrice de NKCC2 dans un milieu faible en Na ⁺ au fil du temps ..	54
Figure 13. Activité promotrice totale de NKCC2 dans divers milieux au temps 0 et 4 h ...	55
Figure 14. Activité promotrice totale de NKCC2 en présence ou en absence de différentes molécules pendant 1 et 3 h.....	57
Figure 15. Activité promotrice totale de NKCC2 dans les raTAL transfectées avec des segments peptidiques dérivés de NKCC2.....	60

LISTE DES ABRÉVIATIONS

aa	acides aminés
ADH	hormone antidiurétique
ADN	acide désoxyribonucléique
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
AMPK	<i>AMP-activated kinase</i>
Ang-II	angiotensine II
APP	<i>Amyloid precursor protein</i>
ARNc	acide ribonucléique complémentaire
ARNm	acide ribonucléique messenger
ATP	adénosine triphosphate
BCI	solution à concentration basse en Cl ⁻
BNa	solution à concentration basse en Na ⁺
PA	pression artérielle
CaSR	<i>calcium sensing receptor</i>
CCC	cotransporteur cation-Cl ⁻
CIP	<i>cation-chloride cotransporter interacting protein</i>
CLC-Kb	<i>chloride channel kidney b</i>
CMV	cytomégalovirus
CREB	<i>cAMP-responsive element binding proteins</i>
C-terminale	carboxyle-terminale
DCT	<i>distal convoluted tubule</i>
DDAVP	1-desamino-8-D-arginine vasopressine
DMT1	<i>divalent metal transporter 1</i>
E2FF	<i>E2F-myc activator/cell cycle regulator</i>
EST	<i>expressed Sequence Tags</i>
GRE	<i>glucocorticoid responsive and related elements</i>
HEAT	<i>heat shock factors</i>
HFN-1	<i>hepatic nuclear factor 1</i>
HIFF	<i>hypoxia inducible factor</i>
HPRT	<i>hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase</i>
HRE	<i>hypoxia responsive element</i>
kb	kilobases
KCC1	cotransporteur K ⁺ -Cl ⁻ de type 1
KCC2	cotransporteur K ⁺ -Cl ⁻ de type 2
KCC3	cotransporteur K ⁺ -Cl ⁻ de type 3
KCC4	cotransporteur K ⁺ -Cl ⁻ de type 4
kDa	kilodalton
KS-WNK1	<i>kidney specific with no lysine kinase type 1</i>
L-NKCC2	<i>long NKCC2</i>
MAL	<i>myelin and lymphocyte-associated protein</i>
mosM	milliosmole/litre
Na⁺/K⁺ ATPase	Na ⁺ -K ⁺ adénosine triphosphatase
NCC	cotransporteur Na ⁺ -K ⁺
NKCC1	cotransporteur Na ⁺ -K ⁺ -2Cl ⁻ de type 1

NKCC2	cotransporteur Na ⁺ -K ⁺ -Cl ⁻ de type 2
N-terminale	amino-terminale
PA	pression artérielle
pb	paire de bases
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PHAI	pseudohypoaldostéronisme de type II
PKA	protéine kinase A
PLB	<i>passive lysis buffer</i>
raTAL	<i>rat medullary thick ascending limb cell</i>
REGM	<i>renal epithelial cell growth medium</i>
ROMK	<i>renal outer medullary K⁺ channel</i>
RTG	rétrocontrôle tubulo-glomérulaire
RT-PCR	<i>reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>
RVD	<i>regulatory Volume Decrease</i>
RVI	<i>regulatory Volume Increase</i>
SCAMP2	<i>secretory carrier-associated membrane protein 2</i>
SLC	<i>solute carriers</i>
N	solution à concentration normale en sel
SNARE	<i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor</i>
S-NKCC2	<i>short NKCC2</i>
SORLA	<i>sorting protein-related receptor with A-type repeats</i>
SPAK/ORS1	<i>Ste20p-related proline-alanine-rich kinase/oxidative stress response 1</i>
TALH	<i>thick ascending limb of loop of Henle</i>
TM	segment transmembranaire
UTR	région non traduite
VAMP	<i>vesicle-associated membrane protein</i>
WNK	<i>With no lysine kinase</i>

CHAPITRE 1: INTRODUCTION

1. Généralités sur le transport membranaire

Les cellules eucaryotes possèdent une bicouche de phospholipides appelée membrane plasmique qui les sépare de l'extérieur. Cette membrane est pratiquement imperméable aux solutés. Seulement quelques gaz, comme l'oxygène et le dioxyde de carbone, et certaines molécules petites, polaires et non chargées, comme l'éthanol et l'urée, peuvent la traverser par diffusion simple de manière assez rapide. Ainsi, un grand nombre de molécules qui entourent la cellule, comme le glucose, les acides aminés (aa) et les ions, sont incapables d'y pénétrer. Cependant, la cellule a besoin de plusieurs de ces éléments essentiels à des concentrations définies pour fonctionner normalement. Il en va de même pour plusieurs molécules qui s'accumulent à l'intérieur de la cellule, c'est-à-dire, que celles-ci ne peuvent en ressortir. C'est pourquoi la membrane plasmique est munie de transporteurs spécifiques qui permettent à plusieurs molécules d'entrer ou de sortir de la cellule de manière régulée. Ces transporteurs correspondent à des protéines qui traversent la bicouche de phospholipide telle qu'illustrée par Stinger et Nicolson en 1972 de par le modèle bien connu aujourd'hui de la mosaïque fluide [1].

Grâce à ces protéines, la cellule peut donc maintenir une concentration précise de molécules pour fonctionner d'une manière optimale. Il y a des grandes différences de concentration d'éléments entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule. Par exemple, il y a beaucoup plus d'ions K^+ dans le cytosol que dans le sang mais beaucoup moins d'ions Na^+ (voir table 1). Les protéines membranaires de transport maintiennent une concentration précise de molécules malgré deux forces soit le gradient de concentration de la molécule transportée et le potentiel de membrane qui se trouve à être le potentiel électrique de chaque côté de la membrane. La combinaison de ces deux forces est appelée gradient électrochimique et va déterminer la direction favorable de transport d'une molécule à travers une membrane. Il existe, jusqu'à présent, trois catégories de protéines de transport soit les pompes, les canaux et les transporteurs.

Ion	Cytosol (mM)	Sang (mM)
K^+	139	4
Na^+	12	145
Cl^-	4	116
X^*	138	9

Table 1. Concentrations typiques d'ions intracellulaires et extracellulaires d'une cellule de mammifère [2]. * représente les protéines qui ont une charge nette négative au pH neutre du sang et de la cellule.

Les pompes sont des systèmes de transport qui utilisent de l'énergie comme l'ATP pour transporter une molécule contre son gradient électrochimique. Le ou les substrats transportés par une pompe s'attachent sur un site de liaison d'un côté de la membrane et, suite à l'utilisation d'énergie, la protéine change de conformation et expose le site de liaison de l'autre côté de la membrane. Ce procédé est appelé transport actif. Une pompe bien connue est la Na^+/K^+ ATPase, laquelle contribue au maintien de la différence de potentiel de membrane en utilisant l'ATP pour transporter les ions Na^+ hors de la cellule et les ions K^+ dans la cellule contre leur gradient électrochimique. Une autre pompe bien connue est la pompe à proton de l'estomac qui conserve le pH du liquide gastrique à un niveau très bas.

Les canaux, quant à eux, permettent à leur substrat spécifique de traverser la membrane plasmique selon un gradient électrochimique. Ce procédé est appelé transport facilité par diffusion passive ainsi, la cellule n'a donc pas besoin de dépenser de l'énergie. En fait, les canaux agissent comme des pores formant un passage hydrophile à travers la membrane plasmique. Certains canaux sont toujours ouverts et d'autres s'ouvrent ou se ferment de façon rythmique. La plupart des substrats transportés correspondent à des ions. Il existe aussi des canaux pour plusieurs molécules non chargées dont l'eau (qui sont transportées par les aquaporines) et l'urée (qui sont transportés par les canaux à urée).

Le troisième type de système de transport, les transporteurs en tant que tels, déplacent leur substrat à l'aide d'un changement de conformation, comme le font les pompes, sans qu'il n'y ait toutefois d'utilisation d'énergie directement. Il y a trois types de transpor-

teurs protéiques : 1) les uniporteurs qui transportent une molécule à la fois selon un gradient électrochimique, 2) les symporteurs ou cotransporteurs qui déplacent au moins deux molécules simultanément dans la même direction et 3) les antiporteurs qui déplacent au moins deux molécules simultanément dans une direction opposée. Dans le cas des multiporteurs, il arrive qu'une des molécules transportées se fasse contre-gradient quand le gradient pour les autres molécules l'y pousse. Ce processus s'appelle transport actif secondaire.

Au laboratoire, nous travaillons sur une famille de transporteurs appelée cotransporteurs cation-Cl⁻ (CCC) dont le rôle est de coupler la translocation des ions Cl⁻ avec les cations K⁺ et/ou Na⁺. Par exemple, le cotransporteur Na⁺-K⁺-Cl⁻ de type 1 (NKCC1) lie deux ions Cl⁻, un cation Na⁺ et un cation K⁺ simultanément à l'extérieur de la cellule pour les ramener vers l'intérieur de la cellule. Les gradients électrochimiques favorables au mouvement intérieur du Cl⁻ et du Na⁺ sont plus élevés que le gradient électrochimique favorable au mouvement extérieur du K⁺, ce qui permet au K⁺ d'être incorporer dans la cellule.

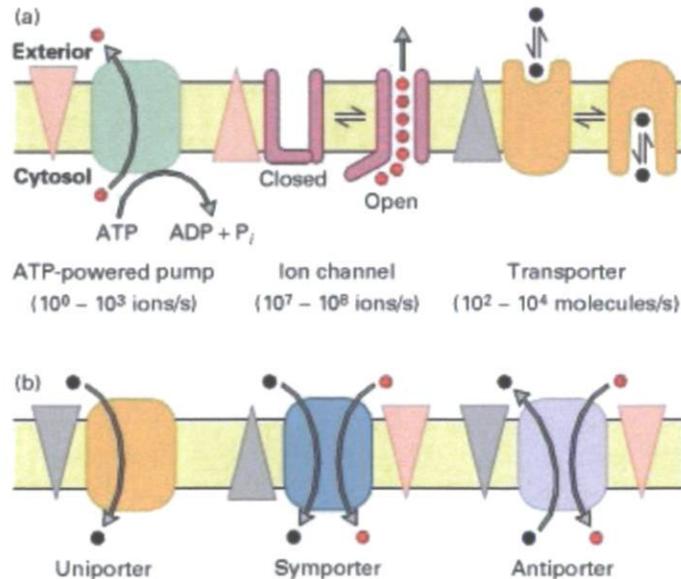


Figure 1. Vue d'ensemble des protéines de transport membranaire [2].

À la figure 1, un récapitulatif des différents systèmes de transport est montré. En (a) une pompe ATPase, un canal et un transporteur sont schématisés par différents symboles et

en (b) les trois types de transporteurs sont aussi schématisés par des symboles. Tel que noté dans la figure, la vitesse de transport pour les pompes et transporteurs est de 10^0 à 10^4 molécules/seconde, alors que celle pour les canaux est de 10^7 à 10^8 molécules/seconde. Ces différences sont dues au fait que les pompes et les transporteurs déplacent une ou quelques molécules à chaque cycle de changement de conformation, tandis que les canaux peuvent laisser traverser plusieurs molécules une fois qu'ils sont ouverts sans nécessairement changer de conformation.

2. Les cotransporteurs cation-Cl⁻ (CCC)

2.1. La famille des CCCs

Les cotransporteurs cation-Cl⁻ sont classés dans la famille 12 des *solute carriers* (SLC12). Ceux qui sont capables de transporter les ions sont caractérisés par un transport électroneutre, c'est-à-dire, qu'ils ne génèrent pas de charge électrique durant le transport, leur stœchiométrie étant d'un anion pour un cation, alors que tous les ions se déplacent dans la même direction. La plupart des CCCs sont inhibés par les diurétiques de l'anse (furosémide, bumétanide) et/ou les thiazidiques. La famille SLC12 compte jusqu'à présent 9 membres : le cotransporteur Na⁺-K⁺-Cl⁻ de type 1 (NKCC1 ou SLC12A2) [3], le cotransporteur Na⁺-K⁺-Cl⁻ de type 2 (NKCC2 ou SLC12A1) [4, 5], le cotransporteur Na⁺-Cl⁻ (NCC ou SLC12A3) [6], les cotransporteurs K⁺-Cl⁻ (KCC1 à KCC4 ou SLC12A4 à SLC12A7) [7], CCC8 (CIP, SLC12A9) et CCC9 (SLC12A8). À noter que CCC8 et CCC9 n'agissent pas comme des cotransporteurs cation-Cl⁻ mais bien comme des transporteurs de polyamines et/ou d'aa [8, 9].

2.2. Découverte et historique

Au milieu des années 70, un transport Na⁺-Cl⁻ électroneutre inhibé par le furosémide et la ouabaïne a été décrit pour la première fois et ce dans la vessie de la plie rouge *Pseudopleuronectes americanus* [10]. En 1980, ce type de transport a été caractérisé davantage dans les cellules d'Ehrlich [11] pour réaliser qu'il était aussi dépendant du K⁺ et électroneutre. À noter qu'un cotransport Na⁺-K⁺ électroneutre sensible au furosémide a aussi

été décrit dans les globules rouges au milieu des années 70 [12]. Par la suite, plusieurs groupes ont tenté de mettre la main sur la ou les protéine(s) responsable(s), mais il aura fallu attendre jusqu'au début des années 1990 pour isoler NKCC1. En effet, Xu *et al.* ont réussi à le cloner pour la première fois à partir de la glande rectale du requin *Squalus acanthias* grâce à un anticorps monoclonal [3]. À noter que durant la même période, Gamba *et al.* avaient aussi réussi à cloner NCC à partir de la vessie de la plie rouge [6]. En rétrospective, il est possible que le transport détecté dans ce tissu durant les années 70 provenait de l'activité combinée des deux CCCs, soit de NCC et de NKCC1.

Suite à l'identification des deux premiers CCCs, il a été possible d'isoler NKCC2 dans le rein du lapin [4] et du rat [5] par criblage de banques d'ADNc. Éventuellement, les six autres membres de la famille des CCCs ont été isolés et plusieurs variantes d'épissage ont été identifiées pour chacun des isoformes. À l'heure actuelle, l'on connaît la séquence de plusieurs CCCs provenant d'un grand nombre d'orthologues et ce, surtout grâce à l'avènement des banques d'ESTs.

2.3. Structure des CCCs

Les CCCs possèdent entre 714 et 1212 aa, ce qui leur confère une masse moléculaire de 85 et 132 kDa [13]. Ils partagent plusieurs caractéristiques structurales entre eux tel qu'en témoigne leur homologie de séquence en aa variant de 19 à 76% [14]. Le modèle structural prédit pour la plupart des CCCs est d'ailleurs semblable, incluant une région amino-terminale (*N*-terminale) intracellulaire peu conservée, une région centrale hydrophobe très conservée qui contient approximativement 500 aa organisés en 12 segments transmembranaires, de même qu'un domaine carboxyl-terminal (*C*-terminal) intracellulaire modérément conservé [3, 6, 9, 13, 15]. Dans tous les CCCs, il existe plusieurs sites de phosphorylation intracellulaires putatifs et des sites de *N*-glycosylation extracellulaires aussi putatifs. La figure 2 montre un exemple de modèle hydropathique de CCC, ici de NKCC2A, où l'on y voit les trois domaines décrits ci-dessus de même que la boucle extracellulaire où sont situés les présumés sites de *N*-glycosylation.

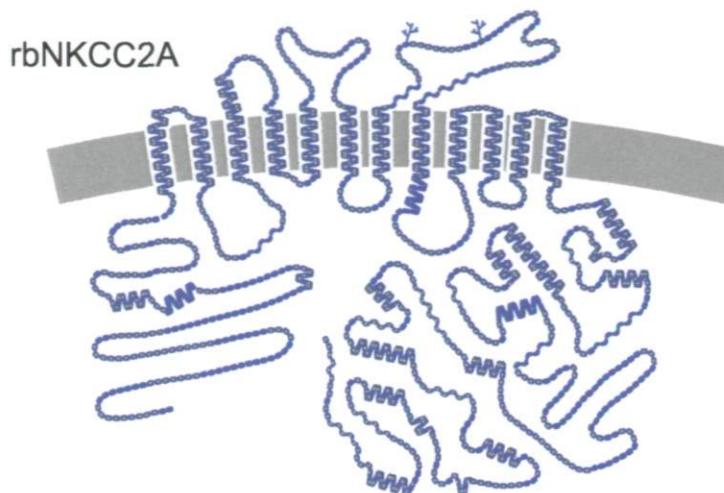


Figure 2. Représentation hydropathique de NKCC2A de lapin [4].

2.4. Rôles des CCCs

Tel que mentionné précédemment, les CCCs sont des protéines membranaires capables de transporter les ions Cl^- avec le Na^+ et/ou le K^+ de façon électroneutre avec une stœchiométrie de $1\text{Na}^+:1\text{Cl}^-$ (NCC), $1\text{K}^+:1\text{Cl}^-$ (KCC) ou $1\text{Na}^+:1\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ (NKCC). Pour que le transport s'effectue, tous les ions doivent occuper les sites de liaison en même temps. Il se produit alors un changement de conformation de la protéine avec mouvement des sites de liaison qui permet la translocation de tous les ions.

Tous les CCCs peuvent fonctionner dans les deux directions, c'est-à-dire, transporter les ions de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule ou de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule. Le sens du mouvement est cependant dicté par les gradients ioniques de part et d'autre de la membrane et par la stœchiométrie de transport. Ainsi, les CCCs transporteurs de Na^+ auront comme propension de favoriser le mouvement des ions vers l'intérieur de la cellule et les CCCs non transporteurs de Na^+ de favoriser le mouvement des ions vers l'extérieur de la cellule.

Dans le cas des CCCs transporteurs de Na^+ , ce sont les gradients en Na^+ (établi par la pompe $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$) et en Cl^- qui permettent le mouvement des ions vers l'intérieur de la cellule. Même si le gradient en Cl^- est moins important que celui en Na^+ , il faut se rappeler qu'il y a deux sites de liaison pour l'anion, ce qui a pour effet d'accroître la différence de concentration effective. Pour cette même raison, il arrive que le transporteur NKCC1 fonctionne aussi dans la direction opposée, en outre, lorsque le Cl^- intracellulaire est beaucoup plus élevé que le Cl^- extracellulaire comme dans certains tissus [16].

Dans le cas des CCCs non transporteurs de Na^+ , c'est le gradient K^+ (établi encore une fois par la pompe $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$) qui permet le mouvement des ions vers l'intérieur de la cellule (voir table 1). Toutefois, il arrive que la concentration extracellulaire de K^+ atteigne des niveaux très élevés, comme durant le couplage électromécanique alors que la cellule est en phase de repolarisation. Dans ce contexte, certains ont émis l'hypothèse que certains KCCs pourraient servir à tamponner l'excès de K^+ accumulé dans les espaces tubulaire T suivant la dépolarisation et ce, en favorisant le mouvement des ions K^+ et Cl^- vers l'intérieur de la cellule [17].

Comme les CCCs transporteurs d'ions sont aussi tous des transporteurs de Cl^- et comme leur activité est sensible à la concentration intracellulaire de Cl^- , l'un de rôles présumés importants de cette famille de protéines est de réguler la concentration intracellulaire de Cl^- . Ce faisant, ils permettent à la cellule d'accomplir différents rôles, en modulant le potentiel de membrane par exemple. En effet, l'entrée ou la sortie électroneutre de Cl^- par les CCCs s'accompagnent d'un réajustement de la concentration intracellulaire grâce à l'activité de canaux à Cl^- qui eux sont électrogéniques [18].

Un autre rôle important des CCCs est la régulation du volume cellulaire. Comme ces protéines ont souvent des capacités de transport assez élevées et comme elles sont ubiquitaires, elles permettent donc des mouvements d'eau secondaires souvent importants [19]. Par exemple, lorsque la cellule rétrécit dans un milieu hyperosmolaire, les NKCCs sont activés et engendrent donc une entrée d'eau secondaire avec rétablissement du volume cellulaire. Cette séquence d'événements est d'ailleurs appelée « *Regulatory Volume Increase* » ou (RVI) [16]. Au contraire, quand la cellule gonfle dans un milieu hypoosmolaire, les

KCCs sont activés et engendrent donc une sortie d'eau secondaire avec rétablissement du volume cellulaire encore une fois. Cette autre séquence est appelée « *Regulatory Volume Decrease* » ou (RVD) [7].

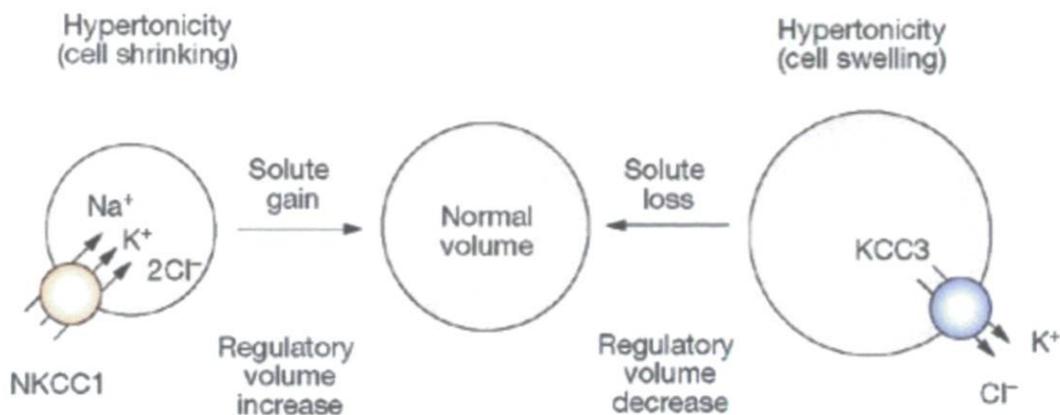


Figure 3. Régulation du volume cellulaire par les cotransporteurs cation-Cl⁻ [20].

Les CCCs sont aussi impliqués dans le transport transépithélial d'ions et, ainsi, dans le mouvement osmotique d'eau dans le sens du transport des ions. Ce mouvement peut s'effectuer des deux sens soit du sang vers la lumière de l'épithélium ou vice versa. La direction des ions va dépendre du type de CCC impliqué et des gradients électrochimiques lumière vs. épithélium de même qu'épithélium vs. sang. Ainsi, les KCCs participeront habituellement à l'absorption des ions puisqu'ils sont localisés du côté basolatéral des cellules polarisées [21, 22], NKCC1 à la sécrétion des ions puisqu'il est aussi localisé du côté basolatéral [23], et NKCC2 de même que NCC à l'absorption des ions puisqu'ils sont localisés du côté apical [24, 25]. Notons que KCC4 et NKCC1 dans le plexus choroïde constituent des exceptions puisqu'ils sont localisés en apical et favorisent donc à la sécrétion et l'absorption des ions respectivement [26, 27]. Notons aussi que NKCC2 est exprimé dans l'anse ascendante large de Henle (TALH) et NCC dans le tubule contourné distal (DCT) où ils contribuent à la réabsorption d'une grosse fraction des ions filtrés par le glomérule.

Par ailleurs, les CCCs transporteurs d'ions peuvent tous être inhibés par certains médicaments appelés diurétiques. Toutefois, l'affinité des CCCs pour ces médicaments varie en fonction de l'isoforme et du type de diurétiques. Par exemple, l'activité de NCC

est surtout bloquée par les thiazides tel que le métolazone [28] alors que celle des NKCCs [29, 30] et des KCCs [17] sont inhibées par les diurétiques de l'anse tels le bumétanide et le furosémide. A noter toutefois, que les KCCs sont moins sensible au bumétanide que ne le sont les NKCCs, et que KCC4 peut aussi être inhibé par les thiazides [17].

3. Les cotransporteurs $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{Cl}^-$ (NKCCs)

Tel que mentionné, il existe deux types de NKCCs, c'est-à-dire, NKCC1, lequel est exprimé de façon ubiquitaire et NKCC2, lequel est exprimé spécifiquement dans le rein. Tel que précédemment mentionné, NKCC1 a été cloné la première fois par Xu *et al.* en 1994 chez le requin (voir section 2.2) [3]. Ensuite, il a été cloné par Delpire *et al.* chez la souris [31] et identifié chez plusieurs espèces incluant l'humain [32], le bœuf [33], le rat [34], l'anguille [35], le bar commun [36] et la plante *Arabidopsis thaliana* [37]. NKCC2, lui, a été cloné la première fois par Payne et Forbush chez le rein de lapin [4] et dans la même période par Gamba *et al.* chez le rat [5]. Ensuite, il a été cloné et identifié chez la souris [38], l'homme [39] et le requin [40].

NKCC1 et NKCC2 partagent 80% d'homologie dans leur régions centrales, ~55% dans leurs domaines *C*-terminaux et ~30% dans leurs domaines *N*-terminaux pour une moyenne de 60%. Ils partagent toutefois une homologie globale beaucoup moins grande avec les KCCs, soit de 25% [13]. En outre, tous deux ont une boucle extracellulaire glycosylée entre les segments transmembranaires (TM) sept et huit, alors que les KCCs ont une boucle glycosylée entre les TM5 et 6. Aussi, leurs domaines *N*-terminaux sont beaucoup plus longs que ceux des KCCs.

Mentionnons ici que les NKCCs sont activés par la phosphorylation et désactivés par la déphosphorylation [41]. Ceci constitue une autre différence avec les KCCs qui, eux, sont activés par la déphosphorylation et activés par la phosphorylation, du moins selon un certain nombre d'études [42-47]. Toutefois, il importe de mentionner qu'une partie des connaissances que nous avons à l'heure actuelle sur la régulation des KCCs provient d'analyses du cotransport chez des globules rouges, un type cellulaire qui exprime KCC1, 3 et 4

de même que plusieurs variantes d'épissage. Comme la variante KCC3A est en grande partie responsable du cotransport K^+-Cl^- dans ces cellules, les modèles de régulation évoqués antérieurement sont d'interprétation difficile. Des études plus récentes ont d'ailleurs montré que certains des isoformes KCCs pouvaient être activés par la phosphorylation [48, 49].

4. NKCC2

NKCC2 est non seulement spécifique au rein, il est spécifique à un groupe de cellules appartenant au TALH où il agit du côté apical exclusivement. Le transport actif du Cl^- dans le TALH a été décrit pour la première fois en 1973 [50, 51] et il a été décrit ensuite, au début des années 80, comme étant couplé au mouvement du K^+ et du Na^+ [52, 53]. Dix ans plus tard, NKCC2 a été cloné chez plusieurs espèces et sa structure primaire a donc été élucidée par des analyses de séquences et des analyses hydrophatiques.

À ce stade-ci, on sait que le cotransporteur contient une région *N*-terminale intracellulaire de ~165 résidus, une région centrale hydrophobe de 475 résidus organisée en 12 TM, et une région *C*-terminale intracellulaire de ~450 ou ~130 résidus (figure 2). Rappelons que les domaines cytoplasmiques possèdent plusieurs sites de phosphorylation et que la boucle extracellulaire entre les TM 7 et 8 possède également deux sites de *N*-glycosylation. D'après une étude de Paredes *et al.*, [54], l'absence de *N*-glycosylation crée une baisse de l'activité de transport et une hausse de l'affinité pour le Cl^- . La masse moléculaire de NKCC2 se situe entre 120 et 150 kDa dépendamment du niveau de glycosylation [55].

4.1 Organisation génomique

L'organisation du gène de NKCC2, *SLC12A1*, est maintenant connue pour plusieurs espèces et peut être obtenue sur le site du NCBI (ncbi.nlm.nih.gov/gene). Voici des exemples avec les numéros d'accession permettant de retrouver les séquences sur le site : 6557 (*Homo sapiens*), 20495 (*Mus musculus*), 25065 (*Rattus norvegicus*), 415433 (*Gallus gallus*), 453410 (*Pan troglodytes*), 478292 (*Canis lupus familiaris*), 100328575 (*Oryctolagus cuniculus*), 100173185 (*Pongo abelii*), 10002573 (*Monodelphis domestica*), 564713 (*Danio*

rerio), 100414428 (*Callithrix jacchus*), 714289 (*Macaca mulatta*), 407161 (*Bos taurus*) et 100055787 (*Equus caballus*). Chez les mammifères, le gène *SLC12A1* couvrent entre 80 et 120 kb de séquences génomiques réparties en 26 exons et codent pour des protéines de 770 à 1100 résidus. Par ailleurs, les introns séparant les zones codantes contiennent entre 120 pb et 15 kb [39, 56, 57].

Le promoteur du gène a été étudié chez la souris plus spécifiquement. Il consiste en une région de 2255 pb qui n'est active que dans le TALH [58]. En effet, Igarashi *et al.* ont montré qu'une construction NKCC2₍₋₂₂₅₅₋₀₎-pGL3B (promoteur de *SLC12A1* cloné devant la luciférase) augmente l'activité luciférase de façon considérable dans des cellules provenant du TALH mais pas dans des NIH 3T3. Ils ont aussi montré qu'une délétion du promoteur entre la région -469 et -190 diminue de 76% l'activité luciférase, suggérant que cette région contient un élément de régulation positif. Le site de liaison de HFN-1 (*hepatic nuclear factor 1*) se situe dans cette région et, de manière intéressante, l'expression de HFN-1 précède l'expression de NKCC2 durant le développement rénal de la souris [59]. Ainsi, il a été avancé que HNF-1 est impliqué dans l'expression spécifique de NKCC2 dans le TALH. Toutes les régions promotrices de NKCC2 connues chez les mammifères partagent une grande homologie dans les séquences liant les facteurs de transcriptions, tels HFN-1, CREB (cAMP-responsive element binding proteins), HIF (hypoxia inducible factor), HEAT (heat shock factors), GRE (glucocorticoid responsive and related elements), E2FF (E2F-myc activator/cell cycle regulator), etc. Ces sites conservés indiquent que les mécanismes de régulation transcriptionnelle de NKCC2 sont aussi conservés [18].

SLC12A1 peut être produit en plusieurs variantes d'épissage découlant de deux mécanismes indépendants. Le premier implique l'exon 4 qui est représenté par trois cassettes mutuellement exclusives de 96 pb appelées A, B et F. Il est ainsi constitué chez plusieurs espèces dont le lapin [4], l'homme [39], le rat [60] et la souris [24], et il code pour le TM2 et le segment intracellulaire adjacent (voir figure 4). Le deuxième mécanisme, lequel a été observé seulement chez la souris jusqu'à maintenant, implique un site alternatif de polyadénylation dans l'exon 16, faisant en sorte que le C-terminus intracellulaire peut être soit de 457 résidus pour produire un NKCC2 de 1095 résidus (L-NKCC2), soit de 129 résidus pour produire un NKCC2 de 770 résidus (S-NKCC2) [24]. S-NKCC2 contient aussi une

séquence unique de 55 résidus avant le codon stop. [24]. Finalement, une variante où les cassettes A et F sont fusionnées (NKCC2AF) a aussi été décrite. Elle est cependant inactive, bien qu'elle puisse se lier aux autres variantes pour en réduire leur activité [40, 61].

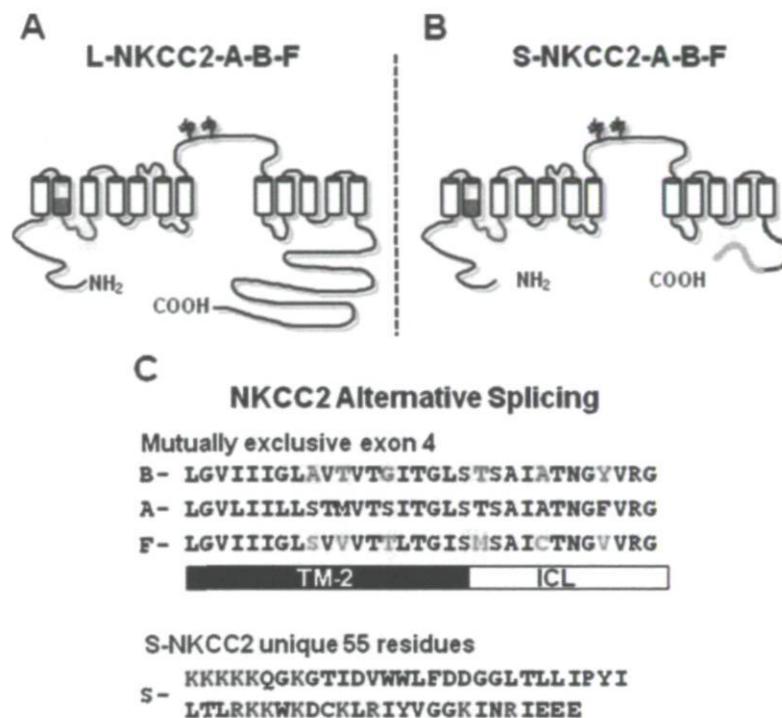


Figure 4. Variantes d'épissage de NKCC2 [62]. **A** Modèle de L-NKCC2-A-B-F où la localisation des cassettes A, B ou F est montrée en rouge. **B** Modèle de S-NKCC2-A-B-F où la localisation des 55 résidus uniques est montrée en orange. **C.** Séquences et alignement des variantes d'épissage de *SLC12A1*. Les résidus en rouge ont été impliqués dans le transport des ions puisque leur remplacement par ceux de F en vert confère à la variante B de nouvelles caractéristiques fonctionnelles. Les résidus en bleu sont chargés positivement.

4.2 Distribution

Tel que mentionné, le TALH correspond au site d'expression privilégié de NKCC2 et est localisé dans le cortex et la médullaire externe du rein. Il correspond à l'un des seg-

ments du néphron tubulaire qui inclut aussi le tubule proximal, l'anse fine de Henle, le DCT et le tubule collecteur, et qui est connecté au glomérule pour former l'unité fonctionnelle du rein. Le TALH est localisé plus précisément entre l'anse fine de Henle et le DCT, prenant fin dans une région spécialisée qu'on appelle la *macula densa* (voir figure 5).

Le glomérule filtre une grande quantité de liquide du sang vers le tubule lequel transforme ensuite ce liquide en urine grâce à la réabsorption d'éléments divers qu'il est essentiel de récupérer tels le glucose, l'eau, le Na^+ , etc. Le tubule sécrète aussi des déchets métaboliques comme des bases et acides organiques [63]. La branche descendante mince de l'anse de Henle a comme fonction de permettre la diffusion de sels, d'urée et d'eau à travers sa paroi. Environ 20% de l'eau filtrée y est réabsorbée. La branche ascendante mince est, au contraire, imperméable à l'eau et de ce fait, participe au processus de la multiplication à contre-courant (voir section 4.5). Le TALH est aussi imperméable à l'eau mais réabsorbe une grande quantité de sels en provenance du filtrat (~25% de la quantité totale). Il réabsorbe aussi plusieurs autres substances dont les cations divalents et les ions ammonium.

Les variantes d'épissage de NKCC2 sont localisées à des endroits différents le long du TALH. Tel que démontré chez le lapin [4], la souris [38] et le rat [60] par *Northern blot*, hybridation *in situ* et RT-PCR, respectivement, leur distribution va comme suit : NKCC2F dans la couche interne de la médullaire externe, A dans la couche externe de la médullaire externe de même que dans le cortex, et B dans la *macula densa* exclusivement. Par ailleurs, NKCC2F est la plus abondante des variantes et NKCC2B, la moins. Chez l'homme, la situation diffère pour NKCC2F qui est surtout exprimé dans la couche externe de la médullaire externe de même que dans le cortex et la *macula densa* [64]. Il y a moins d'information disponible sur la distribution de la variante tronquée de NKCC2 (S-NKCC2), mais chez la souris, cette variante est plus abondante dans le segment médullaire [24].

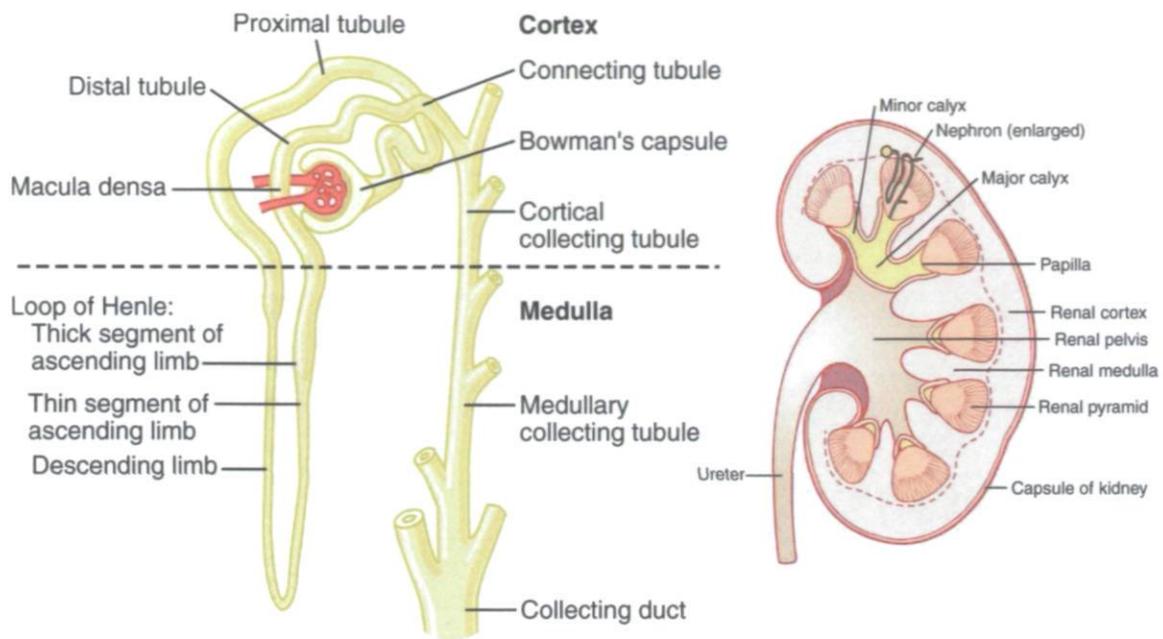


Figure 5. Représentation d'un néphron [63].

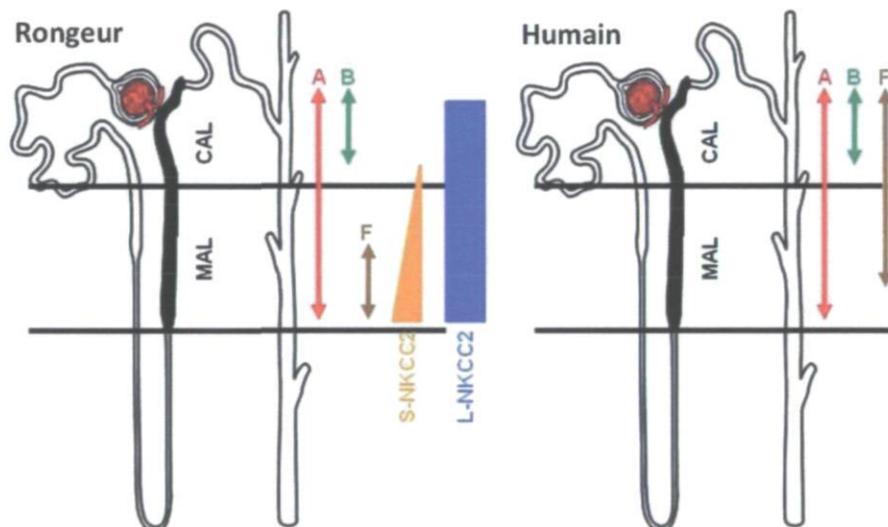


Figure 6. Distribution des variantes d'épissage de NKCC2. MAL = anse ascendante large médullaire. CAL = anse ascendante large corticale [62, 64].

Mentionnons ici que NKCC2 ne serait pas exprimé uniquement dans le TALH [13], mais se retrouverait dans d'autres tissus en quantité très faible. En outre, des analyses d'expression par biopuces à ADN ont démontré la présence du transcrite à différents sites extra-rénaux [65], et des analyses d'expression par anticorps, sa présence dans le tube gastro-intestinal [66]. La signification physiologique de ces trouvailles demeure néanmoins

incertaine pour le moment. Certains auteurs ont évoqué un rôle de NKCC2 dans la réabsorption du Cl^- par le colon distal chez le rat [67].

4.3 Propriétés fonctionnelles

La stœchiométrie de transport est supposément $1\text{Na}^+:1\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ pour NKCC2 [16]. La spécificité des sites de liaison des ions n'est pas absolue car le Li^+ peut remplacer le Na^+ , le Rb^+ ou le NH_4^+ peuvent remplacer le K^+ et le Br^- peut remplacer le Cl^- sans modification considérable de l'activité de transport [11, 68, 69]. Il en va d'ailleurs de même pour NKCC1 [30]. Le transport de ces ions Na^+ , K^+ et Cl^- se fait de façon interdépendante, c'est-à-dire, la liaison du premier ion favorise celle du second, la liaison du second favorise celle du troisième et la liaison du troisième favorise celle du quatrième. Les ions se lient et se dissocient aussi au cotransporteur selon des séquences préétablies, c'est-à-dire, ils se lient dans l'ordre $\text{Na}^+-\text{Cl}^--\text{K}^+-\text{Cl}^-$ et se délient dans l'ordre $\text{Na}^+-\text{Cl}^--\text{K}^+-\text{Cl}^-$ [70].

Les études sur les caractéristiques de transport de NKCC2 ont, pour la plupart, été réalisées dans le système d'expression hétérologue des oocytes de *Xenopus laevis*. Dans ce système, l'expression est obtenue après injection de l'ARNc qui code pour la protéine d'intérêt et le transport est mesuré grâce à un marqueur tel que le Rb^+ . C'est grâce à de telles études qu'il a été possible de démontrer des différences fonctionnelles qui existent entre les variantes d'épissage de NKCC2.

Dans les paragraphes suivants, ces différences seront expliquées plus en détail d'après des études menées avec des cotransporteurs de lapin et de souris. Il sera aussi question des rôles joués par chacune des variantes et ce, à la lumière des données cinétiques discutées de même que de la localisation de celles-ci le long du TALH.

D'après de telles études, la variante qui a la plus grande affinité pour le Cl^- , l'ion limitant dans le cotransport, et la moins grande capacité de transport, est la variante d'épissage B. Celle-ci se retrouve d'ailleurs dans le segment cortical du TALH où la concentration en Na^+ et Cl^- du fluide tubulaire est grandement réduite par la réabsorption dans

les segments plus proximaux [71, 72]. Plus particulièrement, NKCC2B est localisé dans la *macula densa* où il jouerait un rôle clé dans l'initiation du feedback tubuloglomérulaire.

Toujours d'après ces études, la variante F est celle qui a l'affinité la moins élevée pour les ions et elle est aussi celle qui est exposée à la plus grande concentration en Na^+ et Cl^- le long du TALH de par sa localisation dans la médullaire externe [71, 72]. Elle a toutefois une capacité de transport plus élevée que celle de NKCC2B. Vu son abondance qui excède celle des autres variantes, elle est donc celle qui a la plus grande capacité de transport par unité de membrane. À cet effet, des études plus anciennes avaient montré que dans des segments tubulaires isolés du TALH de lapin et de souris, les taux de transport en Na^+ et en Cl^- étaient plus importants dans la région médullaire [51, 73]. Le rôle principal de NKCC2F serait de veiller à la réabsorption quantitative du Na^+ et du Cl^- filtrés, de maintenir la médullaire hypertonique via le mécanisme de multiplication à contre-courant et de participer au mécanisme de dilution urinaire grâce, en outre, à l'absence d'aquaporines dans le TALH.

Finalement, NKCC2A a une affinité pour les ions qui est intermédiaire à celle de NKCC2B et NKCC2F, et sa capacité de transport est similaire, sinon supérieure à celle de NKCC2F [71, 72]. Il participe donc aussi à la multiplication à contre-courant de même qu'à la dilution urinaire. De manière intéressante, les études plus anciennes dont il a été question ci-dessus avaient aussi montré que le pouvoir de dilution était meilleur dans le cortex [51, 74] où l'expression de NKCC2A est plus élevée que celle de NKCC2F. Ces données suggèrent que NKCC2A jouerait un rôle particulièrement important dans la dilution de l'urine.

Chez l'humain, c'est la variante d'épissage A qui a la plus basse affinité pour l'ion Cl^- , suivi du F et ensuite du B [64]. Ces caractéristiques diffèrent de celles observées avec les cotransporteurs de lapin ou de souris. Elles peuvent paraître surprenantes à première vue, mais on sait aussi que NKCC2F est localisé différemment. Chez l'homme, par exemple, NKCC2A est beaucoup plus abondant que NKCC2F [64], alors que chez la souris, NKCC2F est trois fois plus abondant que NKCC2A [75].

Pour ce qui est de la forme tronquée, une étude de Plata *et al.* dans le système d'expression des oocytes a montré que S-NKCC2 n'était pas active, mais qu'elle pouvait agir comme un dominant négatif lorsque coexprimée avec L-NKCC2 [76]. Un peu plus tard, une autre étude a montré qu'en condition hypoosmolaire, S-NKCC2 pouvait agir comme un cotransporteur $\text{Na}^+ - \text{Cl}^-$ indépendant du K^+ [77]. Il reste encore à savoir si des versions semblables de S-NKCC2 sont exprimées chez d'autres espèces et de connaître le rôle exact de cette variante dans le TALH.

4.4 Régulation

4.4.1 Régulation de l'expression protéique

Il y a très peu d'études sur la régulation du gène *SLC12A1*. Toutefois, quelques conditions sont connues pour moduler l'abondance de NKCC2 dans le TALH. Par exemple, des infusions d'ADH (*antidiuretic hormone*) chez des rats Brattleboro, lesquels ne produisent pas l'hormone ADH naturellement, se solde par une augmentation de l'expression de NKCC2 dans le TALH [78]. Chez les rats, l'administration à long terme d'ADH se solde aussi par une augmentation de la réabsorption du Cl^- dans le TALH médullaire [79], et une restriction hydrique, par une augmentation de l'expression de NKCC2 dans le même segment tubulaire [78, 80]. À l'inverse, une diète riche en eau chez la souris, diète qui a pour effet d'inhiber la production d'ADH, se solde par une diminution de la quantité d'ARNm codant pour NKCC2 [61].

Il a été suggéré qu'en se liant au récepteur V2, l'ADH permet le recrutement de kinases comme la PKA via l'AMP cyclique, ce qui a pour effet d'activer des facteurs de transcription se liant au promoteur de NKCC2 [81]. Cette hypothèse est appuyée par les données suivantes : Premièrement, l'expression de NKCC2, de protéines Gs et d'AMPc diminue de manière considérable dans le TALH de souris dont l'un des allèles codant pour la sous-unité α de la protéine G hétérotrimérique Gs est inactivé [82]. Deuxièmement, la prostaglandine E_2 , laquelle se lie au récepteur EP3 couplé à l'adénylate cyclase via la protéine Gi et inhibe donc la production d'AMPc, a un effet inhibiteur à long terme sur l'expression de NKCC2 [83]. À l'inverse, les inhibiteurs de prostaglandines synthases tels

que l'indométhacine et le diclofénac augmentent la synthèse de NKCC2 [83]. Troisièmement, un site de liaison pour le facteur de transcription CREB, lequel semble être impliqué dans l'augmentation de l'expression de NKCC2 par l'AMPc, a été identifié dans la région promotrice du gène [58].

L'angiotensine II (Ang-II) correspond à un autre facteur qui régule (à la hausse) l'expression de NKCC2 dans le TALH où l'on retrouve aussi un récepteur de l'Ang-II de type 1 [84]. L'Ang-II est un petit peptide qui joue un rôle fondamental dans la régulation de la PA en provoquant la vasoconstriction d'artérioles dans plusieurs territoires vasculaires et en stimulant la sécrétion d'aldostérone. Lorsque l'Ang-II agit sur l'artériole efférente du glomérule, il se produit une augmentation de la fraction filtrée par augmentation de la pression intraglomérulaire.

L'expression du cotransporteur peut aussi être régulée à long terme par des changements de pH. Par exemple, NKCC2 est exprimé à la hausse lors d'une acidose métabolique [85] via une augmentation de la stabilité de l'ARNm du cotransporteur sans affecter la transcription du gène *SLC12A1* [86]. Cette stabilisation survient grâce à la protéine ζ -cristalline qui, en présence d'un pH bas, se lie à une séquence riche en AU dans la région 3'UTR de NKCC2 [87]. Rappelons que NKCC2 est capable de transporter le NH_4^+ avec son site de liaison pour le K^+ [69]. Cette propriété fonctionnelle permet à NKCC2 de réabsorber le NH_4^+ qui parvient au TALH et de le concentrer dans la médullaire, ce qui entraînera ensuite sa sécrétion dans le tubule collecteur sous forme de NH_3 . Comme la quantité de NH_4^+ augmente dans le tube proximal durant les états d'acidose, la stabilisation de l'ARNm de NKCC2 aurait donc pour but d'augmenter l'absorption de l'ammonium dans le TALH pour permettre la sécrétion de NH_3 en plus grande quantité dans le tubule collecteur. Le cotransporteur participe ainsi à l'équilibre acido-basique en éliminant les protons provenant du catabolisme des protéines alimentaires sous forme tamponnée [88].

Pour terminer, mentionnons que des différences d'expression de NKCC2 ont été observées entre les sexes. Le cotransporteur est plus abondant chez la femme et c'est l'hormone 17- β estradiol qui en serait la cause. Par ailleurs, il semble que la progestérone

aurait l'effet inverse [89]. NKCC2 pourrait donc être impliqué dans les états de rétention hydrosodée cycliques que présente la femme durant sa période de vie féconde.

4.4.2 Glycosylation

Tel que mentionné, NKCC2 possède deux sites putatifs de *N*-glycosylation entre ses TM 7 et 8, soit N442 et N452. Ces sites correspondent à une séquence spécifique d'aa Asn-X-Ser/Thr, où X peut être n'importe lequel des aa excepté la proline, et se lie à une chaîne d'oligosaccharides à partir de l'Asn pendant la traduction de la protéine [90]. L'évidence que N442 et N452 soient réellement glycosylées repose sur l'effet produit suite au remplacement de l'Asn par un autre résidu et sur l'effet de la tunicamycine, un composé qui inhibe la glycosylation des glycoprotéines. En effet, et les mutations, et le composé produisent une réduction considérable du poids moléculaire de NKCC2 selon des immunobuvardages de type *Western* [54].

L'importance fonctionnelle des sites de glycosylation a été bien démontrée encore une fois par mutagenèse. En effet, l'élimination d'un seul site de glycosylation baisse l'influx d'ions par NKCC2 de 50% et l'élimination des deux sites le baisse de 80%. Cet effet serait dû à une réduction du nombre total de NKCC2 à la membrane et également à une baisse de l'activité intrinsèque de la protéine [54].

4.4.3 Oligomérisation

Plusieurs protéines membranaires existent sous la forme d'oligomère, c'est-à-dire, qu'elles se lient entre elles grâce à des sites à la fois spécifiques et non spécifiques. L'oligomérisation peut être nécessaire pour assurer la stabilité de la protéine, son cheminement du réticulum endoplasmique aux organelles plus distales ou sa fonction spécifique. Pour NKCC2, il a été montré que le cotransporteur existait sous une forme oligomérique [91] et qu'il n'était probablement peu ou pas fonctionnel en tant que monomère. Grâce à des travaux du laboratoire, des régions d'interactions permettant le contact NKCC2-NKCC2 à partir du *C*-terminus ont été récemment identifiées. Ces régions se situent entre les résidus 671 à 816 et entre les résidus 910 à 1098 [61].

L'effet dominant négatif de S-NKCC2 sur L-NKCC2 pourrait être dû à la formation de dimères entre les deux variantes. À ce titre, on sait que S-NKCC2 est surtout localisé dans des vésicules intracellulaires subapicales [24], qu'une fraction non négligeable de L-NKCC2 l'est aussi [92] et que l'effet dominant négatif peut être renversé par l'ajout d'AMPc [24]. Ces données suggèrent que le complexe S-NKCC2/L-NKCC2 se dissocie une fois phosphorylé sous l'effet de l'ADH permettant à L-NKCC2 d'atteindre la surface cellulaire (voir section suivante). Une étude a d'ailleurs démontré que l'effet inhibiteur de l'AMPc peut être prévenu par l'ajout de colchicine, un inhibiteur de l'exocytose [93].

Tel que mentionné auparavant, la variante AF (qui est en soi non fonctionnelle dans un système d'expression hétérologue) peut aussi former des oligomères avec les autres variantes et inhiber leur fonction de transport [61]. Cependant, le mécanisme par lequel cette inhibition se produit demeure inconnu à ce jour. Peut-être implique-t-il un défaut de translocation de la variante fonctionnelle vers la membrane tel qu'il en est le cas pour S-NKCC2.

4.4.4 Phosphorylation et translocation à la membrane

Il a été démontré que 2 à 3% de la quantité de NKCC2 présent dans le TALH est à la membrane apicale sous des conditions basales et que ce % augmente drastiquement après l'exposition des tubules à l'AMPc [94]. On sait aussi que la translocation de NKCC2 est augmentée par l'ADH qui, tel que mentionné, phosphoryle le cotransporteur aux thréonines 96 et 101 [95] via une série d'intermédiaires. Ce mécanisme de régulation a été mis en lumière grâce à un anticorps reconnaissant seulement la forme phosphorylée de NKCC2 aux résidus 96 et 101. Les intermédiaires dont il est question incluent l'AMPc [94], les VAMPs (*vesicle-associated membrane protein*) [94], les SNAREs (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*) [94], la PKA [96] et les radeaux lipidiques [97]. À noter que l'hormone de croissance induit également une phosphorylation de NKCC2 aux même résidus que l'ADH en activant un récepteur tyrosine-kinase-associé [98]. Finalement, un autre intervenant appelé MAL (*myelin and lymphocyte-associated protein*) augmenterait aussi la proportion de cotransporteurs à la surface cellulaire par phosphorylation du cotransporteur, mais en diminuant l'internalisation de celui-ci [99].

À l'inverse de l'ADH, l'aldolase B inhibe le transport de NKCC2 à la membrane en se liant directement au cotransporteur [43]. On sait que l'aldolase B interagit avec l'actine, suggérant qu'elle pourrait aussi inhiber la translocation de NKCC2 vers la membrane [43]. SCAMP2, une protéine impliquée dans la régulation des vésicules de transport post-golgien, aurait aussi pour effet de diminuer la quantité de NKCC2 à la surface en interagissant avec le cotransporteur dans le cytoplasme [100].

Des études récentes ont montré que NKCC2 est également la cible d'une famille de kinases appelées *with no lysine kinases* (WNK). Ces enzymes sont des sérine/thréonine kinases mais ne possèdent pas la lysine qui est habituellement conservée dans le site catalytique des kinases [18]. Deux des isoformes (WNK1 et 4) ont été associés à une forme d'hypertension artérielle héréditaire appelée pseudohypoaldostéronisme de type II (PHAII) qui s'accompagne aussi d'une hyperkaliémie et d'une acidose métabolique [101]. Cette association a conduit les chercheurs à émettre l'hypothèse que les WNKs réguleraient les CCCs rénaux à la hausse pour entraîner une rétention du Na^+ et du Cl^- filtrés, produisant ainsi un phénotype en miroir de celui des syndromes de Gitelman et de Bartter qui sont causés par l'inactivation de NCC (*SLC12A3*) et NKCC2 (*SLC12A1*), respectivement, et s'associent à une perte excessive du Na^+ et du Cl^- filtrés avec hypokaliémie et alcalose métabolique [102].

À ce stade-ci, on sait que WNK3 est exprimé dans le TALH et régule NKCC2 à la hausse [103]. De manière intéressante, WNK1 régulerait aussi NKCC2 à la hausse [104, 105], alors qu'une forme tronquée de WNK1 spécifique au rein (KS-WNK1) régulerait le cotransporteur à la baisse en diminuant son niveau de phosphorylation, mais ce, par un mécanisme qui demeure encore inconnu [106]. De façon intéressante, certains chercheurs ont émis l'hypothèse que la régulation de NCC, qui fait aussi intervenir WNK1, impliquerait les deux variantes de l'enzyme et que c'est le ratio WNK1/KS-WNK1 qui déterminait de l'effet final sur l'activité de transport, c'est-à-dire, qu'un ratio WNK1/KS-WNK1 élevé se soldait par une régulation à la hausse de NCC et qu'un ratio WNK1/KS-WNK1 abaissé se soldait par une régulation à la baisse de NCC [106, 107]. Reste à déterminer si le même modèle pourrait s'appliquer à NKCC2.

Il est important de mentionner que WNK1 et 3 n'interagissent pas directement avec NKCC2, mais qu'ils interagissent plutôt sur le transporteur via SPAK/ORS1 (*Ste20p-related proline-alanine-rich kinase/oxidative stress response 1*). Le modèle actuellement proposé est que ces WNKs phosphoryleraient SPAK/ORS1 qui eux phosphoryleraient NKCC2 aux thréonines 96 et 101 dans les compartiments intracellulaires après y avoir été dirigé par la protéine SORLA (*sorting protein-related receptor with A-type repeats*) [105, 108, 109]. À cet effet, la perte de SORLA chez la souris entraîne une localisation anormale de SPAK/ORS1 avec une perte rénale de NaCl [109]. Ce modèle demeure toutefois incertain puisqu'il n'est pas supporté par des analyses de phosphorylation *in vitro* et puisqu'un mutant de NKCC1 qui a perdu l'habileté de se lier à SPAK/ORS1 peut quand même être phosphorylé [110]. Par ailleurs, mentionnons pour terminer, que l'activité de WNK3 est augmentée par la réduction du Cl_i [108].

Le dernier régulateur de NKCC2 à avoir été identifié est l'AMPK (*AMP-activated kinase*) qui est une sérine/thréonine kinase jouant un rôle important dans la régulation de la dépense énergétique et du transport d'électrolytes [111]. En effet, il a été démontré que l'AMPK est localisée aux mêmes endroits que NKCC2 dans le TALH [112], que la kinase peut être coimmunoprécipitée avec le domaine N-terminal du cotransporteur, qu'elle phosphoryle NKCC2 à la sérine 126 et qu'une mutation de cette sérine pour une alanine se solde par une baisse du cotransport en milieu isotonique [111].

4.5 Rôles physiologiques

4.5.1 Concentration et dilution de l'urine

La capacité qu'ont les mammifères à rendre leur urine plus concentrée que le plasma est essentielle pour minimiser les pertes d'eau lorsque les apports sont insuffisants ou les pertes extrarénales excessives, et la capacité qu'ils ont à rendre leur urine plus diluée est essentielle pour évacuer les apports d'eau excessive. Tel que discuté, cette capacité est en partie dépendante de l'activité de NKCC2 qui participe à la multiplication à contre-courant (ce qui permet d'augmenter la tonicité de la médullaire) et extrait le Na⁺ et le Cl⁻ du fluide tubulaire en l'absence d'eau (ce qui permet de diluer le fluide tubulaire cortical). C'est en-

suite au tubule collecteur que l'urine sera excrétée maximalelement diluée ou maximalelement concentrée selon la concentration ambiante d'ADH [113].

Si l'urine entre dans le collecteur et en ressort sans qu'il n'y ait eu de réabsorption d'eau, elle sera alors maximalelement diluée. C'est ce qui survient en l'absence d'ADH puisque le collecteur est imperméable à l'eau. Si l'urine entre dans le collecteur et en ressort après qu'il y a réabsorption importante d'eau, elle sera alors maximalelement concentrée puisque son osmolalité s'équilibrera avec celle de la médullaire hypertonique. C'est ce qui survient en présence d'ADH puisque cette hormone insert des aquaporines 2 dans la membrane apicale du tubule collecteur pour la rendre perméable à l'eau [114]. Tel que mentionné auparavant (section 4.4.1 et 4.4.4), l'ADH régule aussi NKCC2 à la hausse en augmentant sa translocation à la membrane [95] et sa transcription [78]

Le phénotype de souris NKCC2^{-/-} démontre bien l'importance de ce cotransporteur dans la concentration urinaire. En effet, il se caractérise par le développement d'une polyurie aqueuse sévère accompagnée de désordres électrolytiques de même qu'un décès par déshydratation survenant quelques jours après la naissance [115]. Le phénotype de souris où seulement l'une des variantes d'épissage a été ablatée sur les deux allèles est assez semblable mais beaucoup moins sévère [116, 117].

4.5.2 Soutien du rétrocontrôle tubuloglomérulaire

Le rétrocontrôle tubuloglomérulaire (RTG) permet de maintenir un taux de filtration glomérulaire relativement constant malgré les fluctuations considérables dans la PA que peut subir une personne durant une journée [63]. La *macula dansa* est la région tubulaire qui est sensible aux fluctuations du taux de filtration glomérulaire puisqu'elle semble capable de percevoir des fluctuations du taux de filtration ionique, celui du Cl⁻ plus particulièrement. Elle sera ensuite capable de relayer l'information aux cellules de l'appareil juxtaglomérulaire qui modifiera le tonus de l'artériole afférente en conséquence pour maintenir le taux de filtration glomérulaire. La proximité entre la *macula dansa* et le glomérule rend possible la communication entre ces structures (voir figure 5) [63].

Tel que mentionné, il y a un accord général à l'effet que l'un des intermédiaires permettant la détection d'un changement du taux de filtration ionique luminal est NKCC2 (probablement les variantes A et B) dans la membrane apicale de la *macula densa* [118]. Cet accord provient du fait que les diurétiques de l'anse, incluant le furosémide, le bumétanide, le pirétanide, l'acide éthacrynique, la triflocine et la L-ozolinone, inhibent complètement le RTG [118]. Aussi, il a été démontré que des changements de potentiel de membrane dans la *macula densa*, lesquels surviennent lorsque NKCC2B est activé ou inhibé, s'associent aussi à des changements de la filtration glomérulaire [119]. Finalement, la souris NKCC2B^{-/-} et NKCC2A^{-/-} ont toutes deux un RTG partiellement compromis, mais de manière plus importante quand le débit tubulaire est aux extrêmes, c'est-à-dire, quand il est faible pour NKCC2B^{-/-} [116] et quand il est élevé pour NKCC2A^{-/-} [117], témoignant des différences d'affinités pour les ions entre les deux variantes.

Par ailleurs, le mécanisme par le lequel l'entrée d'ions par NKCC2 entraîne un changement de tonus artériolaire demeure inconnu. Certaines explications peuvent être avancées. Par exemple, il est possible que l'ion lui-même soit transporté de la lumière tubulaire jusqu'à l'artériole pour en contrôler le tonus. Ainsi, plus l'ion arrive en quantité importante à la *macula densa*, plus il se retrouvera en abondance dans l'artériole afférente. Il est aussi possible que la signalisation se fasse par des changements de potentiel de membrane. À cet effet, l'inhibition de NKCC2 cause une diminution du Cl⁻ intracellulaire dans la *macula densa*, diminuant ainsi la sortie électrogénique de Cl⁻ et la charge positive [120, 121]. Finalement, plusieurs chercheurs se sont aussi intéressés au rôle d'agents vasoactifs produits dans l'appareil juxtaglomérulaire, agents dont la production pourrait dépendre de la concentration ionique locale [122].

4.5.3 Réabsorption de Na⁺, de Cl⁻ et de cations divalents.

Rappelons que NKCC2A et F permettent une réabsorption importante du Na⁺ et du Cl⁻ filtrés par le glomérule. Une fois dans la cellule, ces ions sont relégués au sang grâce à la pompe à Na⁺ [123] et un canal à Cl⁻ appelé *chloride channel kidney b isoform* (CLC-Kb) [124] qui fonctionne avec une sous-unité protéique appelée Barttin [125]. Ces voies de transport sont illustrées à la figure 7.

NKCC2A et F permettent aussi une entrée cellulaire importante de K^+ qui est toute-fois transporté de nouveau dans la lumière via le canal apical appelé *renal outer medullary K^+ channel* (ROMK). Grâce à ce recyclage du K^+ , la concentration de cet ion est maintenue à des concentrations minimales dans la lumière (4 mmol/L) pour permettre à NKCC2 de fonctionner normalement [13]. Grâce au recyclage du K^+ , la lumière tubulaire devient aussi positivement chargée, ce qui favorise la réabsorption de cations divalents comme le Ca^{2+} et le Mg^{2+} à travers des canaux intercellulaires appelés paracellines [126]. Ces voies de transport sont aussi illustrées à la figure 7.

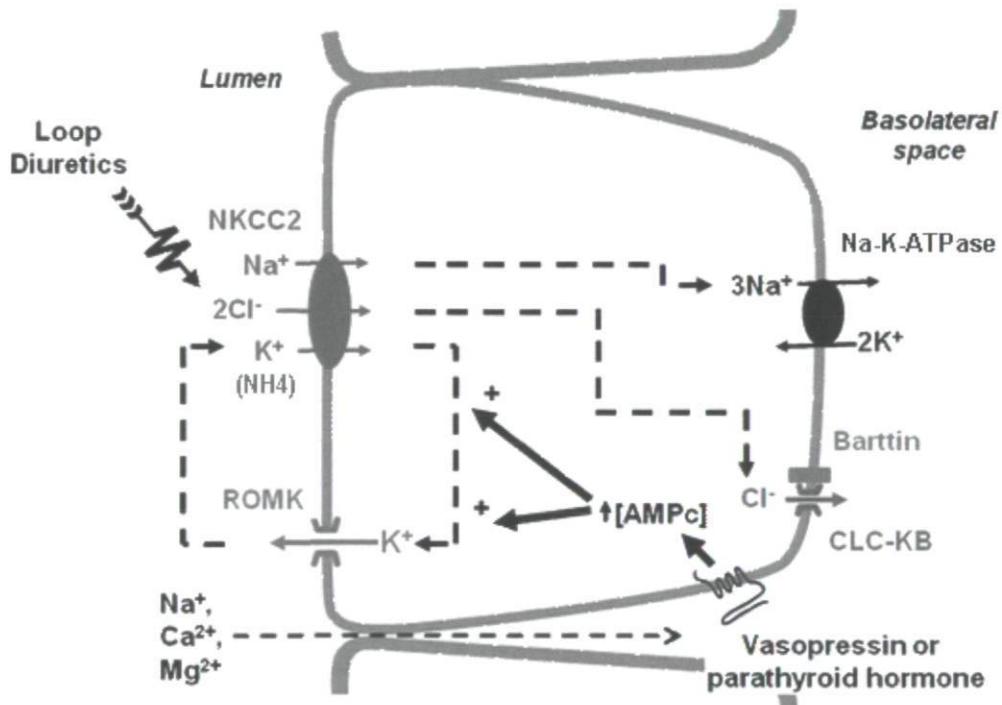


Figure 7. Physiologie moléculaire de la réabsorption du sel dans le TALH. [62]

Mentionnons ici que la coordination du transport d'ions par NKCC2, CLC-Kb et ROMK rend le TALH thermodynamiquement plus efficace car elle se solde par la consommation d'un seul ATP pour la réabsorption de deux cations au lieu d'un seul. [127] L'avantage de cette organisation fonctionnelle tient aussi du fait qu'un long segment du TALH se situe dans une zone du rein qui est moins bien perfusée et qui est sensible aux

dommages hypoxiques. Ce segment tubulaire est d'ailleurs fréquemment touché dans la nécrose tubulaire aigüe causée par une baisse du débit sanguin rénal.

4.6 Maladie reliée

4.6.1 Syndrome de Bartter

Le syndrome de Bartter a été décrit pour la première fois en 1962 par Frederick Bartter comme une néphropathie héréditaire accompagnée d'une perte de NaCl, hypokaliémie, alcalose métabolique, hyperprostaglandinémie, hypercalciurie, polyurie et hypertrophie de l'appareil juxtaglomérulaire [128], suggérant un défaut de transport dans le TALH. Aujourd'hui, on sait qu'il s'agit d'un syndrome autosomique récessif qui peut être causé par des mutations dans NKCC2, ROMK, CLC-Kb, la Barttin ou le récepteur sensible au calcium (CaSR) pour réaliser les syndromes de Bartter types I, II, III, IV ou V, respectivement [13]. Les types I à IV sont dus à des mutations de perte de fonction alors que le type V est dû à une mutation activatrice. Ils se présentent tous de la même manière sauf que le type I est plus sévère, d'emblée néonatal et généralement accompagné de néphrocalcinose [129].

4.6.2 Hypertension artérielle

NKCC2 régule la réabsorption d'une bonne partie du Na⁺ et du Cl⁻ filtré, impliquant que son niveau d'expression peut influencer la PA. À cet effet, des études ont récemment démontré que certains polymorphismes dans le gène *SLC12A1* sont associés et à une baisse de l'expression ou l'activité de NKCC2 et à une protection contre le développement d'une hypertension artérielle [130, 131]. Il reste à déterminer si des polymorphismes augmentant l'expression de NKCC2 augmenteront aussi les risques d'hypertension artérielle dans la population générale.

5. Objectif et hypothèse de recherche

Les études sur la régulation génique de NKCC2 sont peu nombreuses malgré l'importance de cette protéine dans le maintien de la PA, de la concentration/dilution urinaire et de l'équilibre acide-base. En apprendre davantage sur la régulation transcriptionnelle et posttranscriptionnelle de NKCC2 pourrait nous permettre d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques dans le traitement de l'hypertension artérielle, des états de rétention hydrosodée et des syndromes polyuriques en général. L'une des raisons qui explique ce peu d'études vient en partie de la difficulté à exprimer NKCC2 dans des cellules de mammifères [4, 40]. Les objectifs principaux de ce mémoire sont donc de mettre au point un modèle cellulaire dans lequel on pourrait étudier plus à fond cette étape particulière de la régulation du cotransporteur dans le TALH.

Une équipe de recherche a récemment développé une lignée cellulaire stable provenant du TALH médullaire et exprimant un NKCC2 endogène fonctionnel [132]. Nous nous sommes donc procurés ces cellules rénales (appelées raTAL) pour étudier la régulation transcriptionnelle et posttranscriptionnelle de NKCC2 en réponse à des stimuli qui ont généralement comme effet de modifier le cotransport. Pour ce faire, nous avons privilégié les approches suivantes : 1) Mesure de la synthèse transcriptionnelle dans les raTAL après transfection stable d'une construction où différents segments du promoteur de NKCC2 est cloné devant un gène rapporteur. 2) Étude de l'expression de l'ARNm de NKCC2 par qPCR conventionnel. 3) Mesure de la stabilité de l'ARNm aussi par qPCR. 4) Étude de l'expression de NKCC2 grâce à un anticorps spécifique. Les stimuli utilisés ont inclus : l'AMPc, certaines prostaglandines, des inhibiteurs des prostaglandines, des changements de concentration intracellulaire d'ions, des segments peptidiques appartenant à NKCC2, etc. À noter que certaines de ces expériences sont en cours et les résultats obtenus jusqu'à maintenant ne feront donc pas l'objet d'une présentation dans ce mémoire.

Jusqu'à maintenant, nous avons trouvé que des changements de concentration intracellulaire en Na^+ ou Cl^- avaient des effets sur l'activité promotrice de NKCC2 de même que sur la stabilité de l'ARNm qui code pour le transporteur, suggérant l'existence de facteurs de transcription dont l'activité est sensible à la concentration intracellulaire des ions et dont la cible inclue des régions non transcrites dans le gène de NKCC2. Nous avons aussi trouvé

que des hormones comme l'ADH et l'Ang-II, lesquels ont la capacité d'augmenter l'activité NKCC2 à la surface des cellules du TALH, exerçaient très peu d'effets sur la transcription de NKCC2. Pour nous, ces trouvailles sont perçues comme pertinentes puisqu'elles nous permettront éventuellement de mieux comprendre de quelle manière NKCC2 régule le volume extracellulaire.

CHAPITRE 2: MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. Construction des vecteurs d'expression

Les vecteurs d'expression utilisés sont listés à la table 2. Ils auront servi essentiellement à transférer des raTAL.

Deux vecteurs ont été exploités. D'abord, pGL4.28 (Promega) qui contient le gène rapporteur de la luciférase *luc2CP*, une région multiple de clonage pour l'insertion d'un élément de réponse d'intérêt devant un promoteur minimal et deux gènes de résistance, un à l'ampicilline pour permettre une sélection dans les *E. coli* et un à l'hygromycine pour permettre une sélection dans les cellules de mammifère afin de créer des lignées stables. Ensuite, pcDNA3, qui contient le promoteur du cytomégalovirus (CMV) pour permettre l'expression robuste de protéines recombinantes, un signal de polyadénylation et de terminaison pour augmenter la stabilité de l'ARNm, un site SV40 pour la répllication génique et deux gènes de résistance, un à l'ampicilline et un à la généticine (G418).

Plusieurs constructions dans le vecteur pGL4.28 ont été produites à l'aide de deux autres constructions (pGL3_{-2255 à 0} et pGL3_{-1529 à 0}) acquises du groupe d'Igarashi [58] et possédant les séquences -2255 à 0 et -1529 à 0 du promoteur de NKCC2 (0 signifiant le site d'initiation de la transcription). Pour produire pGL4_{-2255 à 0}, nous avons introduit un fragment de pGL3_{-2255 à 0} (obtenu par digestion, dans l'ordre, avec les enzymes *Mlu*I, Klenow et *Bgl*II) dans pGL4.28 aux sites *Eco*RV et *Bgl*II, et pour produire pGL4_{-1529 à 0}, nous avons introduit un fragment de pGL3_{-1529 à 0} (obtenu par digestion avec *Nhe*I et *Bgl*II) dans pGL4.28 aux mêmes sites. Pour produire pGL4_{-469 à 0} et pGL4_{-190 à 0}, nous avons amplifié les fragments requis à partir de pGL3_{-2255 à 0}, nous avons cloné les produits dans des vecteurs PCR2.1 et de ceux-ci, nous les avons réintroduits dans pGL4.28 aux sites *Kpn*I et *Xho*I (voir table 3 pour les amorces utilisées).

La dernière construction obtenue dans pGL4 l'a été en guise de contrôle. Elle a été fabriquée à partir de pGL3_{HRE} (offert par le Dr. Darren Richard) en transférant l'insert de

pGL3 vers pGL4.28 aux sites *Nhe1* et *HindIII*. À noter que le promoteur HRE est induit par la protéine HIF en réponse à l'hypoxie.

Abréviation	Protéine produite	Vecteur
pGL4 _{-190 à 0} *	Luciférase <i>Fire Fly</i>	pGL4.28
pGL4 _{-469 à 0} *	Luciférase <i>Fire Fly</i>	pGL4.28
pGL4 _{-1529 à 0} *	Luciférase <i>Fire Fly</i>	pGL4.28
pGL4 _{-2255 à 0} *	Luciférase <i>Fire Fly</i>	pGL4.28
pGL4.28 Basic	Luciférase <i>Fire Fly</i>	pGL4.28
pGL4 _{HRE}	Luciférase <i>Fire Fly</i>	pGL4.28
phRL-CMV	Luciférase <i>Runilla</i>	phRL
RbNKCC2FpcDNA3	NKCC2F de Lapin	pcDNA3
C1pcDNA3	AA 692 à 836 de NKCC2	pcDNA3
C2pcDNA3	AA 959 à 1077 de NKCC2	pcDNA3
N1pcDNA3	AA 1 à 64 de NKCC2	pcDNA3
N2pcDNA3	AA 50 à 179 de NKCC2	pcDNA3

Table 2. Liste des vecteurs d'expression.* Le chiffre indique le nombre de pb en amont du premier ATG codant pour NKCC2. AA = acides aminés.

Quatre constructions ont aussi été produites dans le vecteur pcDNA3 pour exprimer différents segments protéiques de NKCC2. Pour ce faire, nous avons utilisé des constructions de NKCC2 dans le vecteur pGilda, lesquelles étaient déjà disponibles et contenaient des séquences partielles de NKCC2 [61]. Ainsi, le fragment N1 de NKCC2 (qui code pour la région proximale du N-terminus (AA 1 à 64) a été transféré de pGilda à pcDNA3 aux sites *Not1* et *Xho1*. Trois autres fragments de NKCC2, soit C1, C2 et N2, ont, quant à eux, été transférés de pGilda à pcDNA3 aux sites *EcoR1* et *Xho1*. Finalement, nous avons aussi cloné rbNKCC2F au complet dans pcDNA3 en transférant l'insert du vecteur Poll dans

lequel il était déjà cloné (sites *KpnI* et *NheI*) au vecteur pcDNA3 (sites *KpnI* et *XbaI*) [133].

Application	Séquence 5' vers 3'
Amplification de la région -190 dans pGL3-2255	GTACTTACAGTTGGTTCCTCAGGG
	ACAGTAACCCACATTAGCGTCG
Amplification de la région -469 dans pGL3-2255	AGAGCGCTTACTTAGAATATGTG
	ACAGTAACCCACATTAGCGTCG
Amplification de NKCC2F et AF	GTCTGGGAGTCATCATCATTG
	GAACCCACCCACATACATAG
Amplification de NKCC2 total (toutes les variantes d'épissage)	GAGGAGGTGGAGCCTA
	TACATAGCGACAGCCACTGC
Amplification de NKCC2B	GTCTCGGTGTGATTATCATCG
	CCACCTCCTCTGACATATCC
Amplification de NKCC2A	GTCTTGGAGTCCTTATAATTC
	GGCTCCACCTCCTCGAAC
Amplification de NKCC2F	GGGAATTGGTCTGGGCGTC
	CCTCGCACCCTCCGTTTG
Amplification de HPRT (gène de référence)	ACCCTCAGTCCCAGCGTCGT
	GGCCACAATGTGATGGCCTCCC

Table 3. Liste des amorces utilisées.

2. Culture cellulaire

Les cellules raTAL nous ont été offertes gracieusement par l'équipe du professeur Nicholas R. Ferreri du *New York Medical College*. Elles ont été obtenues et caractérisées

tel que décrit dans le manuscrit listé en référence [132]. Pour utiliser ces cellules, celles-ci sont d'abord cultivées sur une surface de plastique traitée avec de la fibronectine pendant au moins 45 minutes et une fois à confluence, sont ensuite rincées au PBS, mises en suspension par un ajout de trypsine et transférées dans un autre Petri en présence du milieu REGM (Lonza). Dès lors, elles sont incubées à 37 °C et 5% CO₂ et leur milieu est changé à tous les deux jours jusqu'à ce qu'elles atteignent la confluence.

3. Transfection et développement des clones cellulaires

Pour la transfection des raTAL, on incube les cellules, au stade de la préconfluence (80-90%), pendant six heures en présence d'ADN, de liposomes cationiques (Invitrogen) et d'Opti-MEM I *Reduced Serum Medium* (Invitrogen), lesquels auront été mélangés préalablement pendant 20 minutes à température pièce. Après cette incubation, les cellules peuvent être utilisées en tant que lignée transitoire en les incubant de nouveau pendant 72 heures dans un milieu sans ADN. Sinon, elles peuvent être transformées en lignée stable en les incubant de nouveau pendant 24 h dans un milieu sans ADN, puis pendant plusieurs jours dans des milieux contenant 1 g/L de G418 ou 150 mg/L d'hygromycine B (selon la construction utilisée). Après une à trois semaines de sélection, des clones sont isolés et caractérisés par RT-PCR pour déterminer s'ils expriment l'ARNm d'intérêt. Les quantités d'ADN, lipofectamine 2000 d'Invitrogen et Opti-MEM I sont indiquées dans la table 4.

Récipient de culture	Vol. de milieu d'étalement (REGM)	Vol. de milieu de dilution (Opti-MEM I)*	ADN	Lipofectamine 2000
24 puits (lignée transitoire)	500 µl	2 × 50 µl	0,8 µg	2 µl
10 cm (lignée stable)	12 ml	2 × 1,5 ml	24 µg	60 µl

Table 4. Quantité des réactifs utilisés lors des transfections transitoires et stables.* L'ADN et la lipofectamine 2000 sont dilués séparément c'est pourquoi il y a 2 volumes de dilution.

4. Incubation des cellules dans différentes conditions expérimentales

Toutes les expériences sont faites avec des plaques de 24 puits où y ont été cultivées environ 75 000 cellules dans 1,5 mL de milieu de culture pendant 72 heures. Elles commencent en enlevant ce milieu de culture pour le remplacer par 1 mL de milieu ionique (l'un de ceux détaillés à la table 4) avec 1% de sérum dialysé, et avec ou sans agents connus pour leur effet sur l'activité de NKCC2, c'est-à-dire, Na⁺-diclofénac 10 µM (Sigma), indométhacine 10 µM (Sigma), Ang-II 1 µM (Sigma), prostaglandine E₂ 10 µM, ADH 1 nM (Sigma) et furosémide 250 µM (Sigma). Après 1, 3 et 6 heures d'incubation à 37 °C et à l'air ambiant, les cellules sont lysées avec différents agents selon l'expérience à effectuer; soit avec du PLB (Promega) pendant 15 min pour un essai luciférase, soit avec le kit RNeasy de Qiagen selon le protocole du fabricant pour un RT-PCR en temps réel ou soit en incubant les cellules pendant 1 heure à 4 °C dans 1 ml de (20 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA, 4 mM MgCl₂, 80 mM sucrose, 10% glycérol, 1% Triton-X et 1 mM phénylméthylsulfonyl fluoride) pour une immunoprécipitation et une immunobuvardage de type *Western*. Pour le temps 0, les cellules sont rincées avec le milieu et lysées immédiatement après. À noter que dans certaines expériences, les cellules ont aussi été prééquilibrées avec la solution N (voir table 4) pendant 3 heures après l'incubation de 72 heures. Toutes les conditions testées l'ont été en triplicata pour chacune des expériences.

Solutions*	Na ⁺	K ⁺	Cl ⁻	Ca ²⁺	Mg ²⁺	PO ₄ ⁻³	SO ₄ ⁻²	HEP	NMG	GLU	Glu	Sérum	OSM
N	154	5	144	1	1	2	2	15	0	0	4	1%	324
BCl	154	5	4	1	1	2	2	15	0	140	4	1%	324
BNa	4	5	144	1	1	2	2	15	150	0	4	1%	324

Table 5. Composition des différentes solutions utilisées (en mM). * Toutes les solutions sont ajustées à pH 7,4. Abréviations : N = solution physiologique, BCl = solution basse en Cl⁻, BNa = solution basse en Na⁺, HEP = HEPES, GLU = gluconate, Glu = glucose, OSM = osmolalité.

5. Essai luciférase

Les lysats sont obtenus selon les manipulations décrites à la section. Ils sont ensuite centrifugés à 15 000 g pendant une minute pour enlever les débris cellulaires, suite à quoi, 20 µl de surnageant est transféré dans un puits d'une plaque de 96 puits opaque. Une fois la plaque remplie, elle est insérée dans un luminomètre (*luminoskan ascent microplate luminometer* de Thermo Scientific) qui injecte automatiquement 50 µl de LAR II (Promega) dans chaque puits pour permettre la production de lumière par la luciférase et qui est mesurée ensuite pendant 10 secondes. Lors de l'utilisation de transfectants stables, les résultats ainsi obtenus sont normalisés par la quantité de protéines contenue dans chacun des puits et ce, selon la méthode de Bradford, c'est-à-dire, en mélangeant 10 µl des surnageants initiaux avec 240 µl de réactif à essai protéique (Bio-Rad) dilué 1:5 fois, en mélangeant de nouveau 50 µl de ce mélange dans 200 µl de réactif à essai protéique, en transférant le tout dans un autre puits, en mesurant l'absorbance à 550 nm avec un lecteur et en transformant les valeurs obtenues à l'aide d'une courbe standard. Tandis que pour les transfections transitoires, la normalisation est effectuée grâce à une deuxième protéine produisant de la luminescence, la luciférase du runilla avec le vecteur d'expression phRL-CMV (Promega), qui est transfectée à une concentration cent fois plus petite que le vecteur d'expression principale, c'est-à-dire à 0,08 µg. Lors de l'essai luciférase, 50 µl d'un deuxième réactif, le Stop & Glo (Promega), est injecté après le LAR II pour mesurer la quantité de cette luciférase produite dans les cellules. Les résultats sont donc normalisés avec ces données pour standardiser la quantité de protéines produites par les vecteurs d'expression transitoires pour chaque condition.

6. Extraction de l'ARNm et analyse RT-PCR en temps réel

Les lysats sont obtenus selon les manipulations décrites à la section 4. L'ARN total est ensuite extrait en utilisant les kits RNeasy et QIAshredder de Qiagen selon le protocole du fabricant, et 5 µg de cet ARN extrait est traité avec de la DNase I (Invitrogen) pendant 15 minutes à température pièce suivi de 10 minutes à 65 °C avec de l'EDTA. De cette préparation, de l'ADNc est produit avec le kit *SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR* d'Invitrogen encore une fois selon le protocole du manufacturier. L'ADNc est

ensuite amplifié en présence de *Sybr Green* (Invitrogen) et d'amorces spécifiques (voir table 3) avec le système Mx3005 (Stratagene) qui génère des courbes de dénaturation durant la synthèse d'ADN. Les paramètres du PCR en temps réel sont comme suit : 2 min à 50 °C, 2 min à 95 °C et 45 cycles de 15 sec à 95 °C, 30 sec à 60 °C et 30 sec à 72 °C. Les données sont exprimées selon la méthode du delta-deltaCt et normalisées avec celles obtenues pour l'amplification d'un gène contrôle, soit l'HPRT.

7. Immunoprécipitation et immunobuvardage de type *Western*

Pour l'immunoprécipitation et l'immunobuvardage de type *Western*, on utilise un Petri de cellule à confluence. Les lysats sont obtenus selon les manipulations décrites à la section 4. À 4 °C, on centrifuge le lysat 20 min à 3 500 g puis, on récolte le surnageant et on l'incube une heure à 4 °C avec l'anticorps L-23 (Santa Cruz) spécifique à NKCC2 à une dilution de 1/100. Ensuite, on ajoute 50 µl de billes de sépharose couplé à des protéines G (GE Healthcare) préalablement lavé avec le tampon de lyse et on incube le tout pendant une nuit toujours à 4 °C. Le lendemain, on centrifuge 1 min à vitesse maximal à 4 °C, on enlève le surnageant, on lave avec 1 ml de tampon de lyse et recommence ces étapes trois fois. Une fois lavée, on ajoute 25 µl de tampon d'échantillon à protéine (pour 40 ml total : 8 mg bleu de bromophénol, 2 ml de β-mercaptoéthanol, 10 ml de tris 0.5 M pH 6,8, 1,6 g de SDS, 4,8 g d'urée et 4 ml de glycérol) au billes et on chauffe à 100 °C pendant 10 min. Ensuite, on peut conserver les protéines à -80 °C ou utiliser directement pour l'immunobuvardage de type *Western*.

Pour celle-ci, on migre 20 µl de protéines dans le tampon d'échantillon dans un gel de polyacrylamide (acrylamide : bis-acrylamide 29 :1 (Ficher Scientific), à 7,5% dans un tampon de gel (1 M de tris base, 0,1 % de SDS à pH 8,45). Dans le haut de la cuve de migration, on ajoute un second tampon (100 mM de tris base, 100 mM tricine et 0,1 % SDS à pH 8,25) et dans le bas de la cuve un troisième tampon (200 mM tris base à pH 8.9). On fait migrer les protéines pendant une nuit à 4 °C à 60 V. Ensuite, on les transfert sur une membrane de PVDF (Immobilon de Millipore) dans un tampon de transfert (192 mM de glycine, 25 mM de tris base, 0,01 % de SDS et 20 % de méthanol). NKCC2 est détecté sur la membrane en utilisant l'anticorps L-23 à une dilution de 1/1000 dans du TBST (50 mM de tris

HCl, 150 mM de NaCl, 0.05% de tween 20) plus 5 % de lait en poudre et avec un anticorps anti-IgG de lapin à une dilution de 1/2500 dans le TBST + lait. La membrane est révélée par la suite par chimiluminescence (solutions ECL d'Amersham Bio-sciences).

8. Analyses statistiques

Les données présentées dans ce mémoire sont des moyennes \pm S.E.M. provenant d'expériences répétées entre 3 et 7 fois. Les différences entre les groupes de données ont été analysées par des tests de type *two tails Student-t tests* et l'hypothèse nulle a été rejetée pour toutes valeurs de $P < 0,05$.

CHAPITRE 3: RÉSULTATS

1. Étude d'expression de NKCC2 dans les cellules raTAL

Pour déterminer si les cellules raTAL en culture sont capables d'exprimer NKCC2, une immunoprécipitation suivie d'un immunobuvardage de type *Western* ont été réalisés avec un anticorps monoclonal contre NKCC2 disponible commercialement. Les résultats sont présentés à la figure 8A par le biais d'une illustration. Une bande peut y être observée à la marque de poids moléculaire de 160 kDa où l'on peut s'attendre à ce que NKCC2 migre. Les contrôles négatifs effectués, tels que des l'analyses d'immunobuvardage de type *Western* dans des cellules HEK-293 et des cellules T₈₄, qui n'expriment pas NKCC2 endogène, et tels que la répétition des expériences en l'absence d'anticorps primaires ou secondaires, révèlent que la bande observée dans la figure 8A est spécifique à NKCC2 (résultats non illustrés).

Des analyses RT-PCR ont également été réalisées pour déterminer lesquelles des variantes d'épissage sont exprimées dans les cellules raTAL. Comme le montre la figure 8B, ces cellules expriment à la fois les variantes A et F. En ce qui concerne la variante B, les résultats ne sont pas concluants étant donné qu'il a été difficile de concevoir des amorces spécifiques à cette variante de sorte que nous ne sommes pas sûrs que celle-ci ne soit pas exprimée dans les cellules raTAL. Nous sommes maintenant dans le processus de tester des amorces supplémentaires.

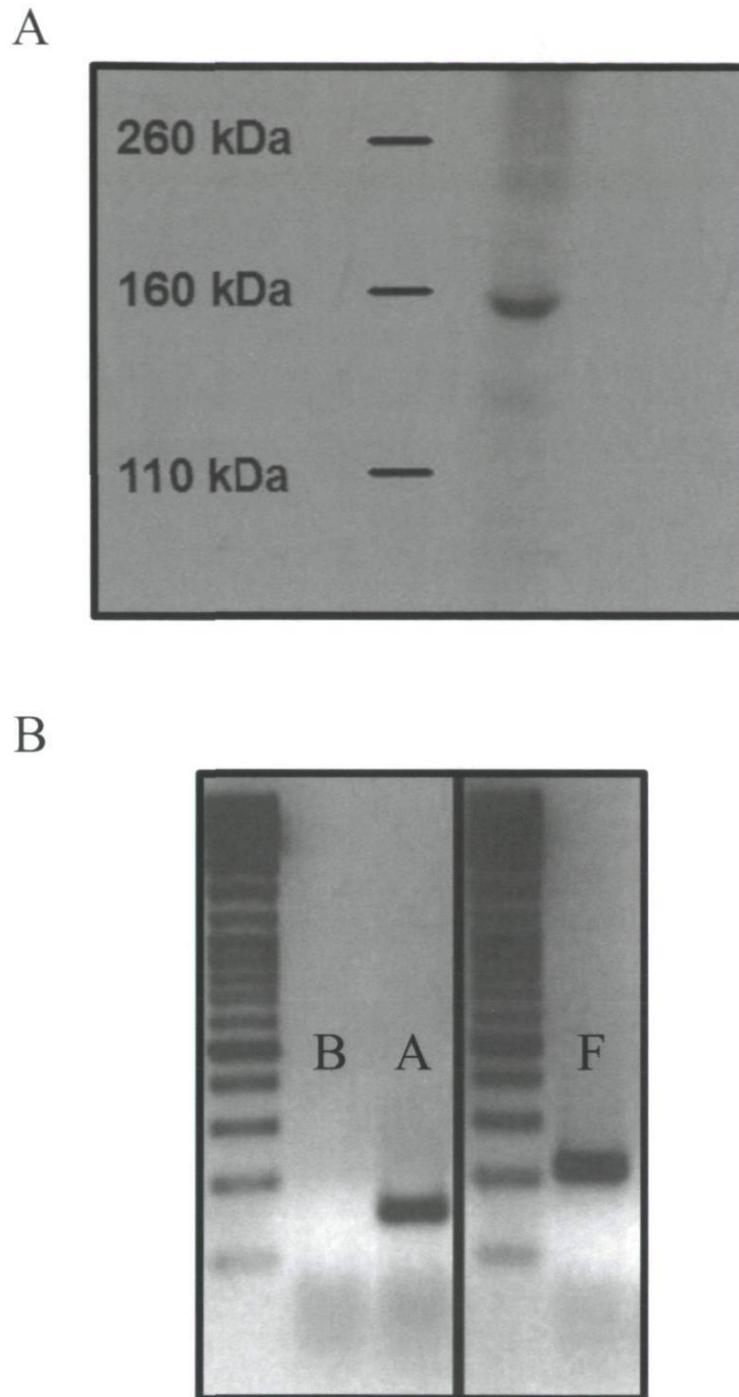


Figure 8. Études d'expression. *A*, Un immunobuvardage de type *Western* après une immunoprécipitation de NKCC2 dans les raTAL. *B*, Une étude qRT-PCR des variants d'épissage de NKCC2 dans les cellules raTAL (voir Matériels et Méthodes). Abréviations utilisées: B = NKCC2B, A = NKCC2A, F = NKCC2F.

2. L'effet de milieux en concentration basse en Cl^- ou basse en Na^+ sur la transcription de NKCC2

Comme mentionné précédemment, le but de ces expériences était de déterminer si l'activité transcriptionnelle de NKCC2 pourrait être modulée par des changements dans la concentration intracellulaires de Cl^- ou de Na^+ . Pour tester cette hypothèse, différentes régions du promoteur de NKCC2 ont été clonées en avant d'un gène rapporteur, la luciférase, dans un plasmide appelé pGL4 et ensuite les constructions résultantes ont été introduites dans les cellules raTAL pour générer des lignées cellulaires stables. Les vecteurs d'expression utilisés sont illustrés par des barres horizontales à la figure 9. Ils comprennent également une construction dans laquelle la région promotrice HRE a été clonée dans pGL4 pour contrôler les variations de l'activité transcriptionnelle des cellules au fil du temps. En fait, il est prévu que l'activité transcriptionnelle de la plupart des régions promotrices va diminuer progressivement au fil du temps dans les milieux appauvris en sérum que nous avons utilisé.

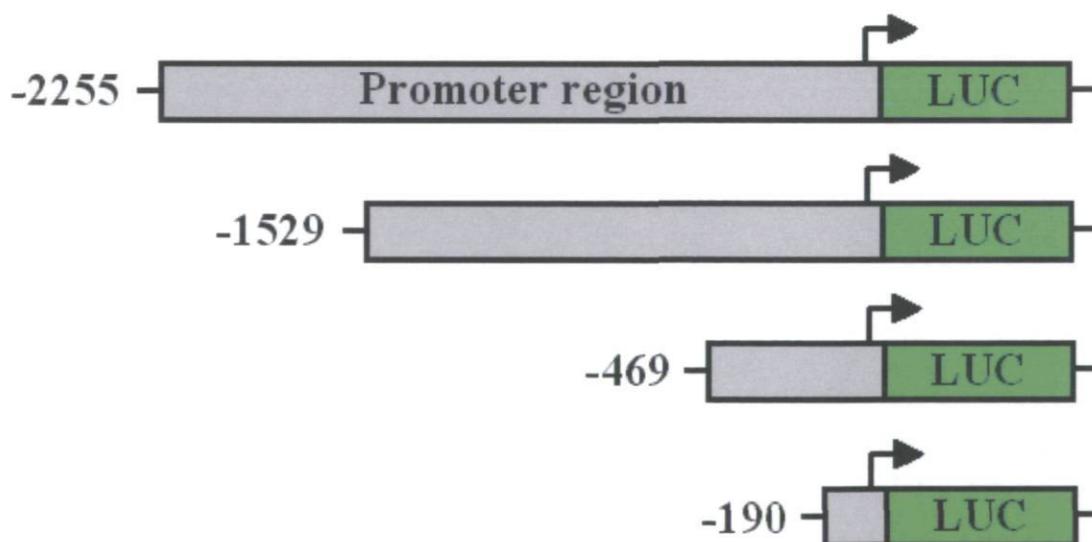


Figure 9. Vecteurs d'expression utilisés dans ce travail. Ils sont illustrés par des barres horizontales en utilisant la couleur grise pour désigner les différents segments du promoteur de NKCC2 et la couleur verte pour désigner le gène de la luciférase.

Une fois que les lignées cellulaires stables sont devenues disponibles, elles ont été incubées dans des milieux à concentration normal en ions (N), à concentration faible en Cl^- (LCl) et à concentration faible en Na^+ (LNa) pendant plusieurs heures et traitées par la suite, comme décrit dans la section matériels et méthodes, pour effectuer des essais luciférase. Dans ces essais, l'intensité de luminescence est directement proportionnelle à la concentration de la luciférase et, en tant que telle, de l'activité de la région du promoteur de NKCC2 testée. Pour contrôler les différences dans le nombre de cellules entre les conditions, les données obtenues ont été normalisées dans tous les cas par la teneur en protéines.

Les résultats sont illustrés dans les figures 10 à 12. Dans chacune de celles-ci, l'activité du promoteur dans les milieux N, LCl ou LNa est montré à 0, 1, 3 et 6 heures. Toutes les données présentées ne sont pas seulement normalisées à la teneur en protéines comme indiqué précédemment, mais elles sont également normalisées aux données obtenues au temps 0. En dernier lieu, pour les vecteurs d'expression NKCC2/pGL4 les données obtenues à 1, 3 et 6 heures sont soustraites en outre par celles obtenues pour les même temps par les vecteurs HRE/pGL4.

Comme on peut le voir à la figure 10, l'activité du promoteur HRE ne se contente pas de diminuer au fil du temps, elle est également sensible aux variations en concentration intracellulaire de Cl^- et de Na^+ . De plus, elle tend à diminuer plus rapidement à des concentrations d'ions inférieurs. Alors que la signification de ces observations est inconnue pour le moment, on peut supposer que si un autre promoteur se comporte de manière identique par rapport au promoteur HRE, son activité ne sera pas affectée par les changements de concentration intracellulaire d'ions une fois que l'activité promotrice de HRE est soustraite. On peut supposer, d'autre part, que si l'activité du promoteur de NKCC2 diffère à certains points dans le temps par exemple entre les conditions N et LCl, des éléments sensibles aux ions affectent l'activité transcriptionnelle soit du promoteur HRE ou, plus probablement, du promoteur de NKCC2.

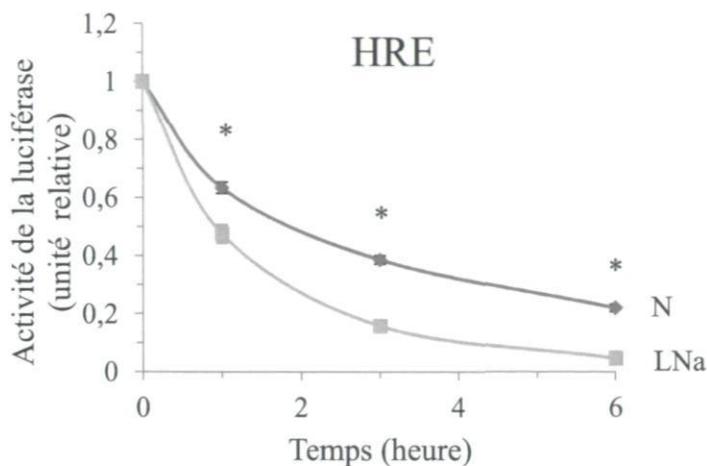


Figure 10. Activité promotrice totale de HRE dans divers milieux au fil du temps. Toutes les données indiquées ont été normalisées à ceux obtenus au temps 0. Abréviations utilisées: N = milieu physiologique, LCl = milieu en concentration faible en Cl⁻ LNa = milieu en concentration faible en Na⁺. *P < 0,05

Dans la figure 11, il est intéressant de noter que l'activité de la région -2255 du promoteur de NKCC2 est plus élevée dans le milieu LCl avant 2 heures d'incubation, mais qu'elle est plus élevée dans le milieu N entre 2 et 6 heures d'incubation (graphique A). Toutefois, les différences observées entre 0 et 3 heures disparaissent lorsque la région du promoteur de NKCC2 entre -2255 et -1529 pb est retirée (graphique B) et elles disparaissent également quand la région du promoteur de NKCC2 entre -2255 et -469 pb est retirée (graphique C). Ces données suggèrent que des éléments sensibles au Cl⁻ agissent sur le promoteur de NKCC2 directement et ce, dans une région en amont des pb -1529. Un vecteur d'expression dans lequel les pb de -1529 à -469 du promoteur de NKCC2 ont été enlevés est en cours de teste.

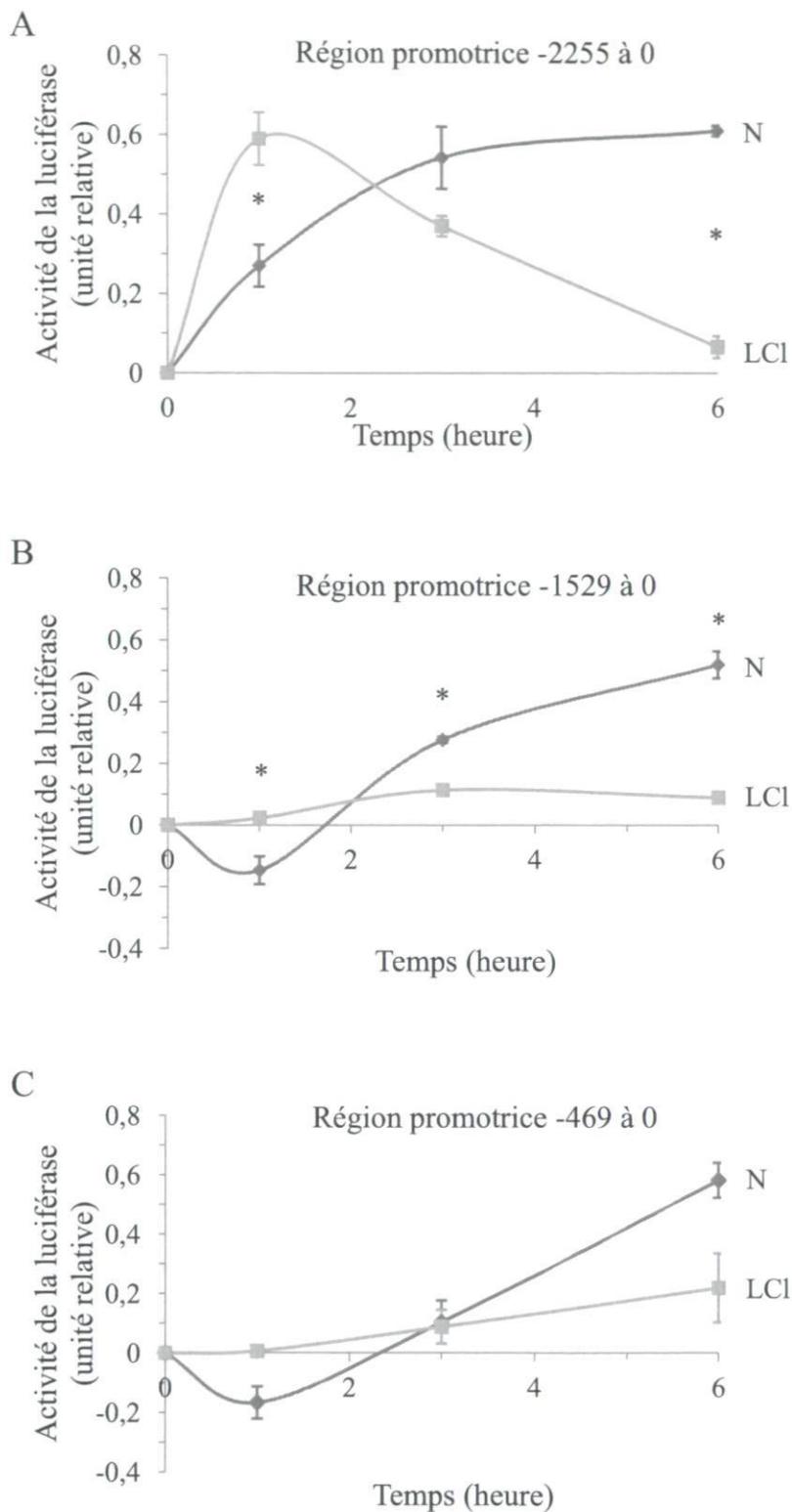


Figure 11. Activité promotrice de NKCC2 dans un milieu faible en Cl^- au fil du temps. Toutes les données indiquées ont été normalisées à celles obtenues au temps 0, après quoi, l'activité du promoteur HRE a été soustraite de l'activité promotrice

totale de NKCC2. *A*, La région promotrice de NKCC2 testée était de -2255 à 0 pb. *B*, La région promotrice de NKCC2 testée était de -1529 à 0 pb. *C*, La région promotrice de NKCC2 testée était de -469 à 0 pb. D'autres régions promotrices de NKCC2 ont été testées mais les résultats ne sont pas affichés ici. Les abréviations sont les mêmes que celles indiquées dans la légende de la figure 10.

*P < 0,05

La figure 12 montre que les différentes régions promotrices de NKCC2 testées se comportent dans le LNa comme ils le font dans le LCl, à l'exception que, pour la région -2255 du promoteur de NKCC2, les différences dans l'activité de la luciférase sont moins importantes à 1 et 6 heures entre les conditions N et LNa. Ces données suggèrent que des éléments sensibles au Na⁺ agissent également sur le promoteur de NKCC2 directement et ce, dans une région en amont des pb -1529. Cependant, ils restent à savoir si ces éléments sensibles au Na⁺ sont les mêmes que les éléments sensibles au Cl⁻ et s'ils agissent sur la même région d'ADN.

Dans le but de mesurer l'activité transcriptionnelle de NKCC2 dans différents milieux sans que la perturbation que subissent les cellules lors de leur changement d'un milieu riche (milieu REGM) à un milieu pauvre (milieu N, LCl ou LNa) aient un effet sur cette activité, les cellules ont été soumises à 3 heures de préincubation dans le milieu N avant leur incubation dans la condition à testée. Les résultats d'une telle expérience sont illustrés dans la figure 13 pour la région promotrice -2255 à 0 pb de NKCC2. On voit que par cette approche l'activité du promoteur de NKCC2 est presque stable au bout de 4 heures dans le milieu N mais diminue dans le LNa et le LCl. Par conséquent, ceci indique que les résultats illustrés dans les figures 11 et 12 ne sont pas affectés par cette perturbation et que la méthode utilisée était correcte.

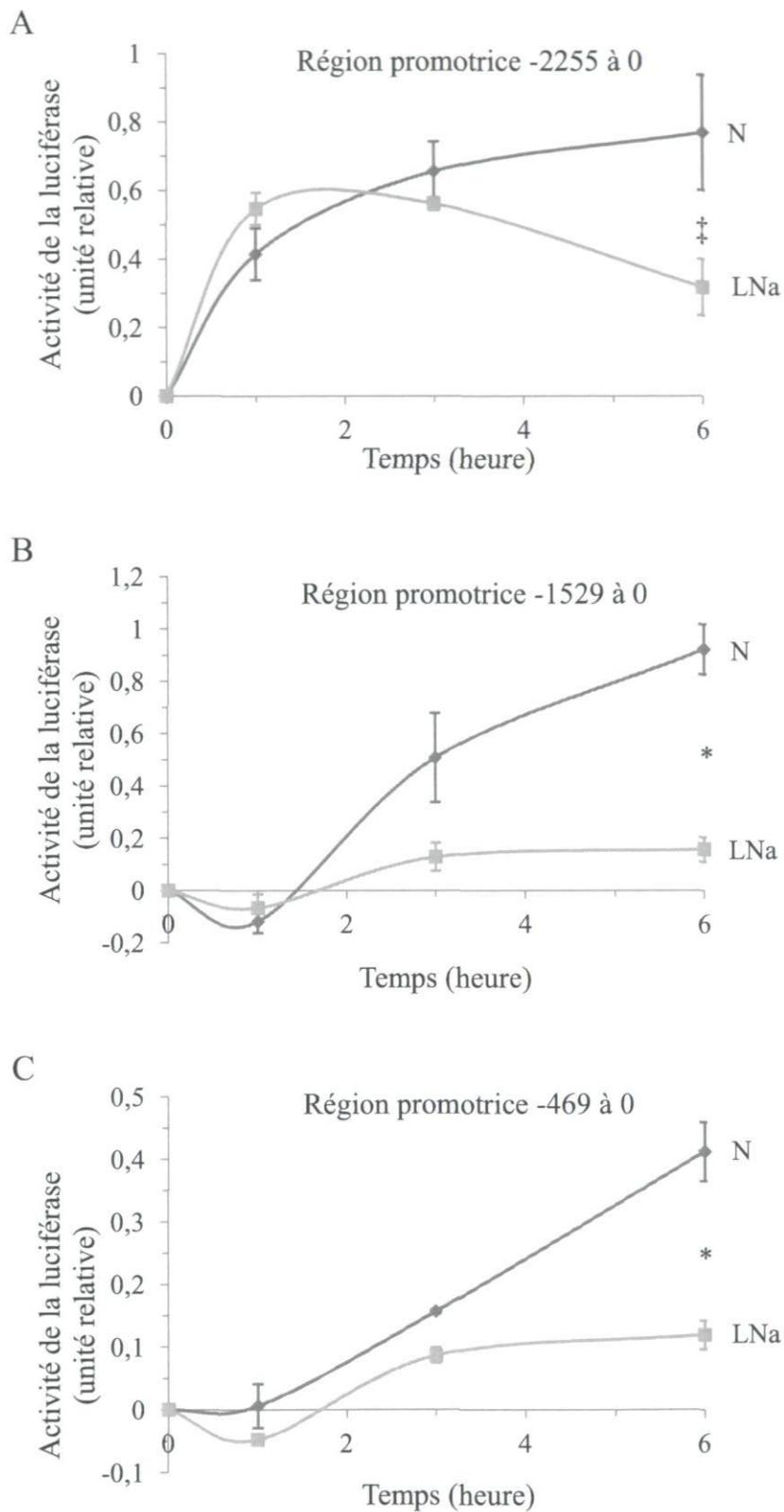


Figure 12. Activité promotrice de NKCC2 dans un milieu faible en Na^+ au fil du temps. Toutes les données indiquées ont été normalisées à celles obtenues au temps 0, après quoi, l'activité du promoteur HRE a été soustraite de l'activité promotrice

totale de NKCC2. *A*, La région promotrice de NKCC2 testée était de -2255 à 0 pb. *B*, La région promotrice de NKCC2 testée était de -1529 à 0 pb. *C*, La région promotrice de NKCC2 testée était de -469 à 0 pb. D'autres régions promotrices de NKCC2 ont été testées mais les résultats ne sont pas affichés ici. Les abréviations sont les même que celles indiquées dans la légende de la figure 10. *P < 0,05 ‡P = 0,074

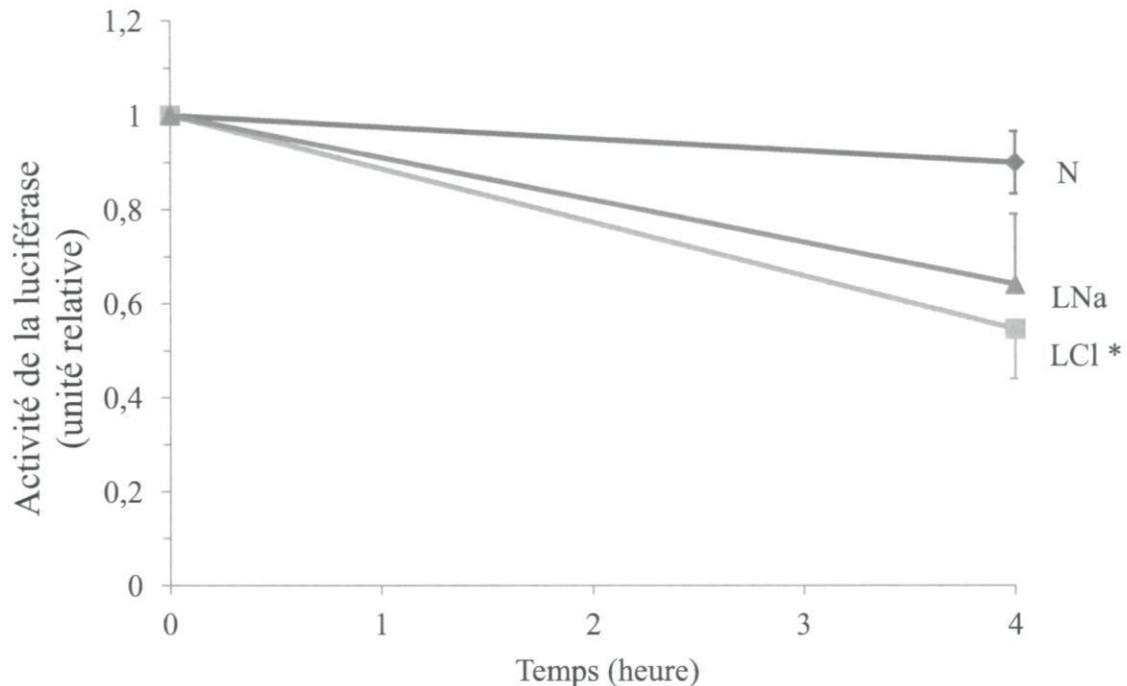


Figure 13. Activité promotrice totale de NKCC2 dans divers milieux au temps 0 et 4 h. Les cellules ont été soumises à 3 heures de préincubation dans le milieu N pour mesurer l'activité transcriptionnelle de NKCC2 sans la perturbation d'un changement de milieu riche à un milieu pauvre. Toutes les données indiquées ont été normalisées à celles obtenues au temps 0 h. La région promotrice de NKCC2 testée était de -2255 à 0 pb. Les abréviations sont les même que celles indiquées dans la légende de la figure 10. *P < 0,05

3. Effet de différentes molécules sur l'activité du promoteur de NKCC2

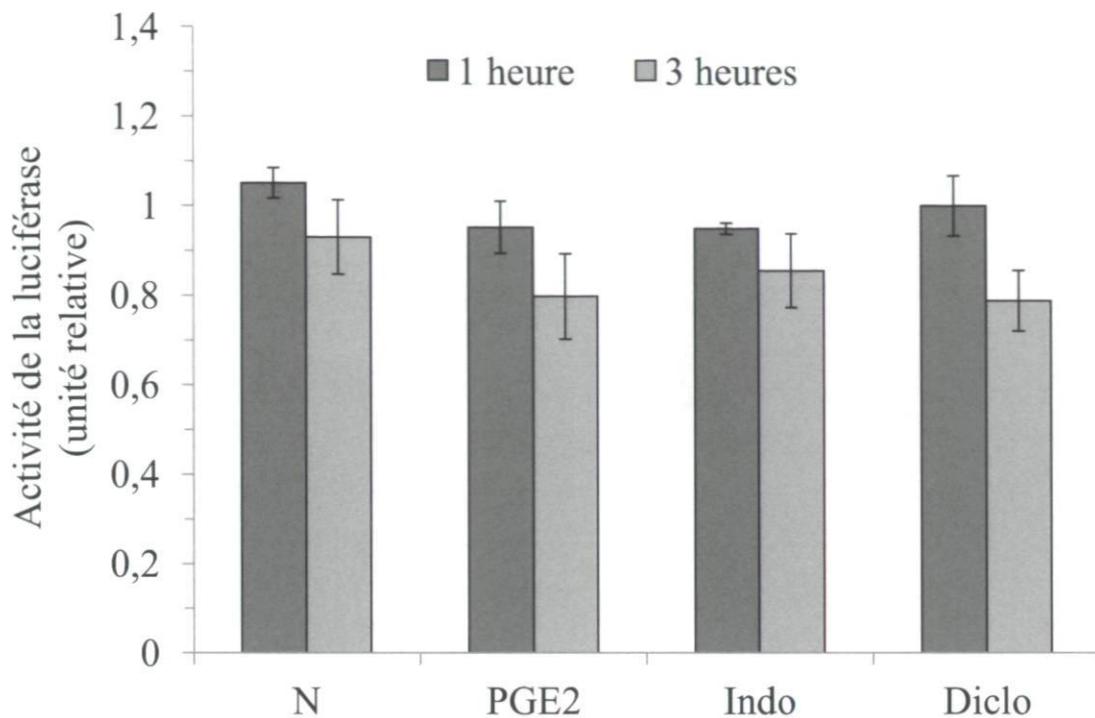
Au cours de nos expériences, les cellules transfectées raTAL ont été soumises à diverses molécules qui sont connues pour affecter l'activité de NKCC2 soit par des change-

ments dans l'expression des protéines à la surface cellulaire, par des changements dans la fonction des protéines intrinsèques ou par des mécanismes inconnus. Notre hypothèse était que certaines de ces molécules pourraient agir en modifiant l'activité du promoteur de NKCC2 principalement ou en modifiant d'autres étapes post-transcriptionnelles ou post-traductionnelles de la protéine.

Pour ce faire, les cellules raTAL transfectées avec le vecteur d'expression pGL4-2255 à 0 ont été incubées dans le milieu N pendant 1 et 3 heures en présence ou en absence d'agents spécifiques qui exercent des effets dépendant de la prostaglandine (le PGE2, l'indométacine qui inhibe non spécifiquement la COX, et le diclofénac qui inhibe spécifiquement la COX-2), qui modifient diverses voies de signalisation de façon indépendante des prostaglandines (l'Ang-II et l'ADH) ou qui inhibent la fonction de NKCC2 directement (le furosémide). Comme précédemment expliqué à la section 4.4, il est connu que la PGE2 peut réduire l'activité de NKCC2 dans le TALH à travers des mécanismes inconnus, tandis que l'Ang-II et l'ADH ont été trouvés à augmenter l'expression de NKCC2 à la surface cellulaire [78, 83, 84].

Les résultats sont présentés dans la figure 14. On y voit que les changements dans l'abondance de la prostaglandine dans le milieu extracellulaire (PGE2) ou intracellulaire (indométacine et diclofénac) de la cellule ne conduisent pas à des changements substantiels dans l'activité du promoteur de NKCC2 (graphique A). On remarque la même chose en ce qui concerne l'effet de l'Ang-II, l'ADH et le furosémide sur l'activité du promoteur de NKCC2, même après 3 heures d'incubation (graphique B). Même si, plusieurs de ces résultats ne sont pas nécessairement surprenants, on aurait pu s'attendre à ce que le furosémide, un agent qui devrait théoriquement diminuer la concentration intracellulaire des ions en inhibant les fonctions de NKCC2, exerce au moins un certain effet. Cependant, le niveau de réduction de la concentration des ions intracellulaires atteint par l'inhibition de NKCC2 par le furosémide n'a peut-être pas été aussi prononcé que celui obtenu par l'abaissement de la concentration de Na^+ ou Cl^- directement dans le milieu extracellulaire.

A



B

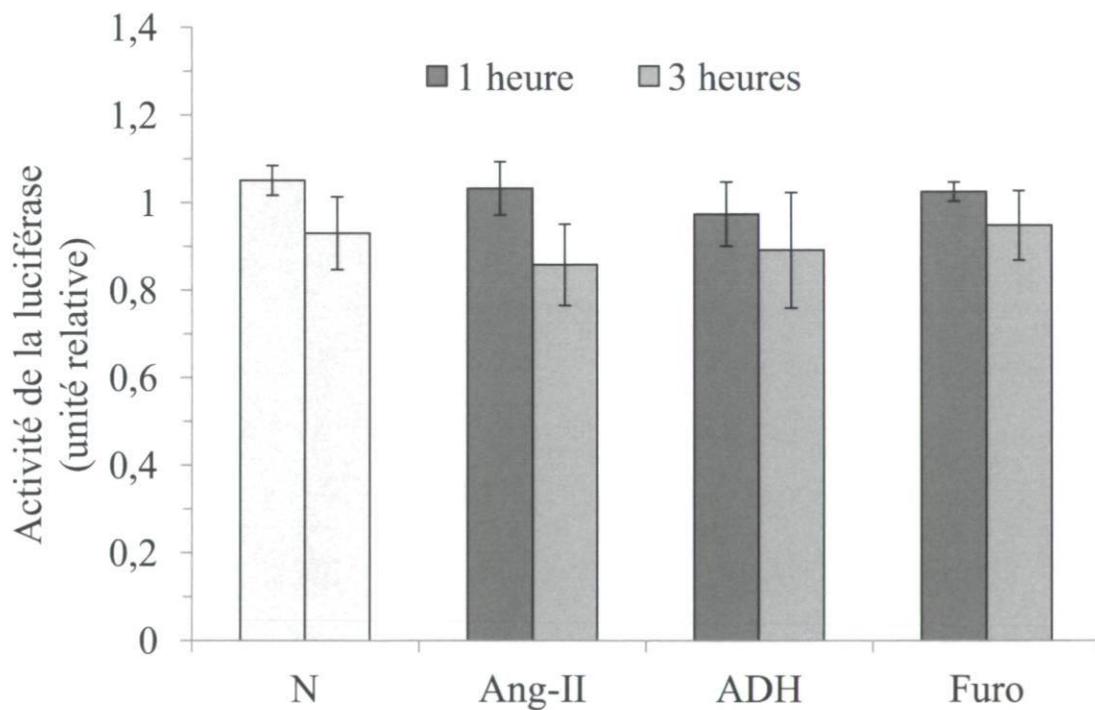


Figure 14. Activité promotrice totale de NKCC2 en présence ou en absence de différentes molécules pendant 1 et 3 h. Les cellules ont été soumises à 3 heures de préincubations dans le milieu N avant de prendre les mesures. Toutes les données indiquées ont été normalisées à celles obtenues au temps 0. La région promotrice de

NKCC2 testée était de -2255 à 0 pb. *A*, Ces agents ont été utilisés pour modifier la sécrétion de prostaglandine. *B*, Ces agents ont été utilisés pour modifier l'abondance et/ou l'activité de NKCC2. Abréviations utilisées: N = milieu physiologique, Diclo = diclofénac, Indo =, indométacine, Ang-II = angiotensine 2, Furo = furosémide, ADH = hormone antidiurétique, PGE2 = prostaglandine E₂.

4. NKCC2, lui-même un facteur de transcription?

Dans des études antérieures, nous avons constaté que lorsque l'on injecte de l'ARNm codant pour NKCC2 dans des ovocytes de *Xenopus laevis* avec de l'ARNm codant pour une petite section de la région *N*-terminal de NKCC2, l'activité de transport du cotransporteur a tendance à être plus basse que lorsque NKCC2 est exprimé seul. À cet égard, il est intéressant de noter qu'il y a des exemples de gènes qui peuvent interagir avec des fragments peptidiques dérivées de leur protéine qu'ils codent. Dans le cas du gène de l'APP (*amyloid precursor protein*), par exemple, un fragment du côté *C*-terminal de la protéine synthétisée peut agir comme un facteur de transcription après avoir été clivé du produit de traduction initiale [134].

Malheureusement, il est assez difficile d'obtenir des mesures de transport pour les CCCs dans des lignées cellulaires de mammifères, étant donné que la plupart des types cellulaires ont tendance à exprimer plus d'un isoforme de CCCs, que ces différents isoformes transportent le même groupe d'ions, et qu'il n'y a pas d'inhibiteurs disponibles spécifiques aux CCCs. NKCC2, en outre, n'est pas fonctionnel dans la plupart des environnements cellulaires, sauf dans les ovocytes et dans les cellules du TALH. Par conséquent, il ne semble pas que l'effet d'exprimer l'extrémité *N*-terminale de NKCC2 sur le cotransport cations-Cl⁻ serait facile à interpréter dans des lignées cellulaires de mammifères, même si cet effet aurait tendance à être similaire à celui observé dans les ovocytes.

Pour nous, les limites décrites ci-dessus ne semblent pas s'appliquer pour des études dans lesquelles il s'agissait de mesurer l'activité transcriptionnelle de NKCC2 dans une lignée cellulaire de mammifère, plus particulièrement dans les cellules raTAL où le transporteur est naturellement exprimés. Ainsi, des expériences ont été conçues pour déterminer si

l'activité de NKCC2 dans les ovocytes avait été modifiée par des changements dans l'activité transcriptionnelle de NKCC2 par l'expression d'un segment *N*-terminal de NKCC2 lui-même. Pour ce faire, les cellules raTAL transfectées de façon stable avec différentes régions du promoteur de NKCC2 ont également été transfectées de façon transitoire avec différents vecteurs d'expression de segments peptidiques dérivés de NKCC2.

Les résultats de ces expériences sont présentés dans la figure 15. On peut y voir que l'activité transcriptionnelle de différentes régions promotrices de NKCC2 est peu affectée par la co-expression de NKCC2 entier, de la moitié proximale et distale de l'extrémité *N*-terminale de NKCC2 (N1 et N2, respectivement) ainsi que la moitié proximale et distale de l'extrémité *C*-terminale de NKCC2 (C1 et C2 respectivement). Il convient de noter, cependant, que les données obtenues à ce jour pour les régions promotrices qui se trouvent au-delà des pb -1529 présente une variabilité considérable et que des expériences supplémentaires sont donc nécessaires avant de pouvoir tirer des conclusions quant à la capacité des différents segments de NKCC2 d'agir comme facteurs de transcription.

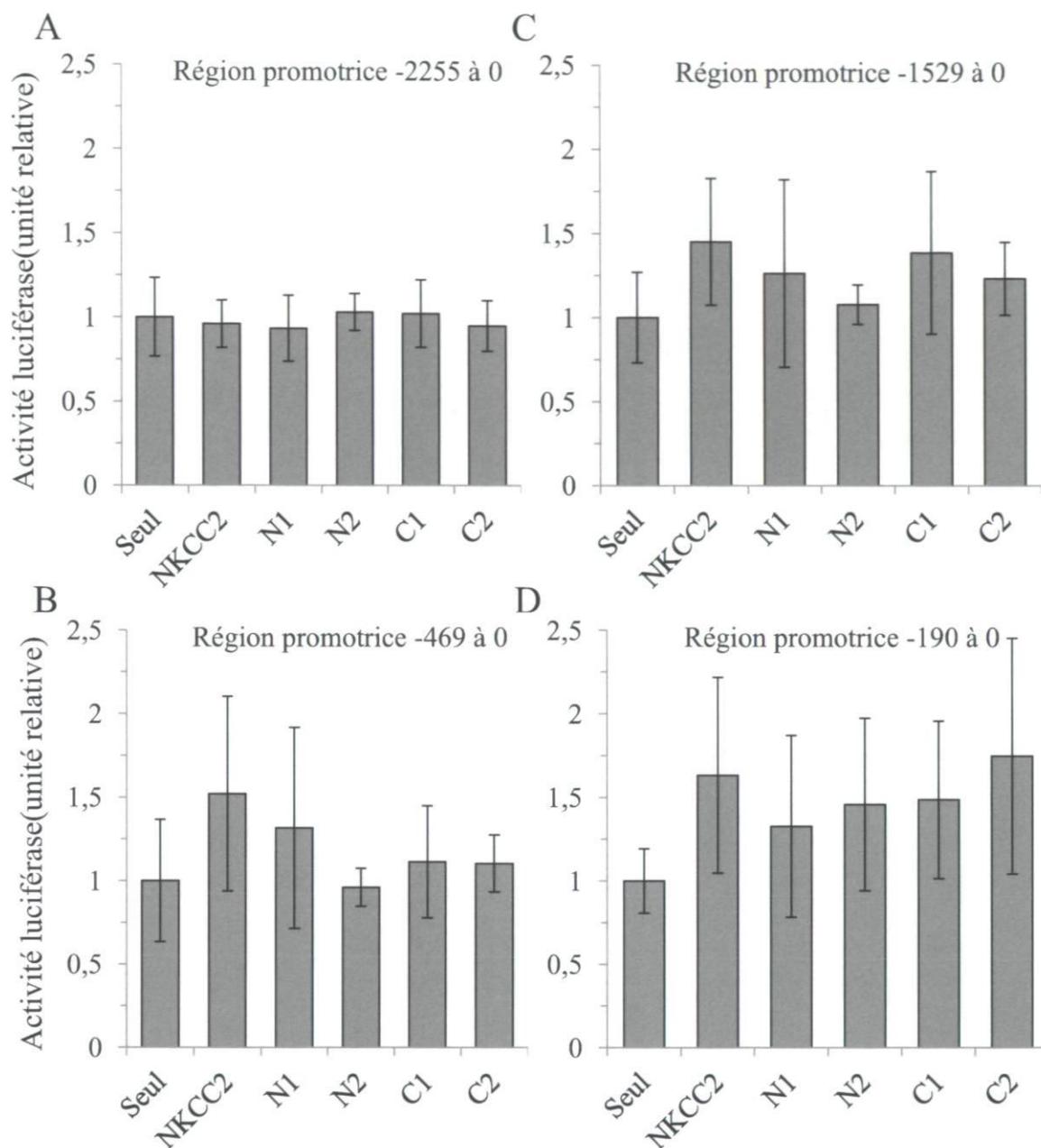


Figure 15. Activité promotrice totale de NKCC2 dans les raTAL transfectées avec des segments peptidiques dérivés de NKCC2. Les régions promotrices de NKCC2 testées étaient de -2255 à 0 pb, de -1529 à 0 pb, de -469 à 0 pb et de -190 à 0 pb. Toutes les données indiquées ont été normalisées avec celles obtenues avec les cellules contrôles qui étaient transfectées avec un vecteur d'expression vide. Abréviations utilisées: Seul = vecteur pcDNA3 vide (contrôle), NKCC2 = NKCC2F de lapin, N1 = aa 1 à 64 de NKCC2, N2 = aa 50 à 179 de NKCC2, C1 = aa 692 à 836 de NKCC2, C2 = aa 959 à 1077 de NKCC2.

CHAPITRE 4: DISCUSSION ET CONCLUSION

L'objectif principal de cette maîtrise était d'étudier la régulation transcriptionnelle et posttranscriptionnelle de NKCC2 en déterminant plus particulièrement si des changements de concentration intracellulaire en Na^+ ou Cl^- s'associaient à des changements de l'expression de l'ARNm codant pour le cotransporteur. Pour ce faire, nous avons utilisé comme modèle principal une lignée de cellules immortalisées provenant de l'anse ascendante large de Henle de rat et transfectées avec des constructions qui incluent différentes régions du promoteur de *SLC12A1* et le gène rapporteur *fire fly* luciférase. Pour le moment, nos travaux ont permis de montrer que l'incubation de ces cellules avec des solutions basses Na^+ ou Cl^- augmentait la transcription de NKCC2 à court terme et la diminuait par la suite.

Avant d'entamer nos expériences, nous nous sommes assurés que le modèle cellulaire choisi exprimait NKCC2 de façon endogène et ce, même après plusieurs passages sur une surface de culture à base de fibronectine (plutôt que de matrigel qui était celle employée au départ mais dont l'utilisation s'est avérée très peu conviviale et très coûteuse). En démontrant la présence du cotransporteur dans les cellules raTAL, il nous a donc été possible de conclure que tous les substrats protéiques nécessaires à la transcription et à la translation de NKCC2 y étaient présents, ce qui nous permettait d'envisager une série d'expériences pour étudier la régulation transcriptionnelle et posttranscriptionnelle du gène.

Il est bien établi qu'une diminution de la concentration intracellulaire de Cl^- se solde par une augmentation de l'activité de NKCC2 et qu'elle génère cet effet, du moins en partie, en augmentant la phosphorylation du transporteur [108, 135]. Toutefois, des études antérieures menées dans notre laboratoire ont aussi montré que dans le TALH, l'expression de l'ARNm codant pour NKCC2 augmentait chez des souris dont le régime avait été suppléé avec du furosémide, un agent qui diminue la concentration intracellulaire de Cl^- dans des cellules exprimant NKCC1 ou NKCC2 [61]. Nous avons donc voulu déterminer si la concentration intracellulaire de Cl^- se soldait aussi par une augmentation de l'activité transcriptionnelle du cotransporteur.

Il est à noter, par ailleurs, que la régulation transcriptionnelle de protéines par leurs propres substrats est un mécanisme homéostatique bien connu qui permet à la cellule de bien doser le nombre de protéines à fabriquer pour assurer le maintien de la concentration de ces substrats dans les différents compartiments cellulaires. Chez la levure, par exemple, le gène *GAL1*, qui produit des protéines permettant au galactose d'être métabolisé, est activé par la protéine Gal4 en présence de galactose puisque dans de telles circonstances, Gal4 peut se lier au gène en se dissociant d'une autre protéine appelée Gal80. En l'absence de galactose, à l'inverse, le site de liaison qui permet à Gal4 de se lier à *GAL1* est bloqué par la formation du complexe Gal4-Gal80 [136]. Un tel système de régulation pourrait donc sans doute exister pour NKCC2.

Tel que mentionné, nos résultats tendent à montrer que des changements de la concentration intracellulaire de Na^+ et Cl^- affectent l'activité transcriptionnelle de NKCC2. De plus, nous avons identifié une région du promoteur, située entre les paires de base -2255 et -1529, qui serait responsable des effets à court terme. Ces données suggèrent qu'il y a dans les raTAL des facteurs sensibles à la concentration intracellulaire de Na^+ et Cl^- capables directement ou grâce à une voie de signalisation d'affecter le promoteur de NKCC2. Ces facteurs sont sans doute localisés dans le cytoplasme de la cellule puisque les incubations n'ont probablement pas ou ont peu d'effets sur la concentration intranucléaire de Na^+ et de Cl^- . Parmi les facteurs candidats, mentionnons WNK3 dont l'activité augmente suite à une baisse de la concentration intracellulaire de Cl^- et dont l'un des effets est de diriger NKCC2 à la membrane après phosphorylation du cotransporteur via l'intermédiaire SPAK/ORS1 [108]. WNK3 pourrait donc phosphoryler d'autres effecteurs pour leur permettre d'intégrer le noyau et agir sur le promoteur de NKCC2.

Si une diminution de la concentration intracellulaire de Cl^- se solde par une augmentation du cotransport $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$ causée par une augmentation du nombre de NKCC2 à la surface cellulaire, pourquoi s'associe-t-elle à une légère augmentation de l'activité promotrice initialement et ensuite, à une diminution de celle-ci? Sans que l'on puisse répondre à cette question à l'heure actuelle, il est possible que l'effet d'une baisse du Cl^- à plus long terme soit réalisé par l'intermédiaire d'autres facteurs qui permettraient d'autolimiter le cotransport par une diminution de l'activité promotrice du gène. Un certain nombre d'expé-

riences sont actuellement en cours afin de déterminer si la stabilité de l'ARNm de NKCC2 pourrait avoir un rôle à jouer dans la régulation du cotransporteur face à des changements dans la concentration intracellulaire d'ions ou face à divers autres stimuli affectant NKCC2. Des études préliminaires de qPCR suggèrent que la quantité d'ARNm produite suite à une diminution de la concentration intracellulaire de Na^+ ou de Cl^- augmenterait légèrement ou, du moins, ne s'abaisserait pas avec le temps au même titre que l'activité promotrice de NKCC2. Il devrait être possible de tirer des conclusions plus définitives à travers des expériences similaires de qPCR où les cellules sont traitées avec des agents tels que le 5,6-dichloro-1- β -D-ribo-furanosylbenzimidazole qui inhibent non spécifiquement la transcription en cours. Ainsi, des facteurs additionnels qui affectent la stabilité de l'ARNm pourraient aussi être en jeu. Tel que mentionnés, on sait déjà que certains de ces facteurs, comme la ζ -cristalline, sont capables de prévenir la dégradation de l'ARNm de NKCC2 en milieu alcalin [87].

Tel que mentionné précédemment, plusieurs travaux ont montré qu'une multitude de facteurs pouvaient influencer la quantité de NKCC2 à la surface cellulaire et, ainsi, que ces facteurs pouvaient agir ainsi en modifiant l'activité transcriptionnelle de NKCC2. Chez le rat, par exemple, l'administration d'ADH, d'Ang-II ou d'inhibiteurs de la COX tels l'indométhacine et le diclofénac augmente l'expression de NKCC2 à long terme [61, 78-80, 137], alors que l'administration de prostaglandine E_2 produit l'effet inverse [83]. Mentionnons aussi que l'administration de furosémide chez des souris change l'expression des variantes de NKCC2 de manière différentielle, c'est-à-dire, cet agent augmente l'expression de NKCC2A mais diminue celle NKCC2F et AF [61].

Dans ce travail, il n'a pas été possible de démontrer que les facteurs ayant un effet sur l'expression de NKCC2 agissaient en modifiant l'activité transcriptionnelle du gène. Au moins deux raisons pourraient expliquer pourquoi il en a été ainsi. D'une part, l'effet de ces facteurs pourrait se faire sentir *via* des étapes posttranscriptionnelles ou même posttranslationnelles. Dans les études citées ci-dessus, en effet, la mesure quantitative de l'expression de NKCC2 a été obtenue à l'aide d'anticorps dans presque tous les cas sauf dans l'étude de Maruno *et al.* [80] où c'est l'ARNm de NKCC2 qui a servi de mesure d'expression et ce, par analyse de type *Northern*. D'autre part, l'effet des facteurs pourrait avoir été surévalué

dans les études dont il a été question puisque les analyses d'expression protéique ou d'expression génique par analyse de type *Northern* sont souvent semi-quantitatives au mieux. Finalement, il est important d'exercer une certaine prudence quand on compare des résultats provenant de modèles différents.

Dans ce travail, il n'a pas été possible non plus de démontrer que certains fragments provenant de NKCC2 lui-même pouvait agir en tant que facteur de transcription sur le promoteur du gène codant. Tel que mentionné dans la section *résultat*, toutefois, les écarts-types obtenus pour certaines des données étaient sans doute trop dispersés pour conclure de manière définitive sur l'absence d'effets. De plus, il est possible que les segments testés n'aient pas été tout à fait les bons, en ce sens qu'un domaine important aurait pu être coupé en deux parce qu'il était localisé à la jonction N1-N2, C1-C2, etc. Des expériences additionnelles seront donc nécessaires et nous semblent justifiées sur la fois des études fonctionnelles menées dans les oocytes de *Xenopus laevis* ou de certains précédents où ce type d'autorégulation a été décrit.

Pour conclure, nous avons montré pour la première fois que l'incubation de cellules exprimant NKCC2 de façon endogène avec des solutions basses Na^+ ou Cl^- augmentait à court terme la transcription de NKCC2 et permettait sans doute une stabilisation de l'ARN messager, mais qu'elle produisait à plus long terme une diminution de la transcription. Nous avons également montré que les effets du diclofénac, de l'indométhacine, de l'Ang-II et l'ADH sur l'expression de NKCC2 n'étaient pas causés par une augmentation de la synthèse du cotransporteur. Ces résultats suggèrent l'existence de facteurs de transcription sensibles à la concentration intracellulaire des ions qui ont pour cibles des éléments de réponses dans la région promotrice de NKCC2 ou dans les régions non transcrites du gène. Une connaissance approfondie des mécanismes de régulation de NKCC2 pourrait avoir un impact clinique important à plus long terme puisque ce transporteur est impliqué dans le contrôle du volume extracellulaire et dans le développement de l'hypertension artérielle.

BIBLIOGRAPHIE

1. Singer, S.J. and G.L. Nicolson, *The fluid mosaic model of the structure of cell membranes*. Science, 1972. **175**(23): p. 720-31.
2. Lodish H., et al., *Molecular cell biology*. 6 ed2008: W.H. Freeman and Compagny.
3. Xu, J.C., et al., *Molecular cloning and functional expression of the bumetanide-sensitive Na-K-Cl cotransporter*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(6): p. 2201-5.
4. Payne, J.A. and B. Forbush, 3rd, *Alternatively spliced isoforms of the putative renal Na-K-Cl cotransporter are differentially distributed within the rabbit kidney*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(10): p. 4544-8.
5. Gamba, G., et al., *Molecular cloning, primary structure, and characterization of two members of the mammalian electroneutral sodium-(potassium)-chloride cotransporter family expressed in kidney*. J Biol Chem, 1994. **269**(26): p. 17713-22.
6. Gamba, G., et al., *Primary structure and functional expression of a cDNA encoding the thiazide-sensitive, electroneutral sodium-chloride cotransporter*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(7): p. 2749-53.
7. Adragna, N.C., M. Di Fulvio, and P.K. Lauf, *Regulation of K-Cl cotransport: from function to genes*. J Membr Biol, 2004. **201**(3): p. 109-37.
8. Daigle, N.D., et al., *Molecular characterization of a human cation-Cl-cotransporter (SLC12A8A, CCC9A) that promotes polyamine and amino acid transport*. J Cell Physiol, 2009. **220**(3): p. 680-9.
9. Caron, L., et al., *Cloning and functional characterization of a cation-Cl-cotransporter-interacting protein*. J Biol Chem, 2000. **275**(41): p. 32027-36.
10. Renfro, J.L., *Water and ion transport by the urinary bladder of the teleost Pseudopleuronectes americanus*. Am J Physiol, 1975. **228**(1): p. 52-61.
11. Geck, P., et al., *Electrically silent cotransport on Na⁺, K⁺ and Cl⁻ in Ehrlich cells*. Biochim Biophys Acta, 1980. **600**(2): p. 432-47.
12. Wiley, J.S. and R.A. Cooper, *A furosemide-sensitive cotransport of sodium plus potassium in the human red cell*. J Clin Invest, 1974. **53**(3): p. 745-55.
13. Gamba, G., *Molecular physiology and pathophysiology of electroneutral cation-chloride cotransporters*. Physiol Rev, 2005. **85**(2): p. 423-93.
14. Hebert, S.C., D.B. Mount, and G. Gamba, *Molecular physiology of cation-coupled Cl⁻ cotransport: the SLC12 family*. Pflugers Arch, 2004. **447**(5): p. 580-93.
15. Gillen, C.M., et al., *Molecular cloning and functional expression of the K-Cl cotransporter from rabbit, rat, and human. A new member of the cation-chloride cotransporter family*. J Biol Chem, 1996. **271**(27): p. 16237-44.
16. Russell, J.M., *Sodium-potassium-chloride cotransport*. Physiol Rev, 2000. **80**(1): p. 211-76.
17. Mercado, A., et al., *Functional and molecular characterization of the K-Cl cotransporter of Xenopus laevis oocytes*. Am J Physiol Cell Physiol, 2001. **281**(2): p. C670-80.
18. Alvarez-Leefmans, F.J. and E. Delpire, *Physiology and Pathology of Chloride Transporters and Channels in the Nervous System*2009: Elsevier.
19. Lang, F., et al., *Functional significance of cell volume regulatory mechanisms*. Physiol Rev, 1998. **78**(1): p. 247-306.
20. Kahle, K.T., et al., *Roles of the cation-chloride cotransporters in neurological disease*. Nat Clin Pract Neurol, 2008. **4**(9): p. 490-503.

21. Sangan, P., et al., *Basolateral K-Cl cotransporter regulates colonic potassium absorption in potassium depletion*. J Biol Chem, 2000. **275**(40): p. 30813-6.
22. Boettger, T., et al., *Deafness and renal tubular acidosis in mice lacking the K-Cl cotransporter Kcc4*. Nature, 2002. **416**(6883): p. 874-8.
23. Lytle, C., et al., *Distribution and diversity of Na-K-Cl cotransport proteins: a study with monoclonal antibodies*. Am J Physiol, 1995. **269**(6 Pt 1): p. C1496-505.
24. Mount, D.B., et al., *Isoforms of the Na-K-2Cl cotransporter in murine TAL I. Molecular characterization and intrarenal localization*. Am J Physiol, 1999. **276**(3 Pt 2): p. F347-58.
25. Plotkin, M.D., et al., *Localization of the thiazide sensitive Na-Cl cotransporter, rTSC1 in the rat kidney*. Kidney Int, 1996. **50**(1): p. 174-83.
26. Karadsheh, M.F., et al., *Localization of the KCC4 potassium-chloride cotransporter in the nervous system*. Neuroscience, 2004. **123**(2): p. 381-91.
27. Plotkin, M.D., et al., *Expression of the Na(+)-K(+)-2Cl- cotransporter BSC2 in the nervous system*. Am J Physiol, 1997. **272**(1 Pt 1): p. C173-83.
28. Stokes, J.B., *Passive NaCl transport in the flounder urinary bladder: predominance of a cellular pathway*. Am J Physiol, 1988. **255**(2 Pt 2): p. F229-36.
29. Forbush, B., 3rd and H.C. Palfrey, *[3H]bumetanide binding to membranes isolated from dog kidney outer medulla. Relationship to the Na,K,Cl co-transport system*. J Biol Chem, 1983. **258**(19): p. 11787-92.
30. Hegde, R.S. and H.C. Palfrey, *Ionic effects on bumetanide binding to the activated Na/K/2Cl cotransporter: selectivity and kinetic properties of ion binding sites*. J Membr Biol, 1992. **126**(1): p. 27-37.
31. Delpire, E., et al., *Molecular cloning and chromosome localization of a putative basolateral Na(+)-K(+)-2Cl- cotransporter from mouse inner medullary collecting duct (mIMCD-3) cells*. J Biol Chem, 1994. **269**(41): p. 25677-83.
32. Payne, J.A., et al., *Primary structure, functional expression, and chromosomal localization of the bumetanide-sensitive Na-K-Cl cotransporter in human colon*. J Biol Chem, 1995. **270**(30): p. 17977-85.
33. Yerby, T.R., et al., *Molecular characterization of the Na-K-Cl cotransporter of bovine aortic endothelial cells*. Am J Physiol, 1997. **273**(1 Pt 1): p. C188-97.
34. Moore-Hoon, M.L. and R.J. Turner, *Molecular and topological characterization of the rat parotid Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter1*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1373**(1): p. 261-9.
35. Cutler, C.P. and G. Cramb, *Two isoforms of the Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter are expressed in the European eel (Anguilla anguilla)*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1566**(1-2): p. 92-103.
36. Lorin-Nebel, C., et al., *The Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter in the sea bass Dicentrarchus labrax during ontogeny: involvement in osmoregulation*. J Exp Biol, 2006. **209**(Pt 24): p. 4908-22.
37. Colmenero-Flores, J.M., et al., *Identification and functional characterization of cation-chloride cotransporters in plants*. Plant J, 2007. **50**(2): p. 278-92.
38. Igarashi, P., et al., *Cloning, embryonic expression, and alternative splicing of a murine kidney-specific Na-K-Cl cotransporter*. Am J Physiol, 1995. **269**(3 Pt 2): p. F405-18.

39. Simon, D.B., et al., *Barter's syndrome, hypokalaemic alkalosis with hypercalciuria, is caused by mutations in the Na-K-2Cl cotransporter NKCC2*. Nat Genet, 1996. **13**(2): p. 183-8.
40. Gagnon, E., et al., *Functional and molecular characterization of the shark renal Na-K-Cl cotransporter: novel aspects*. Am J Physiol Renal Physiol, 2002. **283**(5): p. F1046-55.
41. Lytle, C. and B. Forbush, 3rd, *The Na-K-Cl cotransport protein of shark rectal gland. II. Regulation by direct phosphorylation*. J Biol Chem, 1992. **267**(35): p. 25438-43.
42. Jennings, M.L. and R.K. Schulz, *Okadaic acid inhibition of KCl cotransport. Evidence that protein dephosphorylation is necessary for activation of transport by either cell swelling or N-ethylmaleimide*. J Gen Physiol, 1991. **97**(4): p. 799-817.
43. Benziane, B., et al., *NKCC2 surface expression in mammalian cells: down-regulation by novel interaction with aldolase B*. J Biol Chem, 2007. **282**(46): p. 33817-30.
44. Lauf, P.K., et al., *Erythrocyte K-Cl cotransport: properties and regulation*. Am J Physiol, 1992. **263**(5 Pt 1): p. C917-32.
45. Mercado, A., et al., *Functional comparison of the K⁺-Cl⁻ cotransporters KCC1 and KCC4*. J Biol Chem, 2000. **275**(39): p. 30326-34.
46. Starke, L.C. and M.L. Jennings, *K-Cl cotransport in rabbit red cells: further evidence for regulation by protein phosphatase type 1*. Am J Physiol, 1993. **264**(1 Pt 1): p. C118-24.
47. Gagnon, K.B., R. England, and E. Delpire, *Volume sensitivity of cation-Cl⁻ cotransporters is modulated by the interaction of two kinases: Ste20-related proline-alanine-rich kinase and WNK4*. Am J Physiol Cell Physiol, 2006. **290**(1): p. C134-42.
48. Bergeron, M.J., et al., *Phosphoregulation of K⁽⁺⁾-Cl⁽⁻⁾ cotransporter 4 during changes in intracellular Cl⁽⁻⁾ and cell volume*. J Cell Physiol, 2009. **219**(3): p. 787-96.
49. Lee, H.H., et al., *Direct protein kinase C-dependent phosphorylation regulates the cell surface stability and activity of the potassium chloride cotransporter KCC2*. J Biol Chem, 2007. **282**(41): p. 29777-84.
50. Burg, M.B. and N. Green, *Function of the thick ascending limb of Henle's loop*. Am J Physiol, 1973. **224**(3): p. 659-68.
51. Rocha, A.S. and J.P. Kokko, *Sodium chloride and water transport in the medullary thick ascending limb of Henle. Evidence for active chloride transport*. J Clin Invest, 1973. **52**(3): p. 612-23.
52. Greger, R., E. Schlatter, and F. Lang, *Evidence for electroneutral sodium chloride cotransport in the cortical thick ascending limb of Henle's loop of rabbit kidney*. Pflugers Arch, 1983. **396**(4): p. 308-14.
53. Hebert, S.C., R.M. Culpepper, and T.E. Andreoli, *NaCl transport in mouse medullary thick ascending limbs. II. ADH enhancement of transcellular NaCl cotransport; origin of transepithelial voltage*. Am J Physiol, 1981. **241**(4): p. F432-42.
54. Paredes, A., et al., *Activity of the renal Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter is reduced by mutagenesis of N-glycosylation sites: role for protein surface charge in Cl⁻ transport*. Am J Physiol Renal Physiol, 2006. **290**(5): p. F1094-102.

55. Kaplan, M.R., et al., *Apical localization of the Na-K-Cl cotransporter, rBSC1, on rat thick ascending limbs*. *Kidney Int*, 1996. **49**(1): p. 40-7.
56. Quaggin, S.E., et al., *Localization of the renal Na-K-Cl cotransporter gene (Slc12a1) on mouse chromosome 2*. *Mamm Genome*, 1995. **6**(8): p. 557-8.
57. Wang, J., et al., *Linkage mapping of the Na-K-2Cl cotransporter gene (Slc12a1) to rat chromosome 3*. *Mamm Genome*, 1997. **8**(5): p. 379.
58. Igarashi, P., et al., *Cloning and kidney cell-specific activity of the promoter of the murine renal Na-K-Cl cotransporter gene*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(16): p. 9666-74.
59. Lazzaro, D., et al., *LFB1 and LFB3 homeoproteins are sequentially expressed during kidney development*. *Development*, 1992. **114**(2): p. 469-79.
60. Yang, T., et al., *Localization of bumetanide- and thiazide-sensitive Na-K-Cl cotransporters along the rat nephron*. *Am J Physiol*, 1996. **271**(4 Pt 2): p. F931-9.
61. Brunet, G.M., et al., *Novel insights regarding the operational characteristics and teleological purpose of the renal Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransporter (NKCC2s) splice variants*. *J Gen Physiol*, 2005. **126**(4): p. 325-37.
62. Gamba, G. and P.A. Friedman, *Thick ascending limb: the Na(+):K(+):2Cl(-) cotransporter, NKCC2, and the calcium-sensing receptor, CaSR*. *Pflugers Arch*, 2009. **458**(1): p. 61-76.
63. Hall, J.E. and A.C. Guyton, *Guyton and Hall textbook of medical physiology* 2011: Elsevier.
64. Carota, I., et al., *Localization and functional characterization of the human NKCC2 isoforms*. *Acta Physiol (Oxf)*, 2010. **199**(3): p. 327-38.
65. Su, A.I., et al., *Large-scale analysis of the human and mouse transcriptomes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(7): p. 4465-70.
66. Xue, H., et al., *Expression of NKCC2 in the rat gastrointestinal tract*. *Neurogastroenterol Motil*, 2009. **21**(10): p. 1068-e89.
67. Zhu, J.X., et al., *Cellular localization of NKCC2 and its possible role in the Cl⁻ absorption in the rat and human distal colonic epithelia*. *Transl Res*, 2011. **158**(3): p. 146-54.
68. Kinne, R., et al., *The use of membrane vesicles to study the NaCl/KCl cotransporter involved in active transepithelial chloride transport*. *Pflugers Arch*, 1985. **405 Suppl 1**: p. S101-5.
69. Kinne, R., et al., *Ammonium transport in medullary thick ascending limb of rabbit kidney: involvement of the Na⁺,K⁺,Cl⁻-cotransporter*. *J Membr Biol*, 1986. **94**(3): p. 279-84.
70. Lytle, C., T.J. McManus, and M. Haas, *A model of Na-K-2Cl cotransport based on ordered ion binding and glide symmetry*. *Am J Physiol*, 1998. **274**(2 Pt 1): p. C299-309.
71. Plata, C., et al., *Functional properties of the apical Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter isoforms*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(13): p. 11004-12.
72. Gimenez, I., P. Isenring, and B. Forbush, *Spatially distributed alternative splice variants of the renal Na-K-Cl cotransporter exhibit dramatically different affinities for the transported ions*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(11): p. 8767-70.
73. Reeves, W.B., D.A. Molony, and T.E. Andreoli, *Diluting power of thick limbs of Henle. III. Modulation of in vitro diluting power*. *Am J Physiol*, 1988. **255**(6 Pt 2): p. F1145-54.

74. Burg, M.B., *Thick ascending limb of Henle's loop*. *Kidney Int*, 1982. **22**(5): p. 454-64.
75. Castrop, H. and J. Schnermann, *Isoforms of renal Na-K-2Cl cotransporter NKCC2: expression and functional significance*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2008. **295**(4): p. F859-66.
76. Plata, C., et al., *Isoforms of the Na-K-2Cl cotransporter in murine TAL II. Functional characterization and activation by cAMP*. *Am J Physiol*, 1999. **276**(3 Pt 2): p. F359-66.
77. Plata, C., et al., *Alternatively spliced isoform of apical Na(+)-K(+)-Cl(-) cotransporter gene encodes a furosemide-sensitive Na(+)-Cl(-)cotransporter*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2001. **280**(4): p. F574-82.
78. Kim, G.H., et al., *Vasopressin increases Na-K-2Cl cotransporter expression in thick ascending limb of Henle's loop*. *Am J Physiol*, 1999. **276**(1 Pt 2): p. F96-F103.
79. Besseghir, K., M.E. Trimble, and L. Stoner, *Action of ADH on isolated medullary thick ascending limb of the Brattleboro rat*. *Am J Physiol*, 1986. **251**(2 Pt 2): p. F271-7.
80. Marumo, R., et al., *Differential upregulation of rat Na-K-Cl cotransporter, rBSC1, mRNA in the thick ascending limb of Henle in different pathological conditions*. *Kidney Int*, 1998. **54**(3): p. 877-88.
81. Knepper, M.A., et al., *Regulation of thick ascending limb transport by vasopressin*. *J Am Soc Nephrol*, 1999. **10**(3): p. 628-34.
82. Ecelbarger, C.A., et al., *Decreased renal Na-K-2Cl cotransporter abundance in mice with heterozygous disruption of the G(s)alpha gene*. *Am J Physiol*, 1999. **277**(2 Pt 2): p. F235-44.
83. Fernandez-Llama, P., et al., *Cyclooxygenase inhibitors increase Na-K-2Cl cotransporter abundance in thick ascending limb of Henle's loop*. *Am J Physiol*, 1999. **277**(2 Pt 2): p. F219-26.
84. Kwon, T.H., et al., *Regulation of sodium transporters in the thick ascending limb of rat kidney: response to angiotensin II*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2003. **285**(1): p. F152-65.
85. Attmane-Elakeb, A., et al., *Stimulation by in vivo and in vitro metabolic acidosis of expression of rBSC-1, the Na⁺-K⁺(NH₄⁺)-2Cl⁻ cotransporter of the rat medullary thick ascending limb*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(50): p. 33681-91.
86. Karim, Z., et al., *Acid pH increases the stability of BSC1/NKCC2 mRNA in the medullary thick ascending limb*. *J Am Soc Nephrol*, 2003. **14**(9): p. 2229-36.
87. Szutkowska, M., et al., *Zeta-crystallin mediates the acid pH-induced increase of BSC1 cotransporter mRNA stability*. *Kidney Int*, 2009. **76**(7): p. 730-8.
88. Attmane-Elakeb, A., H. Amlal, and M. Bichara, *Ammonium carriers in medullary thick ascending limb*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2001. **280**(1): p. F1-9.
89. Musselman, T.M., Z. Zhang, and S.M. Masilamani, *Differential regulation of the bumetanide-sensitive cotransporter (NKCC2) by ovarian hormones*. *Steroids*, 2010. **75**(11): p. 760-5.
90. Landolt-Marticorena, C. and R.A. Reithmeier, *Asparagine-linked oligosaccharides are localized to single extracytosolic segments in multi-span membrane glycoproteins*. *Biochem J*, 1994. **302** (Pt 1): p. 253-60.
91. McKee, J.A., et al., *Detection of Na(+) transporter proteins in urine*. *J Am Soc Nephrol*, 2000. **11**(11): p. 2128-32.

92. Nielsen, S., et al., *Ultrastructural localization of Na-K-2Cl cotransporter in thick ascending limb and macula densa of rat kidney*. *Am J Physiol*, 1998. **275**(6 Pt 2): p. F885-93.
93. Meade, P., et al., *cAMP-dependent activation of the renal-specific Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter is mediated by regulation of cotransporter trafficking*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2003. **284**(6): p. F1145-54.
94. Ortiz, P.A., *cAMP increases surface expression of NKCC2 in rat thick ascending limbs: role of VAMP*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2006. **290**(3): p. F608-16.
95. Gimenez, I. and B. Forbush, *Short-term stimulation of the renal Na-K-Cl cotransporter (NKCC2) by vasopressin involves phosphorylation and membrane translocation of the protein*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(29): p. 26946-51.
96. Caceres, P.S., G.R. Ares, and P.A. Ortiz, *cAMP stimulates apical exocytosis of the renal Na⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾-2Cl⁽⁻⁾ cotransporter NKCC2 in the thick ascending limb: role of protein kinase A*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(37): p. 24965-71.
97. Welker, P., et al., *Renal Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransporter activity and vasopressin-induced trafficking are lipid raft-dependent*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2008. **295**(3): p. F789-802.
98. Dimke, H., et al., *Acute growth hormone administration induces antidiuretic and antinatriuretic effects and increases phosphorylation of NKCC2*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2007. **292**(2): p. F723-35.
99. Carmosino, M., et al., *MAL/VIP17, a new player in the regulation of NKCC2 in the kidney*. *Mol Biol Cell*, 2010. **21**(22): p. 3985-97.
100. Zaarour, N., et al., *Secretory carrier membrane protein 2 regulates exocytic insertion of NKCC2 into the cell membrane*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(11): p. 9489-502.
101. Wilson, F.H., et al., *Human hypertension caused by mutations in WNK kinases*. *Science*, 2001. **293**(5532): p. 1107-12.
102. Simon, D.B. and R.P. Lifton, *The molecular basis of inherited hypokalemic alkalosis: Bartter's and Gitelman's syndromes*. *Am J Physiol*, 1996. **271**(5 Pt 2): p. F961-6.
103. Rinehart, J., et al., *WNK3 kinase is a positive regulator of NKCC2 and NCC, renal cation-Cl⁻ cotransporters required for normal blood pressure homeostasis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(46): p. 16777-82.
104. Anselmo, A.N., et al., *WNK1 and OSR1 regulate the Na⁺, K⁺, 2Cl⁻ cotransporter in HeLa cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(29): p. 10883-8.
105. Moriguchi, T., et al., *WNK1 regulates phosphorylation of cation-chloride-coupled cotransporters via the STE20-related kinases, SPAK and OSR1*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(52): p. 42685-93.
106. Liu, Z., et al., *Downregulation of NCC and NKCC2 cotransporters by kidney-specific WNK1 revealed by gene disruption and transgenic mouse models*. *Hum Mol Genet*, 2011. **20**(5): p. 855-66.
107. Yang, C.L., et al., *Mechanisms of WNK1 and WNK4 interaction in the regulation of thiazide-sensitive NaCl cotransport*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(5): p. 1379-87.
108. Ponce-Coria, J., et al., *Regulation of NKCC2 by a chloride-sensing mechanism involving the WNK3 and SPAK kinases*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(24): p. 8458-63.

109. Reiche, J., et al., *SORLA/SORL1 functionally interacts with SPAK to control renal activation of Na(+)-K(+)-Cl(-) cotransporter 2*. Mol Cell Biol, 2010. **30**(12): p. 3027-37.
110. Piechotta, K., et al., *Characterization of the interaction of the stress kinase SPAK with the Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter in the nervous system: evidence for a scaffolding role of the kinase*. J Biol Chem, 2003. **278**(52): p. 52848-56.
111. Fraser, S.A., et al., *Regulation of the renal-specific Na⁺-K⁺-2Cl⁻ co-transporter NKCC2 by AMP-activated protein kinase (AMPK)*. Biochem J, 2007. **405**(1): p. 85-93.
112. Fraser, S., et al., *Regulation of the energy sensor AMP-activated protein kinase in the kidney by dietary salt intake and osmolality*. Am J Physiol Renal Physiol, 2005. **288**(3): p. F578-86.
113. Fenton, R.A. and M.A. Knepper, *Mouse models and the urinary concentrating mechanism in the new millennium*. Physiol Rev, 2007. **87**(4): p. 1083-112.
114. Nielsen, S., et al., *Aquaporins in the kidney: from molecules to medicine*. Physiol Rev, 2002. **82**(1): p. 205-44.
115. Takahashi, N., et al., *Uncompensated polyuria in a mouse model of Bartter's syndrome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(10): p. 5434-9.
116. Oppermann, M., et al., *Macula densa control of renin secretion and preglomerular resistance in mice with selective deletion of the B isoform of the Na,K,2Cl co-transporter*. J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(8): p. 2143-52.
117. Oppermann, M., et al., *Renal function in mice with targeted disruption of the A isoform of the Na-K-2Cl co-transporter*. J Am Soc Nephrol, 2007. **18**(2): p. 440-8.
118. Schnermann, J. and J.P. Briggs, *Tubuloglomerular feedback: mechanistic insights from gene-manipulated mice*. Kidney Int, 2008. **74**(4): p. 418-26.
119. Ren, Y., et al., *Nystatin and valinomycin induce tubuloglomerular feedback*. Am J Physiol Renal Physiol, 2001. **281**(6): p. F1102-8.
120. Bell, P.D., J.Y. Lapointe, and J. Cardinal, *Direct measurement of basolateral membrane potentials from cells of the macula densa*. Am J Physiol, 1989. **257**(3 Pt 2): p. F463-8.
121. Schlatter, E., et al., *Macula densa cells sense luminal NaCl concentration via furosemide sensitive Na⁺2Cl⁻-K⁺ cotransport*. Pflugers Arch, 1989. **414**(3): p. 286-90.
122. Schnermann, J. and D.Z. Levine, *Paracrine factors in tubuloglomerular feedback: adenosine, ATP, and nitric oxide*. Annu Rev Physiol, 2003. **65**: p. 501-29.
123. Greger, R. and E. Schlatter, *Properties of the basolateral membrane of the cortical thick ascending limb of Henle's loop of rabbit kidney. A model for secondary active chloride transport*. Pflugers Arch, 1983. **396**(4): p. 325-34.
124. Reeves, W.B., C.J. Winters, and T.E. Andreoli, *Chloride channels in the loop of Henle*. Annu Rev Physiol, 2001. **63**: p. 631-45.
125. Waldegger, S., et al., *Barttin increases surface expression and changes current properties of ClC-K channels*. Pflugers Arch, 2002. **444**(3): p. 411-8.
126. Blanchard, A., et al., *Paracellin-1 is critical for magnesium and calcium reabsorption in the human thick ascending limb of Henle*. Kidney Int, 2001. **59**(6): p. 2206-15.

127. Sun, A., et al., *Vasopressin alters the mechanism of apical Cl⁻ entry from Na⁺:Cl⁻ to Na⁺:K⁺:2Cl⁻ cotransport in mouse medullary thick ascending limb.* J Membr Biol, 1991. **120**(1): p. 83-94.
128. Bartter, F.C., et al., *Hyperplasia of the juxtaglomerular complex with hyperaldosteronism and hypokalemic alkalosis. A new syndrome.* Am J Med, 1962. **33**: p. 811-28.
129. Shaer, A.J., *Inherited primary renal tubular hypokalemic alkalosis: a review of Gitelman and Bartter syndromes.* Am J Med Sci, 2001. **322**(6): p. 316-32.
130. Ji, W., et al., *Rare independent mutations in renal salt handling genes contribute to blood pressure variation.* Nat Genet, 2008. **40**(5): p. 592-9.
131. Acuna, R., et al., *Rare mutations in SLC12A1 and SLC12A3 protect against hypertension by reducing the activity of renal salt cotransporters.* J Hypertens, 2011. **29**(3): p. 475-83.
132. Eng, B., et al., *Characterization of a long-term rat mTAL cell line.* Am J Physiol Renal Physiol, 2007. **293**(4): p. F1413-22.
133. Gagnon, E., et al., *Functional comparison of renal Na-K-Cl cotransporters between distant species.* Am J Physiol Cell Physiol, 2003. **284**(2): p. C365-70.
134. Zhang, H., et al., *Proteolytic processing of Alzheimer's beta-amyloid precursor protein.* J Neurochem, 2011.
135. Isenring, P., et al., *Comparison of Na-K-Cl cotransporters. NKCC1, NKCC2, and the HEK cell Na-L-Cl cotransporter.* J Biol Chem, 1998. **273**(18): p. 11295-301.
136. Watson, J.D., et al., *Molecular biology of the gene.* 6e ed2008: Cold spring Harbor laboratory press.
137. Ecelbarger, C.A., et al., *Regulation of the abundance of renal sodium transporters and channels by vasopressin.* Exp Neurol, 2001. **171**(2): p. 227-34.