

Abbreviations

ATR1	Angiotensin II Type 1 Receptor
Baf	Bafilomycine
CA	Anhydrase carbonique
CAP1	Channel Activating Protease 1
CCD	Canal collecteur cortical
CFEX	Cl-/formate exchanger
ClC-K	Chloride Channel K
CNT	Tubule Connecteur
COX	Cyclo-oxygenase
Cx	Connexine
DCT	Tubule contourné distal
DOCP	Déoxycorticosterone Pivalate
ENaC	Epithelial sodium channel
FHHt	Hypertension HyperkaliŹmique Familiale
HCTZ	Hydrochlorothiazide
KS-WNK1	Kidney Specific WNK1
NBCe1	Electrogenic sodium bicarbonate cotransporter 1
NCC	Sodium Chloride cotransporter
NDCBE	Na ⁺ -driven Chloride/Bicarbonate Exchanger
Nedd	Neural precursor cell expressed developmentally down-regulated
NHE3	Sodium–hydrogen antiporter
NKCC2	Sodium Potassium Chloride cotransporter 2
OSR1	Oxidative Stress-Responsive kinase-1
PGE	Prostaglandin E
PGES	Prostaglandin E Synthase
PHA	PseudohypoaldostŹronisme
PT	Tubule Proximal
ROMK	Renal outer medullary potassium (K)
SGK1	Serum and Glucocorticoid-induced Kinase 1
SPAK	STE20/SPS1-related Proline/Alanine-rich Kinase
TAL	Branche ascendante large
TK	kallikrŹine tissulaire
WNK	With No lysine (K)

INTRODUCTION.....	10
I LA BALANCE DU SODIUM.....	11
1) Les volumes intracellulaires et extracellulaires	11
2) Importance du sodium dans le volume intra et extracellulaire	12
3) Adaptation aux variations aiguës des apports en Na.....	13
4) Adaptation aux variations à long terme des apports en Na	14
II LE REIN	18
1) Présentation du rein et du néphron	18
2) Les transporteurs de NaCl le long du tubule rénal et les pathologies associées	19
a) Le tubule proximal	20
b) L'anse de Henle et le syndrome de Bartter.....	22
Le syndrome de Bartter	23
c) Le tubule contourné distal	25
Le cotransporteur NCC et le syndrome de Gitelman	26
Structure de NCC et sa régulation	26
Régulation de NCC par l'aldostérone et l'angiotensine II.....	26
Régulation de NCC par phosphorylation/déphosphorylation et dégradation	27
Le syndrome de Gitelman	28
d) Le tubule connecteur et le canal collecteur	29
Les cellules principales.....	29
Le canal sodium épithélial (ENaC)	31
Structure et généralité.....	31
Régulation de l'activité d'ENaC	33
Le paradoxe aldostérone.....	40
Le syndrome de Liddle et Le pseudohypoaldostérisme type 1 (PHA1)	41
Les cellules intercalaires.....	42
Les cellules α -intercalaires	42
Les cellules β -intercalaires	43
Pendrine et transport transcellulaire de chlore	43
Pendrine et pression artérielle.....	44
Régulation de la pendrine.....	45
Relation entre la pendrine et le canal ENaC	46
Identification d'un nouveau système de transport de NaCl Pendrine/NDCBE dans les cellules β -intercalaires du canal collecteur.....	46
3) Les diurétiques	50
Les diurétiques osmotiques	51
Les inhibiteurs de l'anhydrase carbonique	52
Les diurétiques de l'anse	52
Les diurétiques thiazidiques.....	53
Les diurétiques épargneurs de potassium.....	53
III LES KINASES WNKS ET L'HYPERTENSION HYPERKALIEMIQUE FAMILIALE.....	54
1) L'Hypertension Hyperkaliémique Familiale.....	54
2) Les kinases WNKS	54
WNKs, NCC et FHHt.....	55
Régulation de NCC par WNK4.....	55
Régulation de NCC par WNK1.....	59
ARTICLE ET EXPERIMENTATIONS	62
OBJECTIF DE LA THESE	63

I Rôle de NDCBE dans la régulation de la balance du sodium	64
Introduction.....	65
Matériels et méthodes.....	66
Résultats.....	72
Discussion.....	87
II Rôle des cellules intercalaires dans la régulation de la balance sdu sodium	90
Introduction et objectif de l'étude.....	91
III Régulation par la kinase WNK4 de la voie NDCBE/Pendrine.....	108
Introduction.....	109
Matériels et méthodes.....	110
Résultat.....	119
Discussion.....	129
CONCLUSION GENERALE	135
BIBLIOGRAPHIE	141

INTRODUCTION

I La balance du sodium

1) Les volumes intracellulaires et extracellulaires

L'eau représente de 50 à 70% du poids corporel. L'ensemble de l'eau est réparti entre deux compartiments : le volume intracellulaire et extracellulaire. Le volume intracellulaire représente environ 2 fois celui du volume extracellulaire. Le volume extracellulaire est lui-même divisé en deux sous-compartiments : le volume plasmatique et le volume interstitiel. Ainsi chez un homme adulte de 70 kg, le volume intracellulaire représente 25 Litres, le volume interstitiel 11 Litres et le volume plasmatique 3 Litres. (Figure 1)

Masse corporelle d'eau (50-70% du poids corporel)		
Volume intracellulaire 30-40% du poids corporel	Volume extracellulaire 20% du poids corporel	
25 L	interstitiel 11 L	Plasma 3 L

Figure 1 Représentations des compartiments liquidiens en pourcentage de masse corporelle et en litre chez un homme adulte de 70kg

Il existe des mouvements nets non nuls d'eau entre les différents compartiments. Ces mouvements nets d'eau sont passifs et sont possibles uniquement :

- si la membrane qui sépare deux compartiments est perméable à l'eau
- si il existe une différence d'osmolalité entre les deux compartiments avec un mouvement net d'eau du compartiment ayant la plus faible osmolalité vers le celui ayant la plus grande osmolalité.

Les apports en eau et en différents solutés dus à l'alimentation vont perturber l'osmolalité du compartiment extracellulaire induisant une variation des volumes intra et extracellulaire. L'organisme doit cependant conserver la quantité d'eau et les concentrations des différents solutés constants, il doit donc assurer que l'excrétion de l'eau et des solutés soient identiques aux apports.

2) Importance du sodium dans le volume intra et extracellulaire

Le sodium étant le cation majoritaire du milieu extracellulaire, les sels de sodium, c'est à dire essentiellement le chlorure de sodium, sont responsables de l'osmolalité efficace extracellulaire. A chaque apport de sodium, il y a augmentation de l'osmolalité du compartiment extracellulaire entrainant une augmentation du VEC permettant de normaliser ce paramètre. (Figure 2)

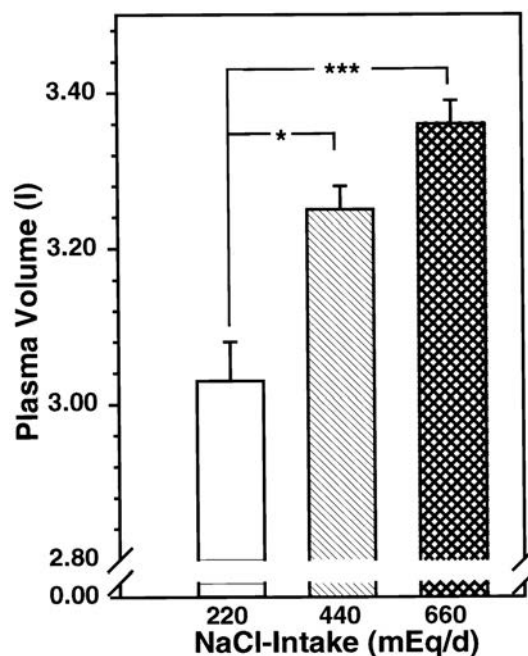


Figure 2 Volume sanguin (en L) en fonction des apports en NaCl,
d'après M. Heer et al., AJP Renal Physiol, 2000: 278, F585-F595

Ainsi, il existe une relation positive entre le volume plasmatique et les apports en NaCl. On remarque cependant que l'augmentation du volume plasmatique est minime par rapport à la quantité de sel ingérée.

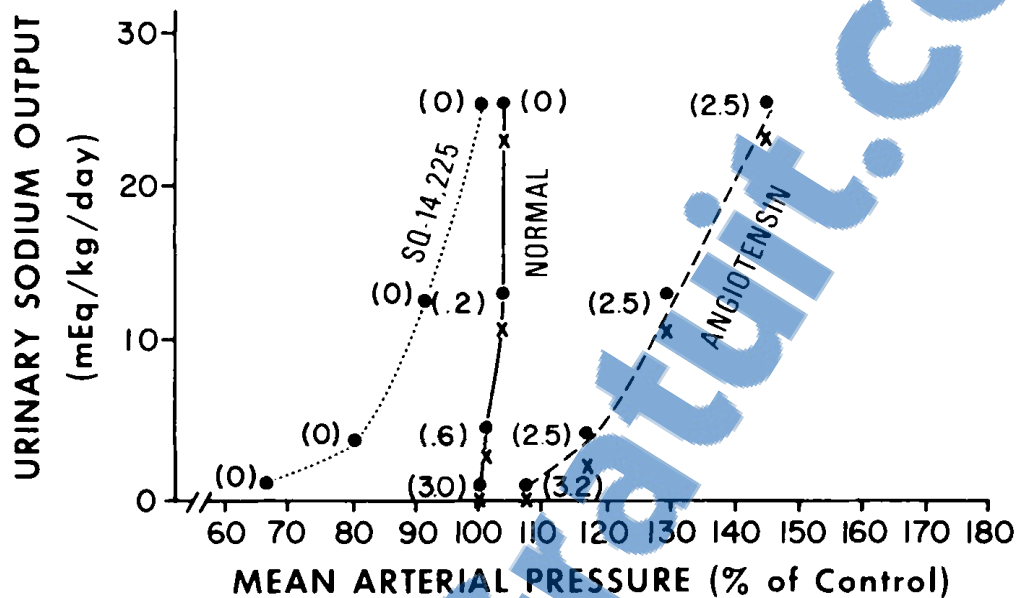


Figure 3 Excrétion urinaire de sodium en fonction de la pression artérielle moyenne
d'après Arthur G Guyton, AJH 1989; 2:575 - 585

En effet, le volume plasmatique est un des déterminant primaire du débit cardiaque et de la pression artérielle, ainsi une augmentation du volume plasmatique devrait augmenter la pression artérielle. Cependant, ceci a pour effet stimuler la natriurèse immédiatement (Figure 3), ce qui a pour conséquence de limiter l'augmentation de volémie. Une petite augmentation du volume plasmatique aura pour conséquence une forte excrétion de sodium urinaire (Guyton, 1989). Ce mécanisme est critique afin de permettre à l'organisme de maintenir la volémie constante malgré des variations importantes des apports en sel.

3) Adaptation aux variations aiguës des apports en Na

L'organisme peut faire face à des variations importantes d'apport en eau et NaCl et d'adapter leur excrétion en conséquence. Cependant cette

adaptation n'est pas immédiate. Par exemple, le passage d'un régime à 250 mmol/jour de sodium à 12mmol/jour chez un homme sain demande environ 6 jours avant d'atteindre un état d'équilibre. (Figure 4)

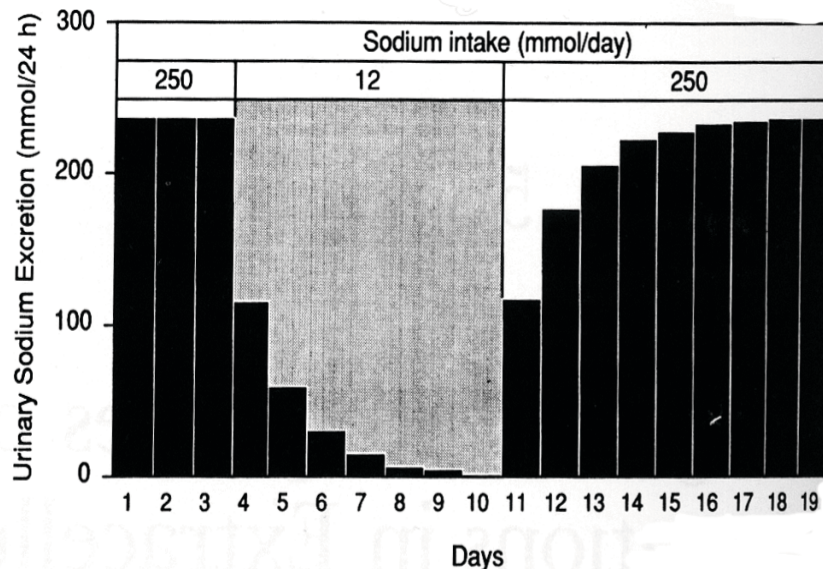


Figure 5 Adaptation de l'excrétion urinaire de sodium en fonction des apports en sodium

D'après Simpson FO., Lancet. 1988 Jul 2;2(8601):25-9.

Pendant ce temps d'adaptation, le bilan sodé est négatif (l'organisme excrète plus de sodium que l'alimentation en apporte) et le volume extracellulaire diminue. Cette diminution reste cependant limitée, de l'ordre de 600ml dans cet exemple. A l'inverse, le passage à un régime plus riche en sel induit un bilan positif de sodium et une augmentation temporaire du volume plasmatique jusqu'au nouveau point d'équilibre.

4) Adaptation aux variations à long terme des apports en Na

Depuis des millions d'années, les sociétés humaines primitives ont eu un régime contenant en général moins de 1g de chlorure de sodium (soit 17mmol de sodium) (Blackburn & Prineas, 1983) (Eaton & Konner, 1985). Cependant depuis la sédentarisation et le développement de l'agriculture, la consommation moyenne de sel de la nourriture a augmentée jusqu'à

atteindre 6g à 12g par jour en France (soit environ 100 à 200 mmol/jour de sodium) (Adshead, 1992).

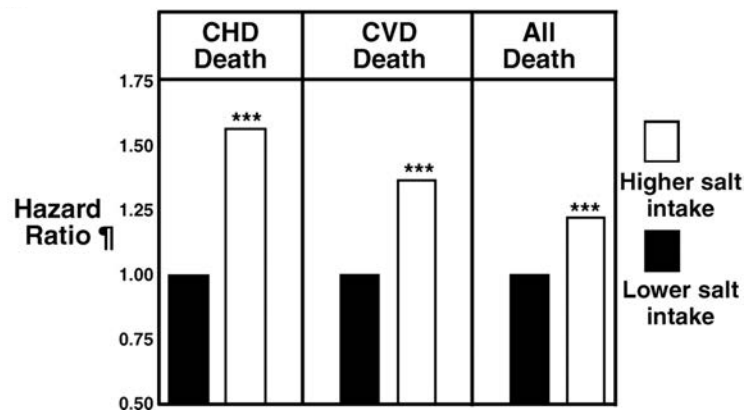


Figure 5 Risque de mort par une maladie coronarienne (CHD), une maladie cardiovasculaire (CVD) et toute autres raisons (all death) par rapport au régime en sel.
D'après Meneton P. et al., *Physiol. Rev*, 2005 adapté de Tuomilehto J, *The Lancet*, 2001

Cette augmentation de la consommation de sel n'est probablement pas sans conséquence pour la santé. En effet, en 2001 une équipe finlandaise a réalisé une étude de cohorte évaluant l'impact sur la mortalité de régimes alimentaires pauvres ou riches en sel. (Tuomilehto et al., 2001) Les observations montrent que les populations ayant un régime riche en sel ont plus de risque de mourir de maladie coronarienne ou cardiovasculaire, voire même pour toutes autres raisons. (Figure 5)

En 1995, Denton D et al. ont montré que chez le chimpanzé un régime riche en sel pendant 20 mois faisait augmenter la pression artérielle de 110 à 140 mmHg et cette pression reprenait une valeur normale lorsque le régime était de nouveau normosodé (Denton et al., 1995).

Depuis, d'autres études chez l'homme ont confirmé qu'il existe une corrélation entre la consommation de NaCl et la pression artérielle (Resnick et al., 2000) (Sacks et al., 2001) (Intersalt, 1988) L'augmentation chronique de la consommation de sel peut donc induire une hypertension artérielle, définie par une valeur de pression systolique

supérieure à 140 mmHg ou une pression artérielle diastolique supérieure à 90 mmHg chez un individu adulte sans autre pathologie.

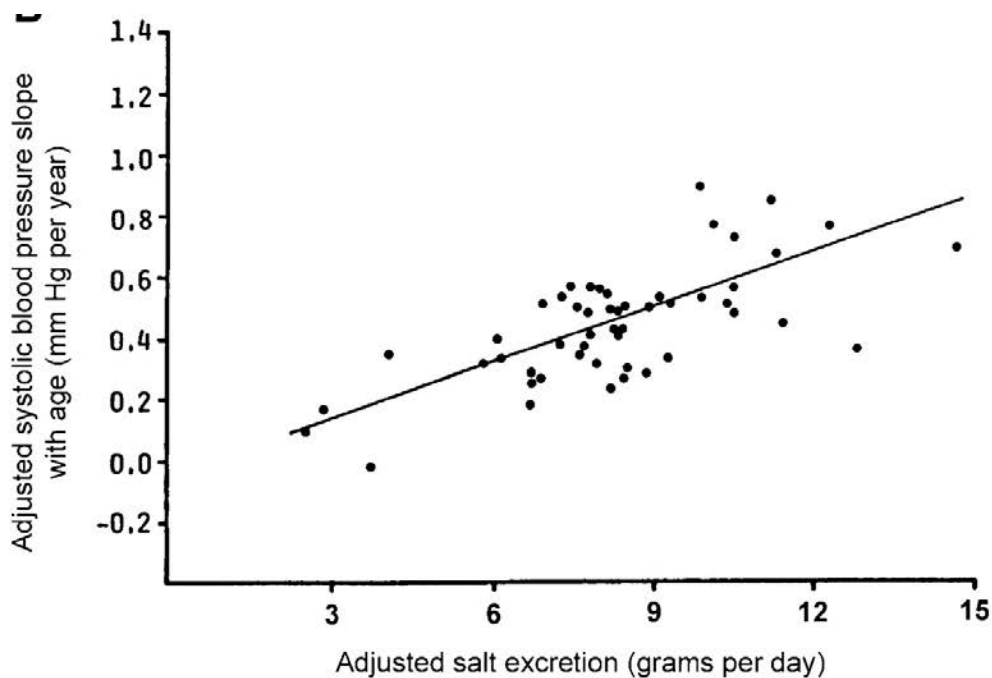


Figure 6 Etude INTERSALT, pression systolique en fonction de la quantité de sel excrété.
d'après Meneton P, Jeunemaitre X, *Physiol Rev.* 2005 Apr;85(2):679-715.

L'hypertension artérielle est la maladie la plus répandue dans la population humaine. En France, elle touche près de 15 millions de personnes et plus de 25% de la population mondiale. Elle peut entraîner des complications telles qu'une insuffisance cardiaque, des accidents vasculaires cérébraux, des infarctus du myocarde voire des lésions aux reins pouvant provoquer des insuffisances rénales. Toutefois, l'hypertension reste une maladie complexe dont les mécanismes moléculaires restent aujourd'hui très mal connus. A la fin des années 60, Guyton et Coleman développèrent un modèle mathématique intégrant tous les facteurs pouvant avoir un impact sur la régulation de la pression artérielle (Guyton & Coleman, 1968). Leur conclusion fut que toutes les formes d'hypertension chroniques impliquent un défaut d'excrétion de sodium par le rein.

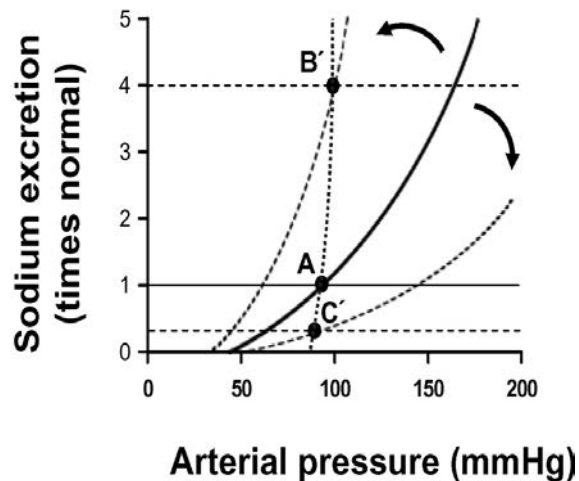


Figure 7 Représentation de l'excrétion de sodium en fonction de la pression artérielle
 courbe A patient normal, courbe B' patient hypotendus, courbe C' patient
 hypertendu (d'après Guyton AC, Coleman TG, Am J Med, 1972)

Sur la figure 7 ci-dessus, le patient symbolisé par le point C' est hypertendu. Sa capacité d'excrétion de sodium est moindre que le patient sain à l'équilibre, symbolisé par le point A. Ainsi, pour avoir une excrétion de sodium équivalente à celle du sujet A, la pression artérielle du sujet C' doit être plus importante

II Le rein

Le rein est donc l'organe responsable de la régulation de balance du sodium et, en accord avec l'hypothèse de Guyton, de plus en plus d'études montrent que le rein joue un rôle prépondérant dans la régulation de la pression artérielle.

1) Présentation du rein et du néphron

Le rein maintient constante la composition du milieu intérieur (volume, osmolalité, concentration plasmatique de potassium et pH sanguin). Pour assurer l'homéostasie du milieu intérieur le rein filtre une grande quantité de plasma par jour, jusqu'à 180 litres chez l'homme. Les cellules épithéliales rénales, en réabsorbant ou sécrétant de l'eau et des solutés, modifient la composition de cet ultrafiltrat, de façon à excréter dans l'urine la même quantité d'eau et d'ions que celle ingérée quotidiennement. Dans la mesure où les apports en eau et solutés varient considérablement d'un individu à l'autre, ces processus de réabsorption et de sécrétion sont hautement contrôlés.

Chez l'homme, le rein est composé d'environ 1 million de néphrons, son unité fonctionnelle. Chaque néphron est constitué d'un glomérule et d'un tubule rénal composé d'une succession de segments tubulaires, chacun possédant un épithélium spécifique. Le tubule rénal est divisé en 3 zones fonctionnellement différentes, le tubule proximal, l'anse de Henlé et le néphron distal. Le glomérule permet la formation de l'urine primitive. L'ultrafiltrat résultant de la filtration glomérulaire du plasma sanguin a une composition proche de celle du plasma à l'exception d'une concentration en protéines plasmatiques très inférieure à celle du plasma (13mg/L contre 65g/L dans le plasma). Le tubule proximal qui fait directement suite au glomérule assure la réabsorption massive d'eau et de solutés. L'anse de Henlé permet la création et la maintenance du gradient cortico-

papillaire, nécessaire à la concentration de l'urine finale. Le néphron distal, qui comprend le tubule contourné distal (DCT), le tubule connecteur (CNT) et le canal collecteur (CD), assure l'ajustement final de l'excrétion des électrolytes et d'eau.

2) Les transporteurs de NaCl le long du tubule rénal et les pathologies associées

Parmi les différentes substances transportées à travers l'épithélium rénal, l'ion sodium est particulièrement important. La réabsorption de Na s'effectue tout le long du néphron.

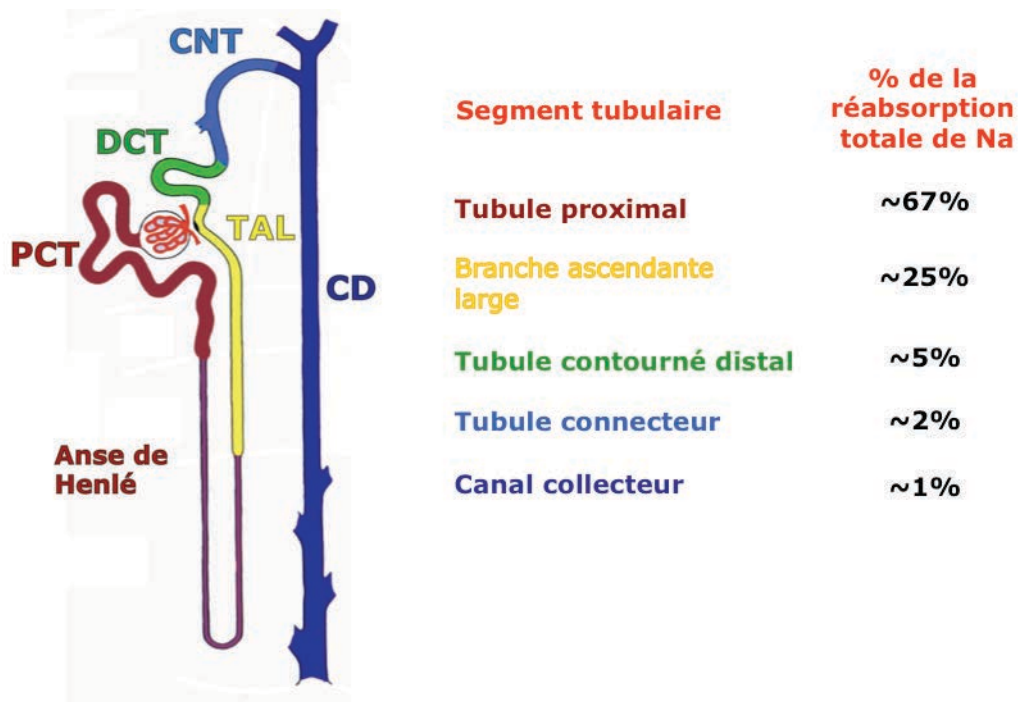


Figure 8 Représentation des différents segments tubulaires du néphron et leur réabsorption respective de sodium

Le PT réabsorbe 67% du sodium filtré par le glomérule. La branche large ascendante de l'anse de Henlé assure 25% de la réabsorption du sodium filtré. Le DCT réabsorbe 5% du Na filtré et le CNT/CD réabsorbe 3% de la charge filtrée de sodium (figure 8). Contrairement à la

réabsorption de Na^+ par le tubule proximal qui est moins régulée, la réabsorption du sodium dans le néphron distal est très contrôlée.

Quel que soit le segment du néphron, la Na^+/K^+ -ATPase basolatérale permet de dépléter la cellule en sodium, le gradient entrant de sodium à travers la membrane plasmique qui résulte de cette action est alors utilisée comme source d'énergie pour le transport du Na^+ depuis le fluide urinaire vers le cytoplasme à travers la membrane apicale. Les transporteurs assurant l'entrée apicale du Na^+ varient d'un segment tubulaire à l'autre.

a) Le tubule proximal

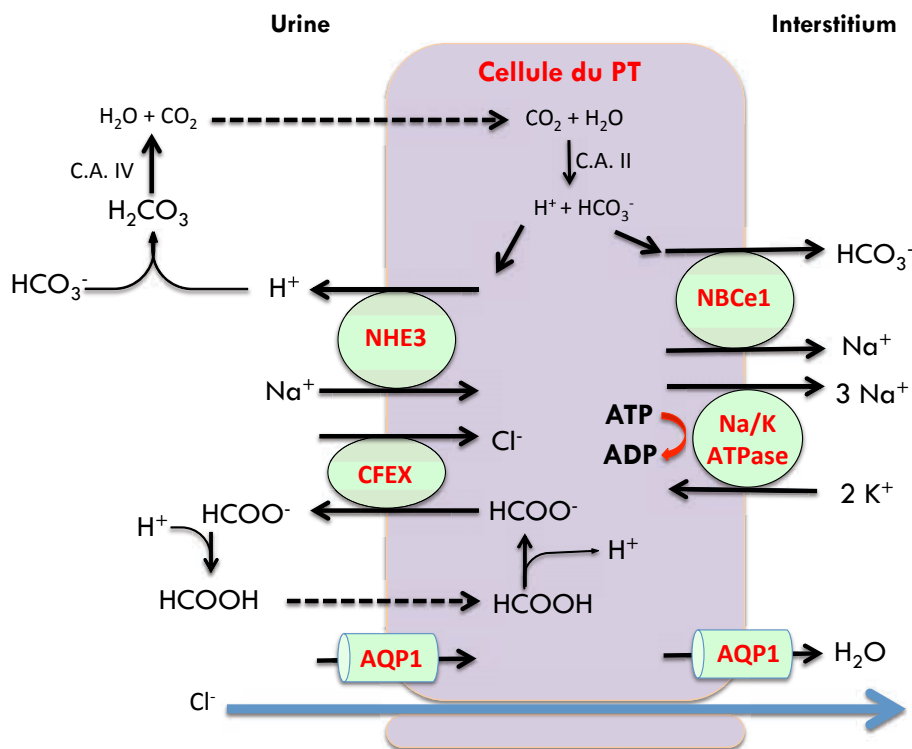


Figure 9 Modèle simplifié du transport de sodium, chlore et eau dans les cellules du PT (C.A. : anhydrase carbonique ; CFEX : Cl⁻-formate exchanger ; AQP1 : Aquaporine 1 ; NBCe1 : Electrogenic sodium bicarbonate cotransporter 1)

Le tubule proximal (PT) réabsorbe les deux tiers du sodium filtré par le glomérule. La réabsorption de sodium dans le tube proximal est contrôlée par de nombreux mécanismes contrôles à la fois intrinsèques

(balance tubulo-glomérulaire), autocrines (dopamine et angiotensine II), endocrines (angiotensine II, insuline, glucocorticoïdes) et nerveux (noradrénaline). Du côté apical, le tubule proximal exprime l'échangeur sodium/proton NHE3 (Biemesderfer et al., 1993) (figure 9). NHE3 est le principal transporteur de sodium du tubule proximal, il assure la réabsorption des deux tiers du Na^+ filtré. Son activité est dépendante d'une enzyme, l'anhydrase carbonique. L'anhydrase carbonique est exprimée dans la plupart des segments du néphron. Il en existe plusieurs isoformes et dans le rein les formes II et IV sont prédominantes chez l'homme et le rongeur (Purkerson & Schwartz, 2007). La CA II est cytosolique tandis que la CA IV est associée à la membrane apicale dans la lumière tubulaire. (Brown, Zhu, & Sly, 1990). L'anhydrase carbonique II génère, à partir de CO_2 et d'eau, un ion bicarbonate et un proton. L'ion bicarbonate est transporté dans l'interstitium par le cotransporteur sodium/bicarbonate NBCe1. (Mahnensmith & Aronson, 1985) Le proton est transporté de la cellule dans la lumière du tubule par NHE3. Dans la lumière, il s'associe à un ion bicarbonate pour former de l'acide carbonique H_2CO_3 aussitôt transformé par l'anhydrase carbonique IV en CO_2 et H_2O . Le CO_2 peut passer la membrane apicale passivement et retourner dans la cellule. De cette manière, la CA II et CA IV réalisent un cycle permettant la réabsorption des ions bicarbonate et sodium.

Le tubule proximal est hautement perméable à l'eau. Des canaux à eau appelés « aquaporines » (AQP1) sont exprimés dans les membranes apicales et basolatérales des cellules proximales (Nielsen, Smith, Christensen, Knepper, & Agre, 1993). La réabsorption d'eau de la lumière vers l'interstitium crée un gradient de concentration qui favorise le transport de chlore et de potassium à travers les jonctions serrées qui, dans le tubule proximal, sont relativement perméables. Il existe aussi des échangeurs chlore/oxalate – chlore/formate (CFEX) à la surface apicale permettant une réabsorption transcellulaire d'ion chlorure (Aronson & Giebisch, 1997).

b) L'anse de Henle et le syndrome de Bartter

L'anse de Henle est constituée d'une branche fine descendante, d'une branche fine ascendante et d'une branche large ascendante. Les branches sont organisées en épingle à cheveux et ont des perméabilités à l'eau et au sodium très différentes permettant la formation d'un gradient cortico-papillaire de NaCl jouant un rôle critique dans les phénomènes de concentration de l'urine. Ce gradient interstitiel d'osmoles est maintenu grâce à la présence de vasa recta parallèles aux branches de l'anse de Henle et présentant eux même une organisation en épingle à cheveu et des perméabilités aux solutés et à l'eau particulières leur permettant de soustraire l'eau réabsorbée dans le collecteur tout en trappant les osmoles dans l'interstitium.

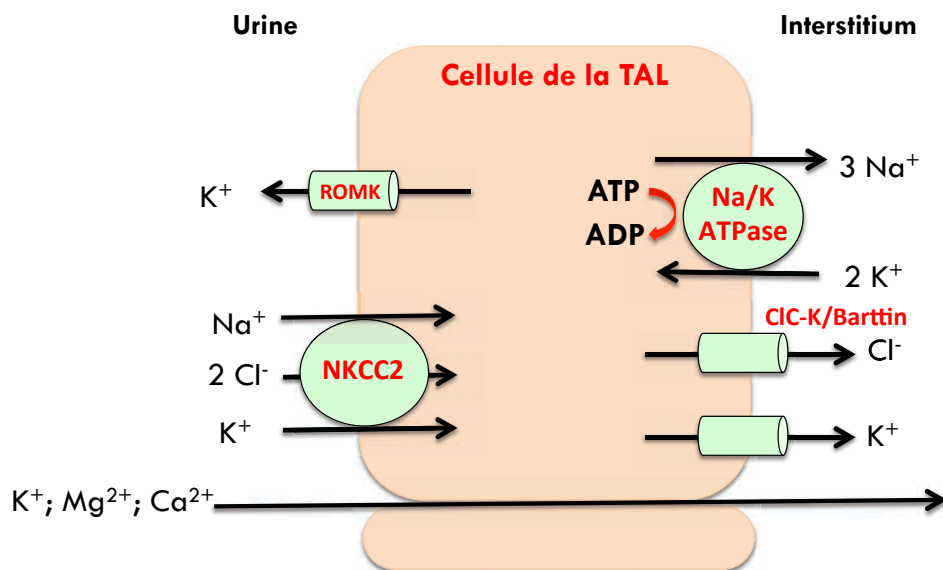


Figure 10 Modèle simplifié du transport de sodium et chlore dans les cellules de la TAL

La branche large ascendante (TAL) assure 25% de la réabsorption du NaCl filtré par le glomérule. Le cotransporteur Na-K-2Cl apical, NKCC2, assure le cotransport actif de sodium, de chlore et de potassium (figure 10). Le canal potassique ROMK (pour Renal Outer Medullary-K) apical fait sortir le

potassium de la cellule vers la lumière du tubule. Ce recyclage de potassium est nécessaire à l'activité de NKCC2. (Wang, White, Geibel, & Giebisch, 1990) Le canal chlorure ClC-K et la Barttin, son cofacteur essentiel (Fahlke & Fischer, 2010), présents sur la membrane basolatérale permettent le transport de chlore de la cellule vers l'interstitium. La branche large est aussi un segment important de la réabsorption de potassium. Elle réabsorbe environ 25% du potassium filtré. Le long de la branche large ascendante, la réabsorption de potassium passe par deux voies, une voie transcellulaire et une voie paracellulaire. La voie paracellulaire est dépendante du potentiel luminal positif généré par les canaux potassiques apicaux et l'activité de NKCC2. La voie transcellulaire passe par le cotransporteur NKCC2 et les canaux potassiques présents au pôle basolatéral. L'utilisation de diurétiques de l'anse inhibe la réabsorption transcellulaire et durant cette inhibition, le potassium continue de diffuser passivement à travers les canaux apicaux dans la lumière. Il n'y a alors plus réabsorption mais une sécrétion de potassium. Ainsi l'utilisation de diurétiques de l'anse favorise la kaliurèse.

La branche ascendante large de l'anse de Henlé permet aussi la réabsorption paracellulaire de calcium et de magnésium. Ce transport est favorisé par le voltage transépithélial positif dans la lumière. L'anse réabsorbe environ 20% du calcium et 70% du magnésium filtré. (Quamme, 1997). Des perturbations de l'activité de transport par la cellule peuvent donc affecter la réabsorptions de Mg^{2+} et Ca^{2+} .

Le syndrome de Bartter

Le syndrome de Bartter est caractérisé par l'association d'une alcalose hypokaliémique, une déshydratation conduisant à un taux de rénine et d'aldostérone plasmatique élevée, une résistance vasculaire à

l'angiotensine II, une polyurie, d'une hypermagnésiurie avec hypomagnésémie fréquente et parfois une hypotension (Bartter, Pronove, Gill, & Maccardle, 1962). Cette maladie se manifeste habituellement dans l'enfance. Ce syndrome peut être la conséquence de la mutation de différents gènes codant pour différents transporteurs de la TAL. Ainsi le syndrome de type 1 est dû à l'inactivation du cotransporteur NKCC2 (Simon, Karet, Hamdan, et al., 1996), de type 2 à l'inactivation du canal ROMK (Simon, Karet, Rodriguez-Soriano, et al., 1996), de type 3 à l'inactivation de CIC-K (Simon et al., 1997) et de type 4 par l'inactivation de la Barttin (Birkenhager et al., 2001). La Barttin assure à la fois la stabilité du canal CIC-K à la membrane (Estevez et al., 2001) mais aussi favorise l'ouverture et l'activité du canal (Fischer, Janssen, & Fahlke, 2010). La maladie est aussi associée à une hypercalciurie pouvant provoquer une néphrocalcinose.

Le néphron distal

Le néphron distal est le site de la régulation fine de la balance du sodium et du volume extracellulaire. Il est composé du tubule contourné distal, du tubule connecteur et du canal collecteur.

c) Le tubule contourné distal

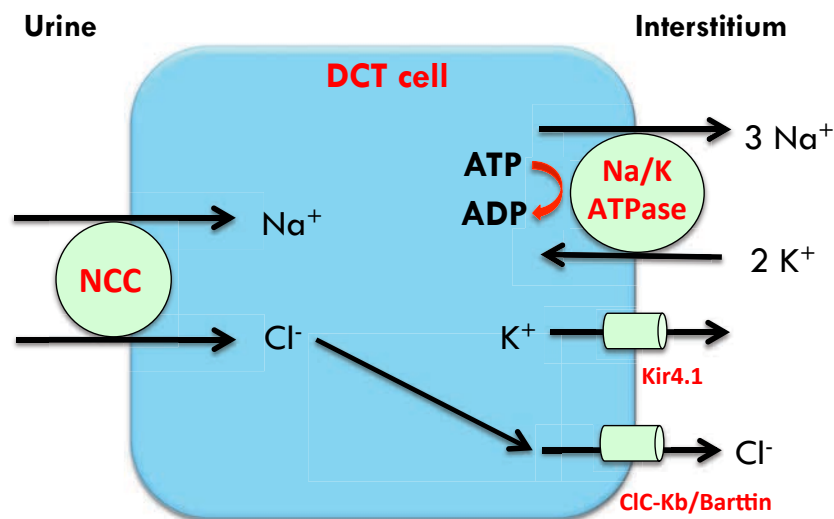


Figure 11 Modèle cellulaire du transport de sodium, chlore et potassium dans les cellules du DCT

Le tubule contourné distal (DCT), localisé dans le cortex rénal, est composé d'un seul type cellulaire. Le tubule contourné distal réabsorbe 5 à 10 % du Na^+ filtré par le cotransport NaCl NCC. NCC, localisé à la membrane apicale, est sensible aux diurétiques thiazidiques (figure 11). Du côté basolatéral, la Na^+/K^+ -ATPase favorise la réabsorption de sodium par le cotransporteur NCC en maintenant un gradient entrant de sodium. Le chlore sort passivement par le canal ClC-Kb basolatéral. Le DCT, imperméable à l'eau, en réabsorbant du NaCl , contribue aussi à la diminution de l'osmolalité urinaire. Du côté basolatéral, le DCT exprime un canal potassium permettant la sortie de K^+ de la cellule vers l'interstitium. (Ito et al., 1996) Le rôle de ce canal n'est pas encore bien connu. Cependant en 2009, deux équipes ont montré que les patients possédant une mutation de ce canal présentent une perte de sel dans les urines, une hypokaliémie, une alcalose métabolique et une hypomagnésémie. (Scholl et al., 2009) (Bockenhauer et al., 2009). Les symptômes de cette maladie sont proches d'une autre pathologie appelée syndrome de Gitelman où le transport de NaCl par le cotransporteur NCC est diminué.

Le cotransporteur NCC et le syndrome de Gitelman

Structure de NCC et sa régulation

Le cotransporteur NCC est codé par le gène SLC12A3 (Gamba et al., 1994) et appartient à la même famille SCL12A que le cotransporteur NKCC2. NCC forme et fonctionne en tant qu'homodimère. Le transporteur possède 12 domaines transmembranaires, 6 boucles extracellulaires et 5 boucles intracellulaires. Les domaines N et C-terminales sont intracytoplasmiques (figure 12). Dans le rein, NCC est strictement exprimé dans le DCT (de Jong et al., 2003).

Régulation de NCC par l'aldostérone et l'angiotensine II

Le rôle de NCC dans la régulation de la balance du sodium a été particulièrement étudié. Ainsi il a été proposé que NCC puisse être régulé par le système rénine angiotensine-aldostérone (RAAS). Aujourd'hui encore, les mécanismes moléculaires de la régulation de NCC ne sont pas encore complètement élucidés. Cependant plusieurs études montrent que l'aldostérone stimule la réabsorption de Na^+ sensible aux diurétiques thiazidiques dans le DCT (Velazquez, Bartiss, Bernstein, & Ellison, 1996) (Rozansky et al., 2009). L'augmentation de la réabsorption de NaCl a rapidement été attribuée à l'augmentation de l'expression de NCC dans le DCT induite par l'injection d'aldostérone (G. H. Kim et al., 1998)

Le second facteur du RAAS ayant un effet sur NCC est l'angiotensine II. Dans le DCT, l'injection d'angiotensine II stimule la présence de NCC à la membrane apicale des cellules du DCT (Sandberg, Riquier, Pihakaski-Maunsbach, McDonough, & Maunsbach, 2007). Cependant, l'injection d'angiotensine II stimule aussi la production d'aldostérone par les glandes corticosurrénales (Haning, Tait, & Tait, 1970). On peut donc penser que l'action de l'angiotensine II sur NCC passait par l'intermédiaire de

l'aldostérone. Néanmoins, les travaux de Van der Lubbe et al. ont montré, sur des rats surrénalectomisés et injectés en angiotensine II, que cette hormone peut stimuler directement l'expression et l'activité de NCC (van der Lubbe et al., 2012). Les conclusions de cette étude sont que l'aldostérone et l'angiotensine II peuvent agir sur l'activité de NCC indépendamment l'une de l'autre. De plus, en présence des deux hormones, la stimulation de NCC est d'autant plus importante.

Régulation de NCC par phosphorylation/déphosphorylation et dégradation

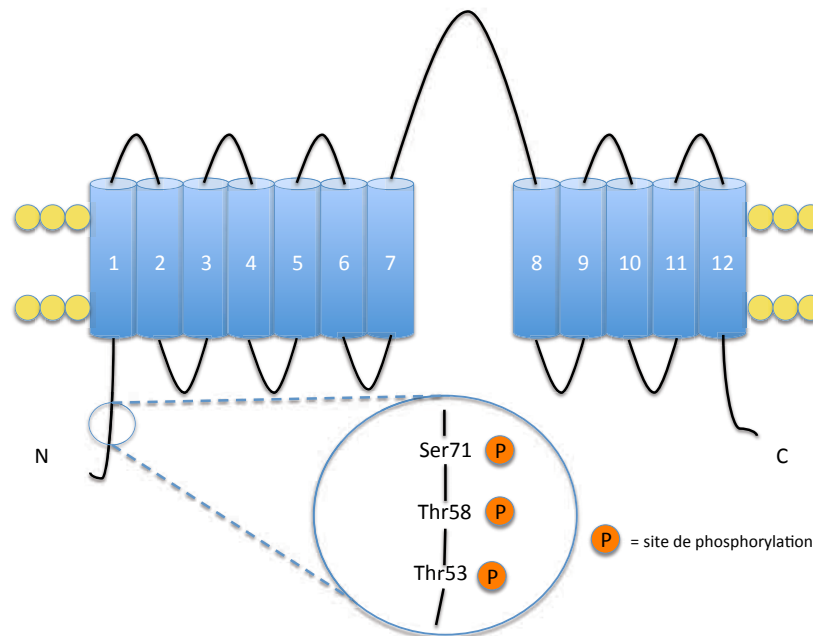


Figure 12 Schéma représentatif de la structure du cotransporteur sodium/chlore NCC et ces sites de phosphorylations

La phosphorylation de NCC est la clé de l'activation du transporteur. Il existe plusieurs sites de phosphorylation près de l'extrémité N-terminale dont la serine 71, la thréonine 53 et la thréonine 58 (figure 12). Leur phosphorylation est nécessaire à la translocation à la membrane apicale, la stabilisation et l'activation de NCC. (Pacheco-Alvarez et al., 2006) (S. S. Yang et al., 2010). L'activation du cotransporteur nécessite donc des interactions avec des kinases. La kinase SPAK (pour STE20/SPS1-related

Proline/Alanine-rich Kinase) est connue pour interagir et phosphoryler directement NCC et sa présence est importante pour la phosphorylation/activation de NCC (Moriguchi et al., 2005) (S. S. Yang et al., 2010). Les kinases de la famille WNK (pour With No Lysine (K)) ont aussi été montrées comme jouant un rôle déterminant dans la phosphorylation de NCC (Wilson et al., 2001). De plus, des interactions existent entre les kinase WNKs et SPAK.

Ainsi, l'activité de NCC est dépendante de sa localisation à la membrane et peut donc être diminuée s'il y a une augmentation de sa dégradation. Arroyo et al. ont montré que le complexe E3 ubiquitine ligase Nedd4-2 était capable d'interagir avec NCC et de stimuler sa dégradation par le protéasome (Arroyo et al., 2011). Cette interaction peut être inhibée par la phosphorylation de Nedd4-2 par la kinase SGK1 (pour Serum and Glucocorticoid-induced Kinase 1) elle-même activée en présence d'aldostérone. L'aldostérone joue donc une double action stimulatrice de l'activité en augmentant la phosphorylation de NCC et en inhibant sa dégradation.

Le syndrome de Gitelman

Le syndrome de Gitelman, une maladie autosomique récessive caractérisée par pression artérielle normale ou diminuée, un hyperaldostéronisme secondaire à la contraction volémique, une alcalose métabolique avec hypokaliémie, une hypomagnésémie et une faible excrétion de calcium (Gitelman, Graham, & Welt, 1966). La prévalence de la maladie est de 1/40000 et contrairement au syndrome de Bartter, les patients atteints du syndrome de Gitelman sont généralement asymptomatiques dans la période néonatale. Le syndrome de Gitelman est dû à une mutation inactivatrice du gène SLC12A3 codant pour NCC. (Simon, Nelson-Williams, et al., 1996). La présence d'une mutation est détectée chez 80% des patients (Balavoine et al., 2011). La perte de

réabsorption de NaCl induit une diminution du volume vasculaire conduisant à une augmentation de la sécrétion de rénine et d'aldostérone, une augmentation de l'expression du canal ENaC et une perte de potassium causée par la suractivation de ROMK dans le canal collecteur. (Graziani et al., 2010) (Loffing et al., 2004). Enfin, le syndrome de Gitelman est l'image miroir du PHAII où le cotransporteur NCC est suractivé (Lalioi et al., 2006).

d) Le tubule connecteur et le canal collecteur

Le tubule connecteur (CNT) est situé entre le tubule contourné distal et le canal collecteur (CD). Le canal collecteur a une structure rectiligne partant du cortex (CCD) jusqu'à la médulla (OMCD et IMCD). Le CNT et le CD sont constitués de plusieurs types cellulaires, les cellules principales et les cellules intercalaires. Il existe un troisième type de cellules intercalaires dites non-A non-B représentant plus de la moitié des cellules intercalaires du tubule connecteur chez la souris (Teng-umnuay, Verlander, Yuan, Tisher, & Madsen, 1996). Ces cellules présentent à leur surface des marqueurs à la fois des cellules α -intercalaires et β -intercalaires et aucuns des cellules principales. Aujourd'hui, leur fonction physiologique reste inconnue.

Les cellules principales

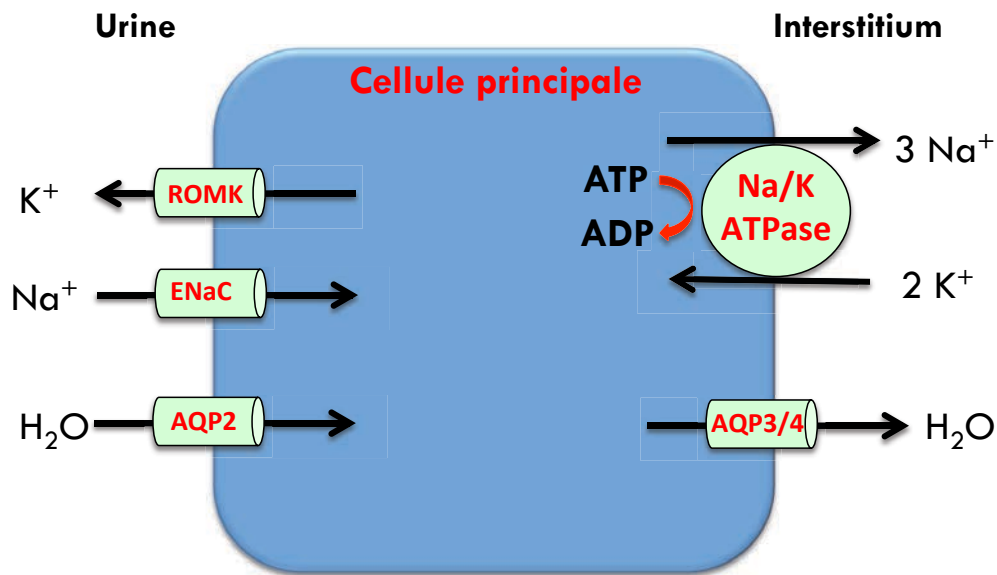


Figure 13 Modèle cellulaire du transport de NaCl et d'eau dans les cellules principale du canal collecteur

Le canal épithélial sodique ENaC exprimé dans les cellules principales est responsable de la réabsorption de 3 à 5 % du Na^+ filtré. A leur surface apicale, les cellules principales expriment deux canaux, le canal ENaC sensible à l'amiloride (Garty, 1994) permettant la réabsorption de sodium et le canal ROMK permettant la sécrétion de potassium (figure 13). Comme NCC et NKCC2, l'activité de ces deux canaux est directement liée à l'activité de la pompe Na^+/K^+ -ATPase située au pôle basolatéral. L'activité de transport de Na^+ du canal ENaC génère un voltage transépithélial négatif qui favorise la sortie des ions K^+ de la cellule vers la lumière tubulaire par le canal ROMK. (Frindt & Palmer, 1989). Les cellules principales ne sont pas impliquées dans le transport transépithélial de Cl^- mais la génération du voltage transépithélial négatif favoriserait aussi le transport passif paracellulaire de chlore au travers des jonctions serrées. (Sansom, Weinman, & O'Neil, 1984). Cependant ce transport paracellulaire n'est pas systématiquement observé dans toutes les études. Par exemple, notre équipe a observé que l'inhibition du canal ENaC, par l'utilisation de son inhibiteur spécifique l'amiloride, sur des canaux collecteurs isolés et microperfusés de souris en régime sans NaCl n'a

aucun effet sur la réabsorption transépithéliale des ions Cl^- . (Levi et al., 2010). Par contre, le transport de chlore est diminuée de 50% dans des CCDs isolés et microperfusés provenant de rats traités au déoxycorticosterone pivalate (DOCP), un analogue de l'aldostérone, en présence de vasopressine et d'amiloride (Terada & Knepper, 1990).

Les cellules principales sont aussi capables de réabsorber de l'eau par les canaux à eau (AQP2) exprimés au pôle apical (Fushimi et al., 1993), et AQP3 (Ecelbarger et al., 1995) et AQP4 (Terris, Ecelbarger, Marples, Knepper, & Nielsen, 1995) exprimés au pôle basolatéral. La régulation de la réabsorption transépithéliale d'eau par AQP2 est médiée par l'hormone antidiurétique (ADH). L'ADH, par son récepteur V2 basolatéral, augmente à la fois la translocation du canal AQP2 à la membrane apicale (Nielsen et al., 1995) et son expression (DiGiovanni, Nielsen, Christensen, & Knepper, 1994) .

Le canal sodium épithélial (ENaC)

Structure et généralité

Le canal ENaC est un canal faisant partie de la famille des Degerin/Epithelial Na^+ channel (DEG/ENaC). Le canal est exprimé dans plusieurs épithéliums tels que les alvéoles pulmonaires, le colon distal, les glandes sudoripares et salivaires. Dans le rein, le canal ENaC est présent de la fin du DCT jusqu'au canal collecteur médullaire interne. La sélectivité d'ENaC pour le sodium est importante par rapport au potassium et son ouverture est modulée par la concentration en calcium et le pH intracellulaire (Palmer & Frindt, 1987). Les sous-unités du canal ont été identifiées en 1993 et 1994 par l'équipe de Canessa et al. (Canessa, Horisberger, & Rossier, 1993) (Canessa et al., 1994)

Liddle. A l'inverse, des mutations inactivatrices d'ENaC provoquent un pseudohypoaldostérisme de type I (Ludwig, Bidlingmaier, & Reissinger, 2004). Ce phénotype apparaît aussi lorsque le récepteur aux minéralocorticoïdes est muté (Geller et al., 1998). Ces observations ont permis de montrer que le canal ENaC est régulé par l'aldostérone. De plus, d'autres études sur des canaux collecteurs microdisséqués montrent que le transport de sodium par le canal ENaC est stimulé par l'hormone antidiurétique ADH (appelée aussi vasopressine) sécrétée par l'hypophyse. Sous ADH, la synthèse protéique des 3 sous-unités est stimulée. (Schafer, Hawk, 1992)

Régulation de l'activité d'ENaC

Régulation par l'aldostérone

La sécrétion d'aldostérone augmente dans deux conditions, en cas d'hyperkaliémie et en cas d'hypovolémie où le système rénine-angiotensine-aldostérone est activé. L'aldostérone stimule à la fois la transcription et la quantité protéique des trois sous-unités d'ENaC et la Na^+/K^+ -ATPase en se liant au récepteur nucléaire des minéralocorticoïdes (MR) (Masilamani, Kim, Mitchell, Wade, & Knepper, 1999) (Welling, Caplan, Sutters, & Giebisch, 1993). Le cortisol possède la même affinité que l'aldostérone pour le récepteur MR et étant beaucoup plus concentré dans le plasma, l'activation du récepteur MR par l'aldostérone nécessite la présence de la 11 β -hydrostéroïde déshydrogénase de type 2. La 11 β -HSD2 transforme le cortisol en cortisone qui ne peut pas activer le récepteur MR. Chez des souris knock-out 11 β -HSD2, la pression artérielle est sensiblement augmentée ainsi que l'expression des trois sous-unités d'ENaC (Bailey et al., 2008). L'aldostérone stimule aussi l'expression de la kinase SGK1 dans les cellules principales. SGK1 est responsable de la phosphorylation de Nedd4-2 conduisant à une diminution de son

interaction avec le canal ENaC et donc la dégradation du canal (Brickley, Mikosz, Hagan, & Conzen, 2002).

Régulation paracrine

Le néphron distal est soumis à de multiples régulations hormonales. Le déterminant le plus étudié a certainement été l'axe rénine-angiotensine-aldostérone qui représente la boucle de régulation endocrine la plus importante dans la régulation de la balance du sodium et de la pression artérielle. Néanmoins, des travaux plus récents laissent penser que d'autres facteurs locaux ont également une influence importante sur ces régulations.

Les protéases

En 1997, Vallet et al. ont montré que la coexpression dans l'oocyte de xénope de la protéase CAP1 (Channel Activating Protease 1) et d'ENaC augmentait l'activité du canal (V. Vallet, Chraïbi, Gaeggeler, Horisberger, & Rossier, 1997). In vivo, la CAP1 est co-exprimée dans les épithéliums transportant du sodium par le canal ENaC. De cette étude a émergé le concept que le canal ENaC pouvait être clivé et activé par des sérine protéases. Deux ans plus tard, Masilamani et al. ont montré que la sous-unité γ existe sous deux formes de poids moléculaires différents, une forme non clivée à 85kDa et une forme clivée de 70kDa (Masilamani et al., 1999). L'activation d'ENaC par l'aldostérone a été par la suite constamment associée au changement de poids moléculaire de 85 à 70kDa de la sous-unité γ , en accord avec le clivage de la boucle extracellulaire (Ergonul, Frindt, & Palmer, 2006) (Picard et al., 2008). Narikiyo T et al. ont montré que l'aldostérone augmente l'expression de la

prostasine, orthologue humain de CAP1, in vivo et in vitro (Narikiyo et al., 2002) suggérant un lien entre l'aldostérone et l'activation protéolytique d'ENaC dans le rein par la prostasine.

La kallikréine tissulaire (TK), une autre protéase de la famille des sérine protéases, a été montré pour réguler l'activité de ENaC. Cette protéase est produite abondamment par le CNT et sécrétée dans la lumière tubulaire (Figueroa, MacIver, Mackenzie, & Bhoola, 1988). Les membranes des cellules des segments en aval du CNT sont donc exposées à de fortes concentrations de TK. La TK est aussi impliquée dans la génération de la bradykinine. Lorsqu'elle est appliquée du côté basolatérale, la bradykinine est connue pour inactiver le transport de sodium et d'eau (Tomita, Pisano, & Knepper, 1985) (Tomita, Pisano, Burg, & Knepper, 1986). En revanche, cette action n'est pas retrouvée lorsqu'elle est appliquée du côté apical. En 2008, notre équipe a montré que des souris déficientes pour la kallicréine tissulaire présentaient une diminution de l'expression de la forme 70kDa de la sous-unité γ d'ENaC. In vitro, sur des CCD microdisséqués, l'injection luminale de TK a un effet stimulant direct sur la réabsorption de Na^+ par ENaC. D'autre part, l'ajout de kallicréine à une préparation de fraction membranaire rénale de souris invalidées pour la TK restaure le clivage de la sous-unité γ (Picard et al., 2008). Cette étude montre que la TK stimule le clivage de ENaC et son activité lorsqu'elle est présente dans la lumière du tubule, et donc un effet opposé à son action du côté basolatéral via la production de bradykinine. Plus récemment, Patel et al. ont montré que la kallicréine tissulaire stimulait l'activité d'ENaC dans des oocytes de xénope (Patel, Chao, & Palmer, 2012). Dans cette étude, ils montrent aussi que le motif RKRK en position 186 est indispensable au clivage de la sous-unité γ par la TK. Les études sur la souris invalidée pour la TK montrent que leur balance du sodium n'est pas significativement altérée mais qu'en revanche elles sont mal protégées contre l'hyperkaliémie postprandiale. Ces observations suggèrent que l'activation protéolytique de ENaC par la TK n'est pas critique pour la réabsorption de Na^+ mais jouerait plutôt un rôle dans le

maintien de la balance potassique (Meneton et al., 2001) (Picard et al., 2008).

La sous-unité α est elle aussi clivée par des sérine protéases. En 2003, l'équipe de Thomas Kleyman a montré que la sous-unité α est clivée par la furine, une sérine protéase de la famille des proprotéines convertases, permettant la maturation de cette sous-unité (Hughey et al., 2003).

La prostaglandine E2 PGE2

Les prostaglandines sont rapidement dégradées, ce qui limite leur action aux cellules situées dans l'environnement proche de leur lieu de synthèse. La synthèse de la PGE2 nécessite l'action séquentielle de différentes enzymes, la phospholipase A2 qui libère l'acide arachidonique (AA) à partir des glycérophospholipides membranaires, les cycloxygénases (COX-1 ou COX-2), lesquelles convertissent l'AA en prostaglandine H2 (PGH2) puis les prostaglandines E2 synthases (mPGES-1 et 2 et cPGES), qui transforment la PGH2 en PGE2. Les cellules rénales expriment spécifiquement COX-1 ou COX-2, et au moins une des isoformes de PGES. COX-1 est hautement exprimée dans les cellules principales des canaux collecteurs corticaux et médullaires et COX-2 est exprimée de façon prédominante par les cellules de la macula densa et les cellules interstitielles de la médullaire. La mPGES-1 est principalement exprimée dans les cellules principales des canaux collecteurs et les cellules de la macula densa et plus faiblement dans les cellules interstitielles (Fuson, Komlosi, Unlap, Bell, & Peti-Peterdi, 2003). La mPGES-2 a été mise en évidence dans les cellules intercalaires (G. Yang et al., 2006). La mPGES-1 est fonctionnellement couplée à COX-2 alors que la mPGES-2 peut fonctionner indifféremment avec COX-1 et COX-2 (Murakami et al., 2000) (Murakami et al., 2003). COX-1 est exprimée de façon constitutive tandis que COX-2 est une enzyme inductible. Bien qu'elle ne soit pas constitutivement exprimée dans le canal collecteur, son expression est induite en réponse à un choc osmotique (T. Yang et al., 2005).

Le canal collecteur cortical produit une quantité importante de prostaglandines (PG), plus particulièrement la prostaglandine E2 (PGE₂). Les cellules principales expriment trois récepteurs des PGE₂ (EP1, EP3 et EP4) (Breyer & Breyer, 2000). L'activation de ces récepteurs modulent le transport de Na⁺ et d'eau par les cellules principales. La PGE₂ est capable d'inhiber à la fois la réabsorption de sel et d'eau. L'activation du récepteur basolatéral EP1 induit une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire diminuant la réabsorption de Na⁺ dans le CCD (Guan et al., 1998). L'activation du récepteur EP3, aussi exprimé à la membrane basolatérale, provoque une diminution de l'expression du canal AQP2 (Hebert, Jacobson, Fredin, & Breyer, 1993). L'activation du récepteur EP3 inhibe l'adénylate cyclase et la production d'AMP cyclique. La protéine kinase A (PKA), dépendante du niveau d'AMPc, est impliquée dans la phosphorylation et la translocation des canaux AQP2 à la membrane apicale. Le récepteur EP4 est, quant à lui, exprimé uniquement à la surface apicale des cellules principales (Jensen, Stubbe, Hansen, Andreassen, & Skott, 2001). Les effets de son activation sur le transport de Na⁺ ne sont pas encore connus aujourd'hui.

Une augmentation de l'excrétion urinaire de PGE₂ est d'ailleurs souvent associée aux néphropathies avec perte de sel et d'eau (Hao & Breyer, 2008). La production de PGE₂ dans le rein est stimulée par une variété de facteurs comme un régime riche en NaCl (Chen et al., 2008) et une augmentation du débit urinaire (Flores, Liu, Liu, Satlin, & Rohatgi, 2012). La sécrétion luminale de PGE₂, sur des cultures cellulaires de CCD, provoque une augmentation de la production d'AMPc (Garcia-Perez & Smith, 1984) (Sakairi, Jacobson, Noland, & Breyer, 1995). De plus, Ando et al. ont montré sur des CCD microdisséqués que la PGE₂ luminale diminuait le transport de Na⁺ et augmentait la perméabilité à l'eau (Ando & Asano, 1995). Ainsi les transports de sodium et d'eau sont modulés par la PGE₂ à la fois du côté basolatéral et apical.

Enfin, la PGE₂ est connue pour avoir un effet vasodilatateur (Kitamura, Suzuki, & Kuriyama, 1976). La production de PGE₂ dans le rein est

stimulée par la vasopressine, et l'angiotensine II (Zusman & Keiser, 1977). La vasopressine et l'angiotensine II ayant des propriétés vasoconstrictrices, la production de PGE₂ permettrait de modérer l'action de ces hormones.

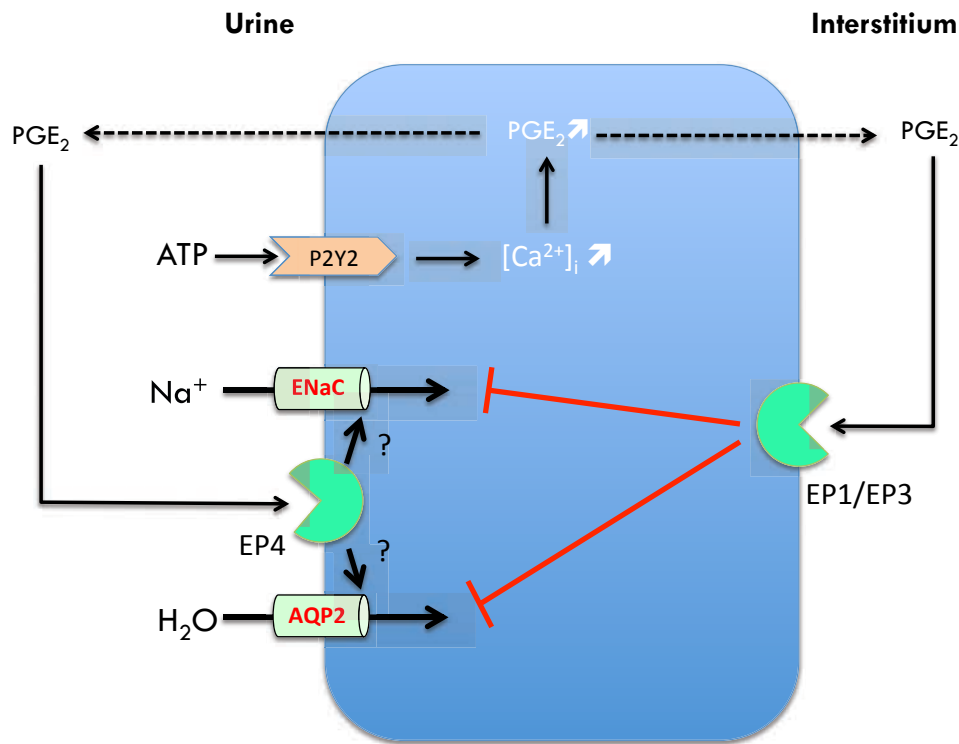


Figure 15 Représentation de la régulation paracrine par la PGE₂ et l'ATP du transport de sodium et d'eau par la cellule principale

L'adénosine tri-phosphate (ATP)

L'ATP est un autre facteur paracrine capable de réguler la réabsorption tubulaire de NaCl et d'eau. L'ATP est un ligand des récepteurs purinergiques P2. Le récepteur P2Y2 est le principal récepteur P2 exprimé à la membrane apicale des cellules principales. C'est aussi le plus étudié. L'activation du récepteur P2Y2 provoque l'inhibition du canal ENaC (Pochynyuk et al., 2008) ainsi qu'une diminution de l'expression membranaire de l'AQP2 (Wildman et al., 2009). La disponibilité des souris knockout pour P2Y2 ont permis de comprendre l'importance du récepteur

dans la régulation du transport du canal ENaC. Les souris knock-out pour P2Y2 ont une excrétion urinaire anormale de Na^+ , une augmentation de la pression artérielle et en conséquence un niveau d'aldostérone et de rénine et une concentration potassique plasmatique basses. (Rieg et al., 2007)

La libération d'ATP par le canal collecteur

Les études sur plusieurs organes suggèrent que les connexines, qui sont des composants des « gap junctions », sont capables de s'associer et de former canaux à ATP (Ebihara, 2003) (Evans, De Vuyst, & Leybaert, 2006). Dans le rein de souris, McCulloch et al. ont localisé la connexine 30 uniquement au niveau de la membrane apicale des cellules intercalaires du canal collecteur cortical et non pas au niveau des jonctions intercellulaires (McCulloch, Chambrey, Eladari, & Peti-Peterdi, 2005). Dans cette même étude, ils ont aussi montré que l'expression de la connexine 30 est stimulée par un régime riche en NaCl. Grâce à des souris déficientes en connexine 30 ($\text{Cx30}^{-/-}$), Sipos et al. ont démontré que les hémicanaux de connexines 30 jouaient un rôle essentiel dans la sécrétion d'ATP par le canal collecteur et donc dans la contrôle par l'ATP de la réabsorption d'électrolytes et d'eau (Sipos et al., 2009). Un régime riche en NaCl augmente la sécrétion urinaire d'ATP et les études chez la souris $\text{Cx30}^{-/-}$ démontrent que la sécrétion d'ATP urinaire est plus basse et moins sensible aux apports en NaCl. Les mesures de l'activité d'ENaC montrent que les souris $\text{Cx30}^{-/-}$ perdent leur capacité à inhiber le canal et cette perte contribue au développement d'une hypertension en régime riche en sel. Enfin, en terme de régulation d'ENaC, la perte de la connexine 30 semble équivalente à la perte du récepteur P2Y2 (Rieg et al., 2007) (Pochynyuk et al., 2008) (Pochynyuk et al., 2010).

En plus d'avoir tous les deux un effet d'inhibition sur l'activité d'ENaC, il a été montré dans différents modèles de cellules que la sécrétion d'ATP et de PGE_2 sont liées. L'activation du récepteur P2Y2 par l'ATP induit une augmentation de la concentration du calcium

intracellulaire provoquant une augmentation de la production de PGE_2 par le canal collecteur (Welch, Carlson, Shi, Myatt, & Kishore, 2003).

L'ensemble de ces études montre que la régulation paracrine dans le canal collecteur joue un rôle important dans le maintien de la balance du sodium et de la pression artérielle.

Le paradoxe aldostérone

Le néphron distal et plus précisément l'activité et l'expression des transporteurs de Na^+ , de Cl^- et de K^+ tels que NCC, NKCC2, ENaC et ROMK sont sensibles à l'aldostérone. La sécrétion d'aldostérone est stimulée sous deux conditions :

- En cas d'hyperkaliémie, les glandes surrénales sécrètent de l'aldostérone afin de faire augmenter la sécrétion de potassium mais sans modifier la réabsorption de sodium.
- Dans le cas d'une hypovolémie, système rénine-angiotensine-aldostérone est activée. La production d'aldostérone augmente aussi mais elle stimule la réabsorption de sodium sans que l'excrétion de potassium ne varie.

Ainsi l'augmentation d'aldostérone peut avoir deux effets opposés : on appelle ce phénomène le paradoxe de l'aldostérone. Aujourd'hui, les différents mécanismes mis en jeu amenant le néphron distal à favoriser la réabsorption de sodium plutôt que la sécrétion de potassium (ou l'inverse) ne sont pas clairs. L'hypothèse proposée pour expliquer ce paradoxe serait la présence, dans le cas de l'hypovolémie, ou en absence, en hypokaliémie, de l'angiotensine II en même temps que l'aldostérone.

Le syndrome de Liddle et Le pseudohypoaldostérisme type 1 (PHAI)

Le syndrome de Liddle est une forme autosomale dominante d'hypertension caractérisée par une hypokaliémie, une alcalose métaboliques et des niveaux faibles du taux de rénine et d'aldostérone. Cette maladie est la conséquence d'une mutation gain de fonction sur la partie C-terminale des sous-unités β et γ du canal ENaC. (Warnock, 2001). La première mutation responsable du symptôme a été découverte en 1994 sur la sous-unité β , cette mutation introduit un codon stop, réduisant la partie C-terminale de la sous-unité (Shimkets et al., 1994). Depuis, plusieurs autres mutations conduisant à un décalage du cadre de lecture ou à une forme tronquée des sous-unités β et γ ont été identifiées (K. Q. Yang, Xiao, Tian, Gao, & Zhou, 2014). L'ensemble de ces mutations conduisent à une suractivation du canal ENaC soit par une altération ou une perte du domaine PY permettant la fixation de Nedd4-2 et sa dégradation, soit par une modification de la structure du canal augmentant la probabilité d'ouverture du canal (Hiltunen et al., 2002).

Le pseudohypoaldostérisme type 1 (PHAI) est une forme sévère de résistance primaire aux minéralocorticoïdes caractérisée par une atteinte systémique et une perte de sel au niveau de nombreux organes. Les patients PHAI présente une hyperkaliémie sévère associée à des taux plasmatiques d'aldostérone et de rénine élevés. Le PHAI fut en premier décrit en 1958 chez un enfant présentant des épisodes récurrents de déplétion volumique et d'hyperkaliémie (Cheek & Perry, 1958). En 1996, Chang et al. ont montré que la forme autosomique récessive est due à des mutations des sous-unités du canal ENaC (Chang et al., 1996) alors que la forme autosomique dominante est liée à des mutations du récepteur MR (Pujo et al., 2007).

Les cellules intercalaires

Les cellules intercalaires sont de deux types, les cellules α -intercalaires et β -intercalaires. (Teng-umnuay et al., 1996) Les cellules intercalaires sont classiquement impliquées dans la régulation de l'état acide-base. Toutefois, de récentes études remettent en question ce modèle : les cellules intercalaires sont aussi impliquées dans la régulation de la balance du potassium et du sodium.

Les cellules α -intercalaires

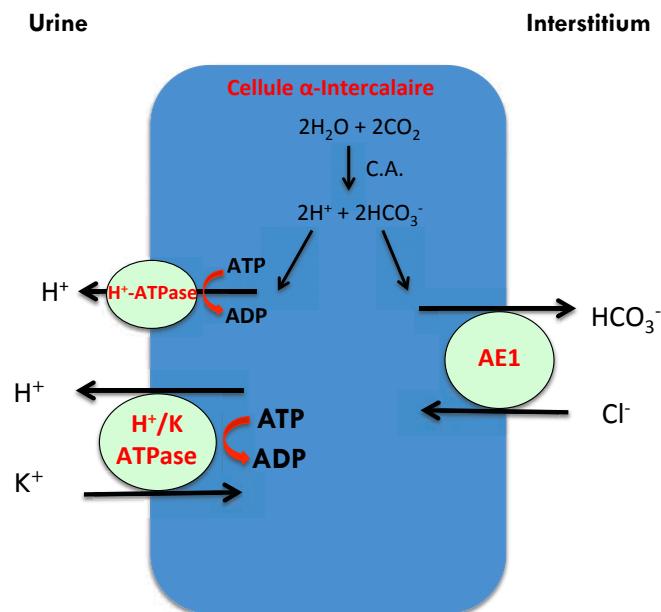


Figure 16 Modèle cellulaire du transport ionique dans les cellules α -intercalaires

Les cellules α -intercalaires sécrètent des protons dans la lumière tubulaire. Elles présentent du côté apical la pompe à proton H^+-ATPase et du côté basolatéral l'échangeur chlore/bicarbonate AE1 . Les protons

généralisés par d'hydratation de CO_2 dans les cellules sont transportés à travers la membrane apicale dans la lumière tubulaire via la H^+ -ATPase tandis que les ions bicarbonates sont transportés à travers la membrane basolatérale via AE1. Au cours d'une acidose métabolique, la H^+ -ATPase est activée, ce qui augmente la sécrétion d'ions H^+ dans le fluide urinaire et limite l'acidose. (Bastani, Purcell, Hemken, Trigg, & Gluck, 1991)

Une partie de la sécrétion luminale de proton est effectuée par une H^+/K^+ -ATPase qui permet la réabsorption de K^+ lors d'une déplétion potassique. (Morgan, Supuran, & Casey, 2004).

Les cellules β -intercalaires

Les cellules β -intercalaires présentent une polarité opposée à celle des cellules α -intercalaires. Elles présentent du côté apical un échangeur $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ et du côté basolatéral la pompe à proton H^+ -ATPase. Ces cellules sont impliquées dans la sécrétion des ions bicarbonates. Les travaux de Royaux et al. ont permis d'identifier la pendrine, le produit du gène *SLC26A4*, comme l'échangeur $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ apical des cellules β -intercalaires du canal collecteur et non-A non-B du tubule connecteur. (Royaux et al., 2001). Cette étude montre également que les canaux collecteurs des souris knock-out pour la pendrine ne sont pas capables de sécréter des bicarbonates en réponse à une alcalose métabolique induite par l'administration de DOCP associée à une charge en NaHCO_3 . L'expression de la pendrine est régulée de façon appropriée lors de modifications de l'état acido-basique. Lors d'une acidose métabolique ou respiratoire, son expression est fortement diminuée (de Seigneux et al., 2007). Inversement, en réponse à une charge alcaline, son expression est augmentée (Wagner et al., 2002).

Pendrine et transport transcellulaire de chlore

Les cellules intercalaires β -intercalaires sont également impliquées dans le transport transépithélial de Cl^- dans le canal collecteur qui s'effectuerait par l'échangeur d'anion $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ apical et un canal chlore basolatéral. Le canal chlorure basolatéral, ClC-K , associé à la Barttin, son cofacteur, permet le passage de chlore de la cellule vers l'interstitium. (Estevez et al., 2001). Des études sur des CCDs isolés et microperfusés ont permis de montrer que l'invalidation du gène codant pour la pendrine abolissait complètement l'absorption transépithéliale de chlore dans le canal collecteur (Wall et al., 2004). Inversement, la réabsorption de Cl^- dans le canal collecteur était augmentée chez les souris qui surexpriment la pendrine dans les cellules intercalaires (Jacques et al., 2013). Quentin et al. et Vallet et al. ont montré que l'expression de la pendrine était principalement régulée par la balance en chlorure; son expression étant inversement corrélée à la charge en Cl^- , ce qui est en accord avec un rôle de la pendrine dans l'adaptation du transport de Cl^- aux besoins de l'organisme (Quentin et al., 2004) (M. Vallet et al., 2006). L'ensemble de ces études montre donc clairement que la pendrine joue un double rôle à la fois dans la régulation de l'état acide base mais aussi dans la réabsorption de chlore à travers la cellule β -intercalaire.

Pendrine et pression artérielle

Plus récemment, il a été montré que les souris knock-out pour la pendrine sont protégées de l'hypertension induite par l'administration de minéralocorticoïdes associés à un régime riche en NaCl (Verlander et al., 2003). Dans des conditions standards, les souris invalidées pour la pendrine ne présentent pas de phénotype rénal majeur mais, lors d'une déplétion en NaCl, elles développent une déplétion volémique et une hypotension (Wall et al., 2004). Inversement, des souris surexprimant la pendrine dans les cellules intercalaires développent une hypertension en réponse à une charge en NaCl (Jacques et al., 2013) due à une rétention rénale de NaCl et une augmentation des volumes vasculaires. Lorsque la

charge alimentaire en Na^+ était administrée, non plus sous forme de sel de Cl^- mais sous forme de sel de HCO_3^- , les souris transgéniques ne développaient plus d'hypertension. Ces études montrent ainsi que la pendrine a un rôle majeur dans le contrôle de la réabsorption de NaCl , et donc de la pression artérielle.

Régulation de la pendrine

Aujourd'hui, plusieurs effecteurs sont connus pour moduler l'activité de la pendrine. Verlander et al. ont mis en évidence que la pendrine est régulée positivement par l'aldostérone. Ils ont observé que chez des souris traitées au DOCP il y a augmentation à la fois des ARNm codant pour la pendrine, de l'abondance protéique et de la translocation à la membrane apicale de la pendrine (Verlander et al., 2003). Cependant, l'aldostérone administrée *in vivo* est un modèle bien établi d'alcalose métabolique hypokaliémique. Or, il a aussi été montré que l'expression de la pendrine est augmentée en réponse à une alcalose métabolique (Frische, Kwon, Frokiaer, Madsen, & Nielsen, 2003). Ainsi, le DOCP pourrait réguler positivement la pendrine indirectement par l'alcalose métabolique. La restriction en NaCl et l'angiotensine II par l'activation du récepteur ATR1 induisent aussi la translocation de la pendrine à la membrane apicale (Quentin et al., 2004) (Pech, Zheng, Pham, Verlander, & Wall, 2008). Dans un modèle de cellules en culture exprimant la pendrine, Azroyan et al. ont montré que la voie AMPc/PKA augmentait l'expression de la pendrine à la membrane plasmique et son activité (Azroyan et al., 2012). De plus, sur des CCDs isolés et microperfusés, ils ont observé une augmentation de l'activité de la pendrine en présence d'un agoniste du récepteur β -adrénergique (isoproterenol). *In vitro*, par la génération de plusieurs mutants, cette équipe a aussi montré que la phosphorylation de la serine 49 augmente la translocation de la pendrine à la membrane. Un autre site de phosphorylation par la PKA, la thréonine 171, a été identifié par Pesce et al. comme nécessaire à la translocation membranaire de la

pendrine (Pesce et al., 2012). En 2013, l'équipe de Lifton découvre que la déphosphorylation du récepteur MR dans les cellules β -intercalaires est nécessaire à l'activation de la pendrine par l'aldostérone et que l'angiotensine II favorise la déphosphorylation du récepteur (Shibata, Zhang, Puthumana, Stone, & Lifton, 2013). A l'inverse un régime riche en potassium favorise la phosphorylation du récepteur. L'activation du récepteur MR est donc adaptable en fonction d'une déplétion volémique ou d'une hyperkaliémie. Cependant, les cellules intercalaires ne semblent pas exprimer, ou très faiblement, la 11β -HSD2 (Ackermann et al., 2010). Cette absence de l'enzyme nous interroge donc sur les mécanismes permettant l'activation de la pendrine en réponse à l'augmentation d'aldostérone.

Relation entre la pendrine et le canal ENaC

Les souris invalidées pour la pendrine ont une capacité rénale à réabsorber du NaCl diminuée lors de la restriction en NaCl, une déplétion volémique et une pression artérielle basse. Kim et al. ont montré une diminution de l'expression de ENaC et de son activité chez ces souris, ce qui suggère que même si la pendrine et ENaC sont exprimés dans deux types cellulaires différents, ils fonctionnent de manière coordonnée (Y. H. Kim et al., 2007). Par la suite, Pech et al. ont suggéré que les ions HCO_3^- du fluide tubulaire régulent l'activité du canal ENaC (Pech et al., 2010).

Identification d'un nouveau système de transport de NaCl Pendrine/NDCBE dans les cellules β -intercalaires du canal collecteur

En 2010, Leviel et al. ont identifié une nouvelle voie de réabsorption de NaCl dans le canal collecteur cortical isolé à partir de rein de souris déplétée en NaCl (Leviel et al., 2010). L'utilisation combinée d'hydrochlorothiazide (HCTZ) et d'amiloride sur des CCDs isolés et microperfusés a permis de démontrer que ce transport est insensible à

l'amiloride et sensible aux diurétiques thiazidiques. Ce système de transport de NaCl est encore détectable dans les canaux collecteurs des souris knockout pour ENaC déplétée en NaCl et chez des souris knock-out pour NCC. L'injection de diurétiques thiazidiques chez des souris knock-out pour NCC a permis de mettre en évidence que ce transport participe à la réabsorption rénale de NaCl. Les acteurs de ce transport restaient alors à être identifiés. Les expériences de microperfusion de CCD isolé montrent qu'il existe, dans la membrane apicale des cellules intercalaires au coté de la pendrine, un échangeur $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ indépendant du Na^+ , un autre échangeur apical $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ dont l'activité dépend du Na^+ . Il a été proposé que l'action coordonnée de ces deux échangeurs $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ dans la membrane apicale des cellules β -intercalaires rendent compte du transport de NaCl électroneutre observé dans les canaux collecteurs.

Identification moléculaire de l'échangeur $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ dépendant du Na^+

Alors que de nombreux transporteurs de bicarbonate ont été identifiés dans le rein de mammifères, seuls l'échangeur NDCBE (pour Na^+ -driven $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ Exchanger) est capable de réaliser un transport de HCO_3^- dépendant du Na^+ et du Cl^- . (Parker et al., 2008) (Grichtchenko et al., 2001) (Damkier, Aalkjaer, & Praetorius, 2010). Boron et al. ont été les premiers à cloner et caractériser l'échangeur NDCBE (Virkki, Choi, Davis, & Boron, 2003). L'échangeur NDCBE codé par le gène *SCL4A8* permet l'échange électroneutre d'un ion Cl^- intracellulaire contre 1 ion Na^+ et 2 ions HCO_3^- (Grichtchenko et al., 2001). Il est fortement exprimé dans le cerveau où il joue un rôle important dans le maintien du pH intracellulaire (Sinning et al., 2011).

C'est grâce à l'utilisation de souris knock-out pour NDCBE en régime que Leviel et al. ont pu montrer que NDCBE était un acteur de la réabsorption de NaCl électroneutre (Leviel et al., 2010). Chez ces souris ko, en régime déplété en NaCl, les expériences de microperfusion de CCD montrent que

le transport de NaCl insensible à l'amiloride est inexistant comparé aux souris sauvages.

La réabsorption de NaCl par le système Ndcbe/pendrine est dépendante de l'activité de la pompe H^+ -ATPase basolatérale

Les cellules intercalaires ont la particularité d'exprimer très faiblement la pompe Na^+/K^+ -ATPase, le moteur énergétique des cellules des organismes supérieurs. Chambrey et al. ont mesuré le flux transépithélial de NaCl en présence d'amiloride sur des CCD perfusés isolés de rein de souris soumises à un régime sans NaCl et montré que ce flux était inhibé par l'ajout, coté basolatéral, de bafilomycine, un inhibiteur spécifique de la pompe H^+ -ATPase mais persistait en présence de ouabaine, un inhibiteur de la Na^+/K^+ -ATPase. La réabsorption de Na^+ à travers les cellules principales étant dépendante de l'activité de la pompe Na^+/K^+ -ATPase, l'efficacité de la ouabaine a été contrôlée en vérifiant qu'une partie des flux de Na^+ en l'absence d'amiloride était bien inhiber par la ouabaine. Cette étude a permis de montrer que le système NDCBE/Pendrine était non pas dépendante de la Na^+/K^+ -ATPase mais de la pompe H^+ -ATPase basolatérale (Chambrey et al., 2013).

Identification des mécanismes de transport responsables de la sortie basolatérale de Na^+ dans les cellules intercalaires

L'échangeur Ae4, codé par le gène SCL4A9 est spécifiquement exprimé à la membrane basolatérale des cellules β -intercalaires (Hentschke, Hentschke, Borgmeyer, Hubner, & Kurth, 2009). Les caractéristiques de transport de Ae4 étaient dans une certaine mesure controversées. Bien qu'il ait d'abord été décrit comme un échangeur chlore/bicarbonate, il partage plus de similarités avec les cotransporteurs de sodium/bicarbonate, NBCe1 et NBCe2, qu'avec les échangeurs d'anions de la superfamille des SLC4. (Lipovich, Lynch, Lee, & King, 2001)

(Romero, Fulton, & Boron, 2004). En 2013, notre équipe a démontré, par des expériences réalisées sur des CCDs microperfusés de souris sauvages et knock-out pour Ae4, que cet échangeur assure une activité de transport de sodium et de bicarbonate à travers la membrane basolatérale de la cellule vers l'interstitium (Chambrey et al., 2013). De plus, aucun transport de NaCl insensible à l'amiloride n'est détectable dans les CCDs des souris knock-out pour AE4 déplétées en NaCl.

L'ensemble de ces travaux a permis de proposer le modèle représenté figure 17.

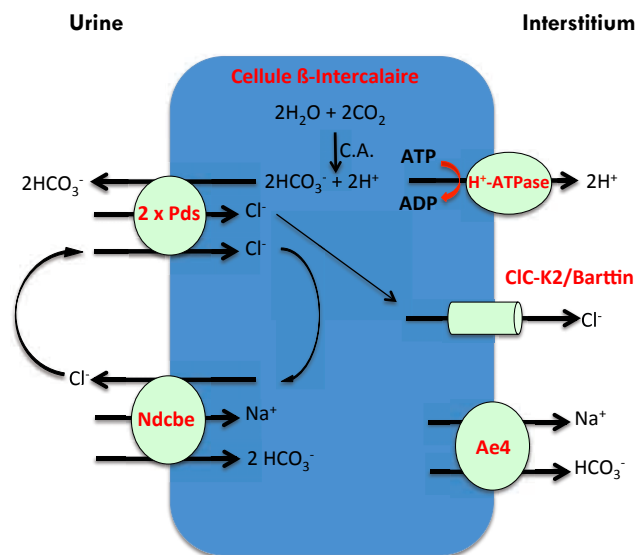


Figure 17 Modèle cellulaire du transport ionique dans les cellules β -intercalaires

Dans des conditions standard, la réabsorption de NaCl semble être effectuée par le tubule connecteur plutôt que par le canal collecteur (Christensen et al., 2010). Le transport de NaCl électroneutre sensible aux diurétiques thiazidiques dans le canal collecteur est mesurable en réponse à une déplétion en NaCl ou à l'administration de minéralocorticoïdes (Leviel et al., 2010), ce qui suggère qu'il puisse jouer un rôle important dans la régulation de la balance du sodium. De façon intéressante, ce système de transport est également activé chez les souris

knock-out pour NCC même dans des conditions normales (Leviel et al., 2010), ce qui est en accord avec l'augmentation de l'expression de la pendrine (M. Vallet et al., 2006) et l'augmentation transitoire de l'excrétion urinaire de Na⁺ suite à une injection unique de HCTZ chez ces souris. La voie de réabsorption électroneutre de NaCl dans le canal collecteur semble aussi compenser la perte de réabsorption de NaCl due à l'inactivation de NCC.

3) Les diurétiques

Les diurétiques ont été utilisés dès les années 50 pour le traitement de l'hypertension, soit bien avant de connaître précisément leur cible dans le rein. Ce n'est que par la suite, par l'analyse génomique des patients présentant des pathologies rénales ayant les mêmes symptômes que les personnes utilisant les diurétiques ou n'ayant que peu de sensibilité à certaines classes de diurétique, que l'on a pu réellement définir les transporteurs cibles le long du néphron. Les diurétiques sont des substances permettant l'augmentation de l'excrétion urinaire d'eau et de sodium et sont utilisés dans le traitement de très nombreuses affections humaines (hypertension, œdèmes...).

Il y a plusieurs classes de diurétiques, chacune agissant avec des mécanismes d'action différents:

- les diurétiques osmotiques
- les inhibiteurs de l'anhydrase carbonique
- les diurétiques de l'anse
- les diurétiques thiazidiques
- les diurétiques épargneurs de potassium

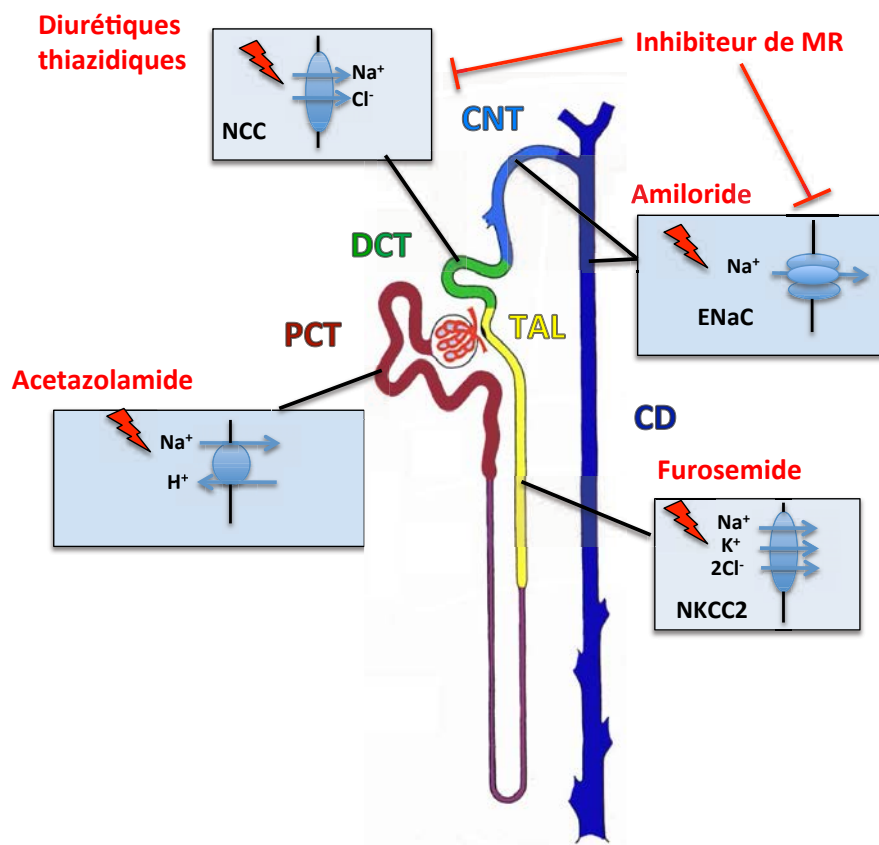


Figure 18 Répartition des transporteurs cibles des différents types de diurétiques

Ils agissent en bloquant directement ou indirectement le transport rénal de sodium. Les différentes classes de diurétiques peuvent toucher un ou plusieurs segments tubulaires selon la présence de leurs cibles dans le néphron (figure 18). Si ils ont en commun de faire augmenter la sécrétion urinaire d'eau et de sels, ils n'auront pas forcément le même effet sur la réabsorption du potassium.

Les diurétiques osmotiques

Les diurétiques osmotiques comme le mannitol, le sorbitol et le glycérol agissent sur les segments perméables à l'eau à savoir le tubule

proximal et la branche fine de l'anse de Henle. Ces composés chimiques sont pauvrement réabsorbés (Better, Rubinstein, Winaver, & Knochel, 1997). Ce sont des solutés hypertoniques augmentant l'osmolalité de l'ultrafiltrat empêchant la réabsorption d'eau et des solutés augmentant donc de la diurèse.

Les inhibiteurs de l'anhydrase carbonique

L'acétazolamide est un inhibiteur de l'anhydrase carbonique (CA), une enzyme qui catalyse la transformation de l'acide carbonique H_2CO_3 en CO_2 et H_2O et inversement. L'acétazolamide agit principalement sur la réabsorption des ions bicarbonate dans le tubule proximal et donc sur la réabsorption des ions sodium : la réabsorption de sodium est dépendante de la réabsorption de bicarbonate, donc si la réabsorption de bicarbonate est bloquée par la CA, la réabsorption de Na^+ est bloquée aussi. Les inhibiteurs de CA inhibent aussi la réabsorption des ions bicarbonate le long du tube distal, probablement en interférant avec l'action des cellules α -intercalaires (Schwartz, 2002).

Les diurétiques de l'anse

Les diurétiques de l'anse comme le furosémide inhibent le cotransporteur sodium/chlore/potassium NKCC2 présent dans la branche large ascendante de l'anse de Henle. Ceci empêche la formation du gradient cortico-papillaire nécessaire à la concentration de l'urine. Ces diurétiques induisent aussi une augmentation de l'excrétion de calcium et de magnésium urinaire (Quamme, 1981)

Les diurétiques thiazidiques

Classiquement, les diurétiques thiazidiques inhibent le cotransport de NaCl (NCC) dans le tubule contourné distal. (Velazquez & Wright, 1986) (Ellison, Velazquez, & Wright, 1987). Un autre système de transport de NaCl électroneutre, sensible aux diurétiques thiazidiques a été récemment décrit dans le canal collecteur (Levi et al., 2010). Les diurétiques thiazidiques à fortes doses peuvent aussi inhiber l'anhydrase carbonique renforçant son effet natriurétique (Boer, Koomans, & Dorhout Mees, 1989). Leur utilisation provoque aussi une perte de potassium. L'inhibition de NCC provoque une augmentation de l'activité du canal ENaC et par conséquent une augmentation de l'activité de ROMK responsable de la sécrétion de potassium par les cellules principales du canal collecteur.

Les diurétiques épargneurs de potassium

Les diurétiques épargneurs de potassium agissent en bloquant le canal épithélial sodique ENaC localisé dans le tubule connecteur et le canal collecteur. L'amiloride semble se lier à ENaC au niveau du pore et agit comme un bloqueur du passage des ions sodium (McNicholas & Canessa, 1997). Ces diurétiques sont dits épargneurs de potassium car l'inhibition de ENaC diminue la sécrétion urinaire de potassium (Giebisch, 1998). Les inhibiteurs des récepteurs minéralocorticoïdes font aussi partie de cette classe de diurétiques; ils sont utilisés dans le traitement de l'hypertension pour bloquer les transporteurs NCC et ENaC stimulés par l'aldostérone.

III Les kinases WNKs et l'Hypertension Hyperkaliémique Familiale

1) L'Hypertension Hyperkaliémique Familiale

L'Hypertension Hyperkaliémique Familiale (FHHT), encore appelée syndrome de Gordon ou Pseudohypoaldostéronisme de type II (PHAII), est une forme rare d'hypertension artérielle, autosomique dominante, associant hyperkaliémie et acidose métabolique hyperchlorémique (Gordon, 1986). Les niveaux plasmatiques d'aldostérone et de rénine sont anormalement bas. En effet, du fait de l'hyperkaliémie, le niveau d'aldostérone devrait être élevé. La grande sensibilité aux diurétiques thiazidiques des patients FHHT suggère une anomalie primaire tubulaire rénale. Les premières mutations identifiées responsables de la FHHT concernent deux kinases de la famille des WNKs, WNK1 et WNK4. Cette maladie a été particulièrement étudiée car elle pourrait apporter de nouvelles informations pour expliquer le paradoxe de l'aldostérone.

2) Les kinases WNKs

La famille des sérine-thréonine kinases WNK (pour With No lysine (K)) compte quatre membres. Elles doivent leur nom à l'absence du résidu lysine conservé dans le sous-domaine II de l'ensemble des kinases connues, qui est ici remplacé par un résidu cystéine (B. Xu et al., 2000). En plus du domaine kinase, les WNKs possèdent un domaine auto-inhibiteur de l'activité kinase, deux domaines coiled-coiled et trois domaines riches en proline.

Les gènes *WNK1*, *WNK3* et *WNK4* sont exprimés dans le rein. *WNK1* donne naissance à deux isoformes : L-*WNK1* (pour Long-*WNK1*) et KS-*WNK1* (pour Kidney Specific-*WNK1*). L'expression de L-*WNK1* est ubiquitaire avec une expression la plus élevée dans la moelle épinière. Comme son nom l'indique, KS-*WNK1* est uniquement retrouvé dans le rein

(Vidal-Petiot et al., 2012). De plus, KS-WNK1 ne possède pas d'activité kinase puisqu'il est dépourvu d'une grande partie du domaine kinase (Q. Xu, Modrek, & Lee, 2002). Dans le rein, L-WNK1 est exprimé à quantité égale dans tout le néphron sauf dans le glomérule où son expression est deux fois plus importante et le DCT où son expression est la plus faible. KS-WNK1 présente une expression forte dans la TAL corticale (64% des isoformes de WNK1), dans le DCT avec une expression de son ARNm 80 fois plus importante que L-WNK1 et dans le CNT où il représente environ 35 à 40% des isoformes.

L'expression de WNK4 est particulièrement forte dans le rein. On retrouve son expression par Northern-blot dans le cœur et le testicule (Kahle et al., 2004), et par RT-PCR son expression est retrouvée dans tous les tissus étudiés à l'exception du muscle squelettique. Dans le rein, Ohno et al. ont immunolocalisé son expression dans les podocytes du glomérule, la branche large ascendante, dans le DCT et le CD (Ohno et al., 2011).

WNKs, NCC et FHHt

La grande sensibilité des patients à de faibles doses de diurétiques thiazidiques, qui corrigent non seulement les troubles tensionnels mais aussi métaboliques, suggèrent fortement que l'activité du co-transporteur NCC est augmentée chez ces patients. Des études menées *in vitro* et *in vivo* par de nombreuses équipes ont depuis confirmé cette hypothèse en mettant en évidence que les WNKs modulent l'expression et la phosphorylation de NCC.

Régulation de NCC par WNK4.

Les études sur les oocytes de Xénope et les cellules en culture montrent clairement que la forme sauvage de WNK4 inhibe l'activité de NCC (C. L. Yang, Angell, Mitchell, & Ellison, 2003) (Wilson et al., 2003).

Une autre étude montre même que WNK4 stimule la dégradation lysosomale de NCC (Subramanya & Ellison, 2010). Ces études *in vitro* ont été confirmées *in vivo* dans un modèle de souris transgéniques surexprimant WNK4 (Lalioti et al., 2006). L'expression de NCC et la taille du DCT sont en effet diminuées chez ces souris. De plus, elles présentent une diminution de la pression artérielle ainsi qu'une tendance à l'hypokaliémie lorsqu'elles reçoivent un régime pauvre en potassium.

Cependant, les études *in vivo* ultérieures vont à l'encontre des études *in vitro*, en suggérant que WNK4 active NCC. L'inactivation de WNK4 chez la souris entraîne en effet une forte diminution de l'expression et de la phosphorylation de NCC, et ce dans deux modèles indépendants (Castaneda-Bueno et al., 2012) (Takahashi et al., 2014). Les souris WNK4^{-/-} présentent de plus une hypokaliémie et une alcalose métabolique hypochlorémique. Le laboratoire de S. Uchida a récemment généré un modèle de surexpression de WNK4 chez la souris, semblable à celui décrit en 2006 par Lalioti et collaborateurs. De façon surprenante, ce modèle présente cette fois une augmentation de l'expression et de la phosphorylation de NCC ainsi qu'un phénotype de type FHt (hypertension, hyperkaliémie et acidose métabolique hyperchlorémique) (Wakabayashi et al., 2013)

Prises ensemble, ces dernières études *in vivo* suggèrent que WNK4 active NCC et que la surexpression de WNK4 conduirait à une suractivation de NCC et donc à la FHt. Ces études sont en accord avec les résultats récemment obtenus sur les conséquences fonctionnelles des mutations WNK4 identifiées chez les patients FHt. Ces mutations sont toutes de type "faux-sens" et la majorité d'entre elles est située dans un motif dit acide, d'une dizaine d'acides aminés, fortement conservé entre les membres de la famille WNK (Panneau du bas de la Figure 19).

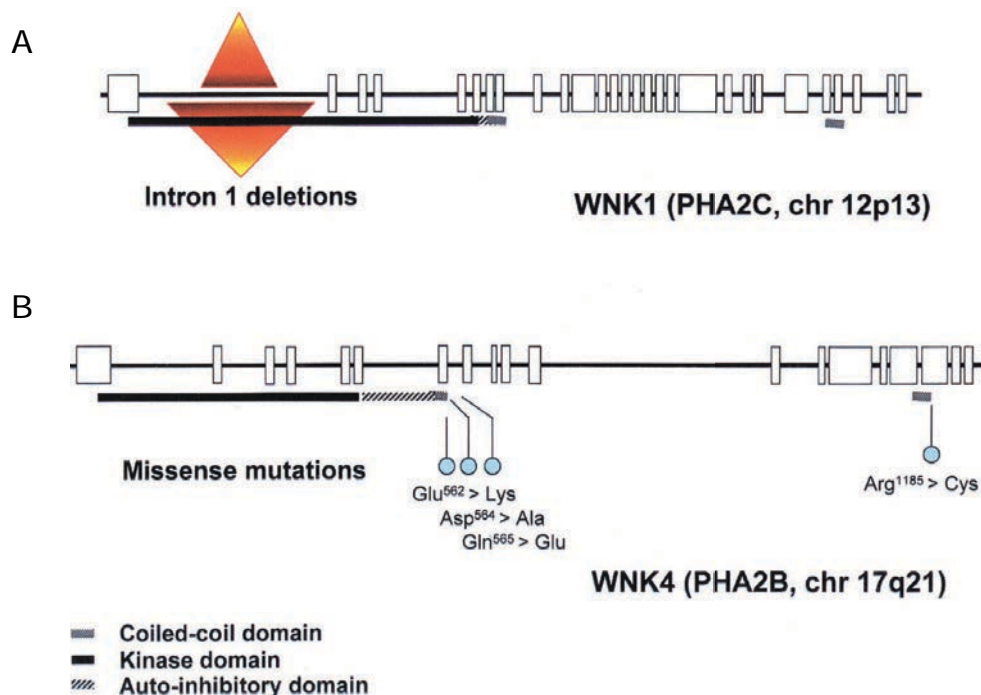


Figure 19 Structure schématique des gènes *WNK1* (A) et *WNK4* (B) et mutations associées à la FHHt (d'après Faure S et al. Nephrol Dial Transplant. 2003)

Les conséquences de ces mutations sont restées longtemps indéterminées. La découverte de deux nouveaux "gènes FHHt" a permis de montrer en 2012 que ces mutations préviennent la dégradation protéosomale de *WNK4*. Ces nouveaux gènes sont *CUL3* et *KLHL3* (Boyden et al., 2012) (Louis-Dit-Picard et al., 2012). Le gène *CUL3* code la culline-3, composant essentiel d'un complexe ubiquitine ligase E3 permettant la dégradation des protéines cibles par le protéasome après ubiquitination. *KLHL3* (Kelch-like 3) appartient à la famille BTB-BACK (broad-complex, tramtrack and bric a brac-BTB and C-terminal Kelch), connue pour être un recruteur de substrat pour le complexe Culline 3/ubiquitine ligase E3 (Pintard, Willems, & Peter, 2004). Dans l'oocyte de Xénope ou en culture cellulaire, la kinase *WNK4* est ubiquitinée par le complexe *KLHL3/Cul3*, diminuant ainsi son abondance (Wu & Peng, 2013) (Shibata, Zhang, et al., 2013). Le laboratoire de D. Alessi a montré que le motif acide des WNKs contient le domaine d'interaction avec *KLHL3* et que

ses mutations empêchent le recrutement de WNK4 par KLHL3 et donc son ubiquitination, augmentant ainsi son abondance (Ohta et al., 2013). Les mutations de WNK4, responsables de la FHt, empêchent de ce fait l'interaction de la kinase avec le complexe KLHL3/Cul3 et sa dégradation, provoquant une accumulation et une suractivité de WNK4. Ceci a été confirmé *in vivo* par deux études. Les souris hétérozygotes *KLHL3^{+/R528H}*, possédant la même mutation que celle observée chez certains patients FHt, présentent les symptômes de la pathologie et un niveau d'expression de WNK4 augmenté (Susa et al., 2014). De même, l'expression de WNK4 est augmentée dans le rein des souris hétérozygotes *WNK4^{+/D561A}*, exprimant une des mutations FHt (S. S. Yang et al., 2007). Ces souris présentent une augmentation de l'expression et de la phosphorylation de NCC ainsi que tous les signes cliniques de la FHt.

Les résultats non concordants entre les expériences réalisées *in vitro* et *in vivo* ont rendu difficile la compréhension du rôle de WNK4 sans le transport de NaCl puisque, *in vitro*, WNK4 a un effet inhibiteur et *in vivo* un effet stimulateur. Dans l'œuf de Xénope, l'inhibition de NCC par WNK4 est annulée par l'angiotensine II (San-Cristobal et al., 2009) et la phosphorylation de SPAK par WNK4 est stimulée par une augmentation de la concentration en Ca^{2+} (Na, Wu, & Peng, 2012). Pinal et al. ont aussi montré que la kinase WNK1 est sensible à la concentration en chlore intracellulaire (Pinal et al., 2014) suggérant que cette sensibilité est aussi valable pour WNK4. On pourrait émettre l'hypothèse que l'action inhibitrice et activatrice de WNK4 coexistent dans le DCT et que l'action de WNK4 est dépendante des conditions très différentes entre les modèles *in vitro* et les cellules du DCT *in vivo*. La très récente étude de Chavez et al. a permis de proposer un nouveau modèle de régulation de NCC par WNK4 et WNK1 conciliant les observations *in vivo* et *in vitro*. (Chavez-Canales et al., 2014).

Régulation de NCC par WNK1

Les mécanismes de régulation de NCC par WNK1 n'étaient, jusqu'à aujourd'hui, pas bien définis. En effet, les premières expériences dans les oocytes de Xénope ne montraient pas d'effets directs de WNK1 sur NCC. L-WNK1, l'isoforme kinase et ubiquitaire de WNK1, activait NCC indirectement en inhibant WNK4 (C. L. Yang et al., 2003). Subramanya et al. ont mis en évidence que KS-WNK1 agissait comme un inhibiteur de WNK1 (Subramanya, Yang, Zhu, & Ellison, 2006). De l'ensemble des ces résultats est né un premier modèle où KS-WNK1 inhibe WNK1 qui inhibe à son tour WNK4, WNK4 diminuant l'activité de NCC. Cependant, ce modèle est en contradiction avec d'autres études menées non seulement *in vitro* mais également *in vivo*.

Plusieurs équipes ont en effet montré que L-WNK1 active par phosphorylation les kinases SPAK (STE20/SPS1-related Proline/Alanine-rich Kinase) et OSR1 (Oxidative Stress-Responsive kinase-1) (Moriguchi et al., 2005) (Anselmo et al., 2006) (Richardson & Alessi, 2008), qui phosphorylent et activent à leur tour NCC. SPAK et OSR1 sont exprimées dans le DCT ainsi que la TAL. L'importance de SPAK dans la phosphorylation de NCC a été démontrée par la caractérisation de plusieurs modèles de souris où la phosphorylation de NCC est diminuée de 60 à 85% chez des souris knock-out pour SPAK (Rafiqi et al., 2010) (McCormick et al., 2011) (S. S. Yang et al., 2010). La kinase SPAK peut, comme son substrat NCC, être elle-même phosphorylée et son activité est modulée par les kinases WNKs. Des interactions directes existent entre la kinase SPAK et WNK1 (Moriguchi et al., 2005). Dans ce contexte, il est surprenant que L-WNK1 ne soit pas capable d'activer NCC dans l'œuf de Xénope alors même que SPAK y est exprimé.

Les modèles *in vivo* sont également en faveur d'une régulation SPAK-dépendante de NCC par L-WNK1. A ce jour, l'étude du rôle de L-WNK1 dans le rein adulte n'a pas été possible puisque l'inactivation de L-WNK1 conduit à une mortalité embryonnaire, due à d'importantes

anomalies du développement cardiovasculaire (Xie et al., 2009). Les mutations identifiées dans le gène *WNK1* chez les patients FHHT sont de grandes délétions de l'intron 1 (Panneau du haut de la Figure 19). La délétion de ce même intron chez la souris conduit au développement d'une FHHT (Vidal-Petiot et al., 2013). Ceci est dû à un doublement du niveau d'expression transcriptionnelle de L-WNK1 dans le DCT. Une augmentation de 30% est également observée dans le CNT. L'expression de L-WNK1 dans les autres segments du néphron et dans les autres tissus n'est quant à elle pas modifiée. Comme attendu, l'abondance et la phosphorylation de NCC sont stimulées dans le DCT des souris *WNK1^{+ / FHHT}*. On observe également une modification de la localisation cellulaire de SPAK, notamment de sa forme phosphorylée: cytoplasmique dans le DCT des souris contrôles, SPAK apparaît relocalisée près de la membrane apicale du DCT des souris *WNK1^{+ / FHHT}*. Ceci suggère que SPAK est impliquée dans l'activation de NCC par L-WNK1 mais ne permet pas pour autant d'éliminer un éventuel rôle de la cascade L-WNK1/WNK4.

Afin de tester cette dernière hypothèse *in vivo*, les *WNK1^{+ / FHHT}* ont été croisées avec les souris *WNK4^{- / -}* (Chavez-Canales et al., 2014). Ces souris présentent toujours une FHHT, ce qui suggère très fortement que L-WNK1 agit indépendamment de WNK4 pour activer SPAK. L'équipe de G. Gamba a donc étudié à nouveau la régulation de NCC par L-WNK1 dans l'œuf de Xénope mais en utilisant cette fois le variant d'épissage de L-WNK1 exprimé de façon majoritaire dans le néphron, à savoir le variant ne contenant pas l'exon 11 (L-WNK1-Δ11) (Vidal-Petiot et al., 2012). Il est important de noter que la majorité des études précédentes avait utilisé un variant délété à la fois de l'exon 11 et de l'exon 12 (L-WNK1-Δ11-12), qui ne représente que 20% des isoformes de L-WNK1 dans le néphron. Cette étude a montré que ces deux variants activent NCC dans l'œuf de Xénope et que l'ADN_c L-WNK1-Δ11-12 utilisé précédemment porte une mutation inactivatrice dans sa partie C-terminale (B. Xu et al., 2000). Enfin, WNK4 empêche la stimulation de NCC par L-WNK1-Δ11. Dans ce nouveau modèle mécanistique, L-WNK1 est capable d'activer la kinase

SPAK en la phosphorylant qui à son tour stimule la phosphorylation/activation de NCC et ce indépendamment de WNK4. WNK4 est capable d'inhiber L-WNK1 en interagissant avec L-WNK1 en formant un hétérodimère (Figure 20).

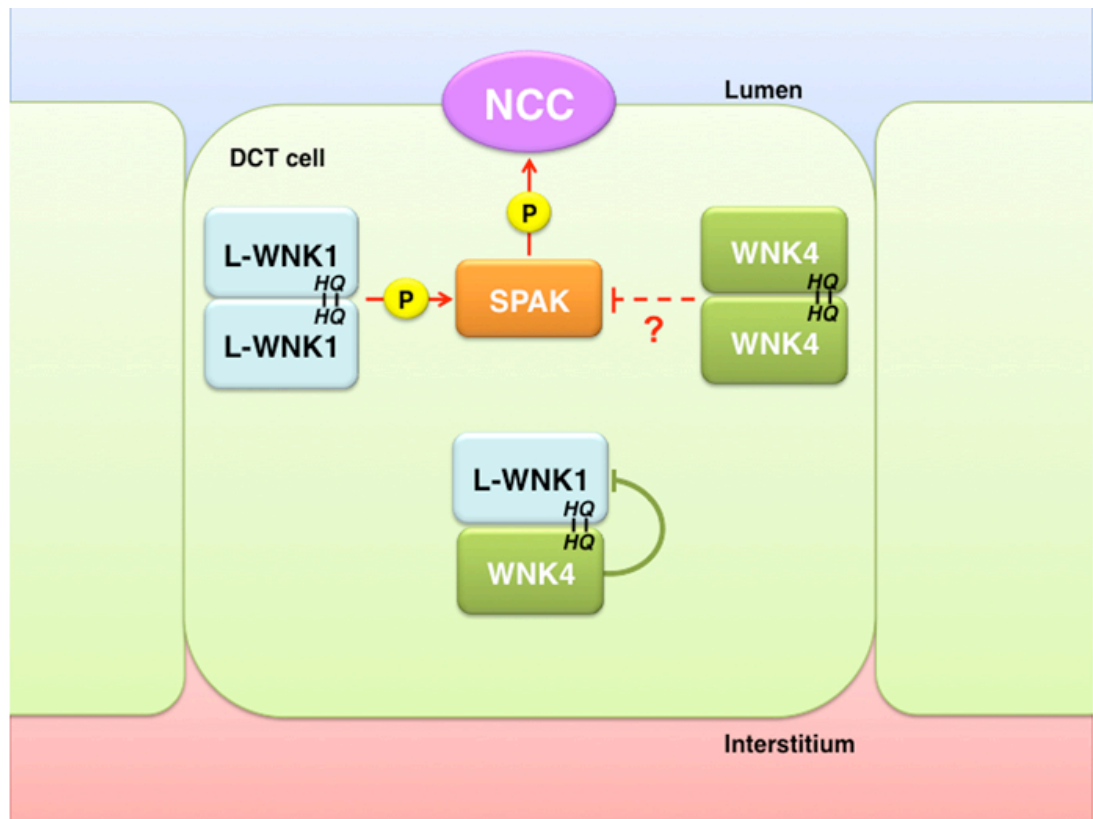


Figure 20 Modèle de régulation de NCC par les kinases WNK
(María Chávez-Canales et al., hypertension 2014)

ARTICLE ET EXPERIMENTATIONS

Objectif de la thèse

Afin de montrer l'importance du rôle de la cellule β -intercalaire dans le maintien de la balance du sodium et de la pression artérielle, nous avons étudié son transport de NaCl selon trois approches.

Dans un premier temps nous nous sommes intéressés au rôle physiologique de l'échangeur NDCBE. L'inactivation de la voie chez de souris knock-out pour NDCBE nous a permis de montrer que le transport électroneutre de NaCl passant par la voie NDCBE/pendrine dans les cellules β -intercalaires joue un rôle important dans le transport rénal de NaCl et la régulation de la pression artérielle. Nous avons observé les mécanismes compensatoires mis en jeu chez les souris $Ndcbe^{-/-}$ puis généré des souris double knock-out $Ndcbe^{-/-}$; $Ncc^{-/-}$ et étudié l'impact physiologique de cette double inactivation sur la régulation de la balance du sodium et le maintien d'un volume vasculaire normal.

Dans un second temps, nous avons voulu mettre en évidence que les cellules β -intercalaires sont impliquées dans la perte de sels observée chez les patients atteints d'acidose tubulaire distale. Grâce à des souris $ATP6v1b1^{-/-}$ invalidées pour la pompe à proton, nous montrons que le transport de la voie NDCBE/pendrine est altéré. Nous démontrons aussi qu'il existe un système de régulation paracrine des cellules β -intercalaires régulant l'activité de transport de Na^+ des cellules principales.

Enfin dans une dernière partie nous mettons en évidence que la voie NDCBE/pendrine est impliquée dans le développement d'une pathologie, l'hypertension hyperkaliémique familiale et que la kinase WNK4 est un régulateur de la voie NDCBE/pendrine. A partir de souris transgéniques $TgWNK4^{PHAI}$ présentant les mêmes symptômes que les patients humains, nous avons mesurer l'activité de transport de NaCl dans le canal collecteur des souris transgéniques comparée aux souris sauvages afin de mettre en évidence une suractivation de la voie NDCBE/pendrine dans les cellules β -intercalaires.

I Rôle de NDCBE dans la régulation de la balance du sodium

Introduction

Le rein adapte continuellement l'excrétion urinaire de NaCl afin de garder le volume vasculaire constant. Toute situation conduisant à une balance positive de NaCl augmente le volume vasculaire et ainsi favorise l'augmentation de la pression sanguine. Inversement une diminution de la quantité en NaCl dans l'organisme réduit la pression artérielle (Guyton, 1991). L'inhibition de la réabsorption de NaCl par les diurétiques diminue substantiellement le risque de mort causée par l'hypertension (Mehta, Pascual, Soroko, Chertow, & Group, 2002) et constitue un traitement de premier choix pour l'hypertension. Bien que le cotransporteur de NaCl apical NCC dans le tubule contourné distal soit reconnu comme la cible principale des diurétiques thiazidiques, une part de leur action anti-hypertensive pourrait être attribuée au canal collecteur cortical. Dans cette partie du néphron, la réabsorption électrogénique de Na^+ est effectuée par le canal épithélial à sodium ENaC couplé à la Na^+/K^+ -ATPase basolatérale dans les cellules principales. Néanmoins, ce transport électrogénique prenant part à la réabsorption de NaCl dans le CCD n'est pas inhibé par les diurétiques thiazidiques. En revanche, nous avons récemment découvert une nouvelle voie de réabsorption de NaCl électroneutre sensible aux diurétiques thiazidiques dans les cellules β -intercalaire du CCD résultant des activités parallèles de l'échangeur $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ pendrine et de l'échangeur $\text{Cl}^-/2\text{HCO}_3^-$ dépendant du Na^+ (NDCBE/Slc4a8) (Leviel et al. JCI 2010). Contrairement au transport de NaCl via NCC et ENaC, le transport de NaCl par les cellules β -intercalaires est « énergisé » par la pompe à proton H^+ -ATPase basolatérale (Chambrey et al., 2013). Le rôle de la pendrine dans la régulation de la balance du sodium, et par conséquent, dans le maintien d'un volume vasculaire et d'une pression sanguine normales est bien documenté. L'inactivation spécifique de la pendrine favorise l'hypotension et protège de l'hypertension induite par les minéralocorticoïdes (Verlander et al., 2003). Inversement, les souris surexprimant la pendrine dans les cellules β -

intercalaires présentent un retard dans l'excrétion urinaire de NaCl lors d'un passage à un régime riche en NaCl et développent une hypertension (Jacques et al., 2013). NDCBE en tant que partenaire fonctionnel de la pendrine est attendu pour jouer un rôle similaire dans la régulation du volume extracellulaire et de la pression artérielle. Cependant, aujourd'hui il n'en existe aucune preuve physiologique.

Matériels et méthodes

Animaux : les études ont été menées sur des souris de fond génétiques pures C57BL/6. Des souris hétérozygotes possédant une délétion du gène *Ndcbe* ont été croisées, et les souris sauvages (*Ndcbe*^{+/+}) et homozygotes (*Ndcbe*^{-/-}) ont été génotypées par PCR à partir de biopsie de queue. Les souris doubles knock-out *Ncc/Ndcbe* ont été générées par croisement des souris double hétérozygotes *Ndcbe*^{+/-};*Ncc*^{+/-} entre elles. Les souris simple knock-out pour *Ndcbe* (*Ndcbe*^{-/-};*Ncc*^{+/+}), double knock-out *Ndcbe/Ncc* (*Ndcbe*^{-/-};*Ncc*^{-/-}) et sauvages (*Ndcbe*^{+/+};*Ncc*^{+/+}) ont été génotypées par PCR à partir de biopsie de queue. Dans toutes les expériences les souris sauvages appartiennent à la même portée.

Etudes physiologiques : toutes les expériences utilisent des portées de souris *Ndcbe*^{+/+} et *Ndcbe*^{-/-} ayant le même âge (3 à 5 mois) et de même sexe. Pour la collection d'urine, les souris sont logées dans des cages à métabolisme (Techniplast). Les souris ont reçue de l'eau déionisée à volonté et nourries avec de la nourriture en poudre standard contenant 0,3% de sodium (INRA). Une durée de 3 à 5 jours est nécessaire à l'habituation des souris aux cages à métabolisme. A l'état d'équilibre, les collections d'urine, dans des réceptacles à urine contiennent de l'huile de paraffine saturée en eau, pour la mesure des électrolytes sont réalisées tous les jours. Les souris reçoivent ensuite de la nourriture sans NaCl (INRA). Tous les 24 heures, les urines sont collectées sur une période de 7 jours. La créatinine urinaire est mesuré par la méthode colorimétrique de

Jaffé grâce à un automate Konelab 20i auto-analyzer (Thermo Electron Corporation). La concentration de chlore urinaire est mesurée par un titrateur DL 55 (Mettler Toledo). La concentration en sodium et potassium est mesurée par un photomètre de flamme (IL943, Instruments Laboratory). La concentration en rénine plasmatique a été déterminée par dosage radio-immunologique de l'angiotensine I générée par incubation de plasma en présence d'excès d'angiotensinogène (Menard et al Endocrinology 1972). L'aldostérone urinaire a été déterminée par dosage radio-immunologique (DPC Dade Behring). Le prélèvement de sang est réalisé par une incision de la queue sur des souris anesthésiées par une injection d'un mélange (0,1ml/g de masse corporelle) de kétamine (Imalgene®, Rhône Mérieux; 10%) et de xylazine (Rompun®, Bayer AG; 5%). La mesure de la concentration de potassium plasmatique est réalisée sur un analyseur ABL 77 (Radiometer). La concentration en bicarbonate est calculée des valeurs mesurées par l'équation d'Henderson-Hasselbach. Pour les injections aigues d'hydrochlorothiazide et d'amiloride, les souris sont placées dans des cages à métabolismes et nourries avec de la nourriture sans NaCl et injectées en sous-cutané avec de l'HCTZ (HCTZ; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) à une dose de 50 mg/kg de masse corporelle, et de l'amiloride à une dose de 1,45mg/ kg de masse corporelle. Les urines sont collectées sur deux jours de 9h à 15h. Le premier jour, les souris sont injectées uniquement avec le véhicule et les diurétiques le lendemain à 9h. La concentration de sodium urinaire est normalisée par la concentration en créatinine (en mmol/L) afin de minimiser les effets dus à un recueil incomplet sur une si courte période.

Extraction ARN et transcription inverse: les animaux sont tués et les reins sont retirés et rapidement congelés dans de l'azote liquide. Les reins congelés sont broyés et homogénéisés dans du tampon RA1 (Macherey-Nagel, Germany) supplémenté avec du β -mercaptoethanol à une concentration finale de 1%. Les ARNs totaux sont extraits dans des aliquots de 350 μ L et chaque échantillon homogénéisé grâce au kit NucleoSpin

RNA II Kit (Macherey-Nagel) en suivant les instructions du fabricant. La qualité et la concentration de l'extrait d'ARNs totaux isolés sont analysées par un spectromètre Nanovue plus (GE Healthcare). Les échantillons d'ARNs totaux sont conservés à -80°C. 3µL de chaque échantillons sont mélangés ensemble afin de créer les échantillons standards. La transcription inverse est réalisée grâce au kit SuperScript II (Invitrogen). 1µg d'ARN est dilué dans 20µL de tampon de réaction contenant, en concentration final, du tampon RT 1X, des amorces aléatoires (2,5 µM), l'enzyme de transcription inverse (2,5 U/µL), un mélange de dNTP (0,5 µM de chaque), du dithiothréitol (10mM) et de l'eau sans RNase.

PCR quantitative en temps réel : les amorces ont été conçues grâce au logiciel Primer Express de Biosystem pour la GAPDH (Forward 5'-GCACAGTCAAGGCCGAGAAT-3'; Reverse 5'-GCCTTCTCCATGGTGGTGAA-3'), la rénine de souris (Forward 5'-ATCTTTGACACGGGTTCAGC-3'; Reverse 5'-TGATCCGTAGTGGATGGTGA-3'). Les amorces ont été choisies pour produire des amplicons de taille ≤ 150 bp. La spécificité des amorces a été dans un premier temps testée sur des ARNm dérivés du rein. La PCR temps réel est effectuée sur un Thermal Cycler CFX96 (Biorad) avec un kit qPCR MasterMix Plus pour SYBR avec fluorescéine kit (Eurogentec). Brièvement, 3µl (10 ng/µl) d'ADNc, 0,75 µl de chaque amorce (10 µM), 12,5µl de qPCR MasterMix Plus pour SYBR avec fluorescéine pour un volume final de 25 µl. Les conditions de réaction sont les suivantes : 95°C pendant 10 minutes suivi de 45 cycles à 95°C pendant 20 secondes, 62°C pendant 20 secondes, et 72°C pendant 20 secondes. Tous les échantillons sont déposés en dupliquât. Un contrôle négatif est amplifié en absence de reverse transcriptase. Le seuil de détection des cycles est enregistré pendant la phase linéaire d'intensité de fluorescence, déterminée à 0,06. L'expression des gènes cibles est normalisée par l'expression de la glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GAPDH). L'expression relative du gène cible est calculée selon la formule : $R=2^{(Ct(GAPDH)-$

Ct(gène cible)), où Ct représente le nombre de cycle dépassant le seuil de 0,06.

Mesure de la pression artérielle systolique sur souris consciente : la pression sanguine systolique est mesurée sur des souris conscientes nourries avec de la nourriture standard sur un système informatisé au niveau de la queue et après une habitude d'une semaine. Puis, 10 mesures sont effectuées chaque jour pendant 7 jours consécutifs. Seuls les mesures des 4 derniers jours sont conservées. Si la variabilité des mesures faites le même jour dépasse 20%, les mesures sont remplacées par celles d'un autre jour supplémentaire. Cette méthode a été validée et corrèle bien avec les mesures directes de la pression intra-artérielle.

Analyse par immunoblot : les animaux sont anesthésiés avec de la kétamine et de la xylazine (0,1 and 0,01 mg/g de masse corporelle, respectivement). Les reins sont retirés. Lorsque nécessaire, les reins sont coupés en tranche d'épaisseur d'environ 5mm. Le cortex et la médulla rénale sont séparés sous une loupe binoculaire et placés dans une solution froide tamponnée (250 mM sucrose, 20 mM Tris-Hepes, pH 7,4) contenant des inhibiteurs de protéases: 4 µg/ml d'aprotinine, 4 µg/ml leupeptine, 1,5 µg/ml pepstatine A and 28 µg/ml 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride (AEBSF). Les tissus sont broyés dans 1mL de tampon avec un homogénéiseur Ultraturrax à vitesse maximale (24000 tpm) pendant 30 secondes dans la glace. L'homogénat est centrifugé à 4000g pendant 10 minutes à 4°C et le surnageant est par la suite centrifugé à 17000g pendant 30 minutes à 4°C. Le culot est resuspendu dans du tampon. La concentration en protéine est déterminée par la méthode de Bradford (microBradford, Bio Rad Laboratories).

Les protéines sont solubilisées dans un tampon de charge (62,5 mM Tris HCl, pH 6,8, 2% SDS, 100 mM dithiotreitol, 10% glycérol et bleu de bromophénol), incubées à température ambiante pendant 30 minutes. L'électrophorèse est effectuée sur des gels polyacrylamide à 7,5% (XCell

SureLock Mini-cell, Invitrogen Life Technologies), et coloré avec du bleu de Coomassie afin de mesurer la quantité totale dans chaque puits de protéines. Les protéines sont transférées par électrophorèse pendant 2 heures à 4°C sur une membrane de nitrocellulose (Amersham) et marquées au rouge Ponceau dans de l'acide acétique afin de vérifier l'uniformité du transfert sur la membrane. Les membranes sont ensuite incubées pendant 1 heure à température ambiante dans une solution saline tamponnée au phosphate et contenant 5% de lait en poudre écrémé pour bloquer les sites non-spécifiques de fixation de l'anticorps, suivie par une incubation toute la nuit dans une solution de PBS contenant l'anticorps primaire (anti-NDCBE 1:500 ; anti-NCC 1:50000; anti-NCC phospho Thr 55 1:250 ; anti-Pendrin 1:10000; anti α -ENaC 1:10000 ; anti γ -ENaC 1:30000 ; anti-NKCC2 1:10000 ; anti-NHE3 1:5000; anti α 1 Na⁺,K⁺-ATPase 1:100000 ; anti B1 H⁺-ATPase 1:30000) et contenant 1% de lait en poudre écrémé. Après 5 lavages avec une solution PBS contenant 0,01% de Tween-20, les membranes sont incubées pendant 2 heures à température ambiante dans une solution de PBS 5% lait et l'anticorps secondaire conjugué à la peroxydase (chèvre anti lapin au 1:10000 (Biorad) ; cheval anti-chèvre (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Les membranes sont nettoyées et une solution chimioluminescence contenant du luminol (ECL, Perkin Elmer Life Science Products) est utilisée pour visualiser les anticorps liés avant son exposition sur un film photographique (Hyperfilm ECL (Amersham)). L'autoradiographie est numérisée à l'aide d'un scanner (Epson Perfection V500 Photo) et chaque bande est quantifiée grâce au logiciel NIH Image. Les valeurs densitométriques sont normalisées par rapport à la moyenne des valeurs du groupe contrôle définie à 100% et les résultats sont exprimés en moyenne \pm S.E.

L'anticorps dirigé contre NDCBE a été décrit précédemment (Leviel et al. JCI 2010). Les anticorps dirigés contre α et γ ENaC nous ont été offerts par J Loffing (University of Zurich, Zurich, Switzerland). L'anticorps anti-

NCC est un don de D Ellison (Oregon Health and Science University, Portland, OR). L'anticorps anti sous unité $\alpha 1$ de la Na^+,K^+ -ATPaseB1 est un don de F Jaisser (Paris, France). L'anticorps dirigé contre la sous-unité B1 de la pompe H^+ -ATPase est un don de S Breton (Harvard Medical School, Boston, MA). L'anticorps dirigés contre phospho Thr 55 provient de « The Division of Signal Transduction Therapy » de l'université de Dundee. Les anticorps dirigés contre la pendrine sont un don de P. Aronson (Yale University, New Haven, CN). L'anticorps dirigé contre NHE3 est un don de M. Knepper (NIH, Bethesda, MA).

Résultats

L'expression de NDCBE est augmentée en réponse à un augmentation d'aldostérone

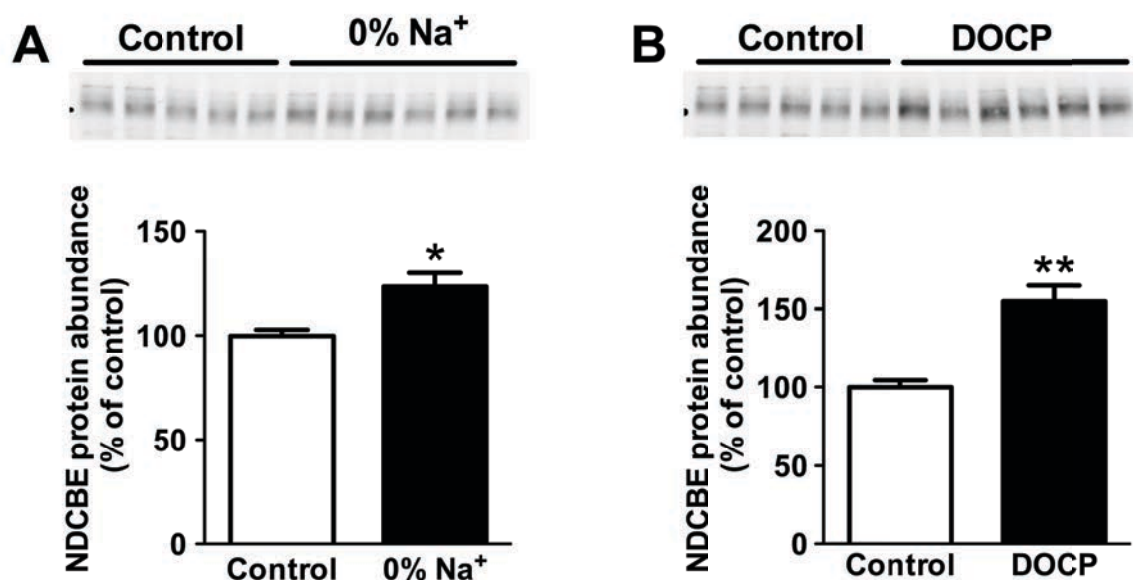


Figure 1 Effet de la déplétion en NaCl ou du désoxycorticostérone pivalate sur l'expression de NDCBE. **A.** Immunoblots réalisés sur des préparations membranaires de cortex rénaux isolées à partir de souris sauvages recevant un régime normal en sel (control) ou sans sel pendant 15 jours (0% Na⁺). **B.** Immunoblots réalisés sur des préparations membranaires de cortex rénaux isolées à partir de souris sauvages recevant un régime normal en sel (control) ou après injection de désoxycorticostérone pivalate (DOCP). Chaque puits est chargé avec 15 µg d'un échantillon préparé à partir d'une souris différente. Les histogrammes représentent l'analyse densitométrique des immunoblots. Les valeurs représentent les moyennes ± SEM. La comparaison des groupes a été effectuée le test t de Student non apparié. *p<0,05 ; **p<0,01 significatif par rapport au groupe contrôle

Le transport de NaCl dans le canal collecteur étant augmenté en réponse à un régime désodé ou après administration d'aldostérone, nous avons voulu savoir si l'expression de NDCBE était régulée dans ces conditions. Lorsque l'on traite des souris sauvages avec du désoxycorticostérone pivalate (DOCP), un analogue de l'aldostérone, ou lorsque l'on impose un régime sans sel conduisant à une activation du système rénine-angiotensine-aldostérone (augmentation de la sécrétion

de rénine et d'aldostérone), on observe par western blot une augmentation de l'expression de NDCBE (Figure 1). Ces résultats montrent que l'expression de NDCBE est stimulée dans des situations où le transport de NaCl par le canal collecteur est activé.

Les souris knock-out pour NDCBE compensent la perte de NaCl par une activation du système rénine-angiotensine-aldostérone

Afin de mieux comprendre l'importance de l'échangeur NDCBE dans la régulation de la balance du sodium et le maintien de la pression artérielle, des souris NDCBE knock-out (*Ndcbe*^{-/-}) ont été étudiées.

Paramètres sanguins	0.3 % Na ⁺		0 % Na ⁺	
	<i>Ndcbe</i> ^{+/+} (9)	<i>Ndcbe</i> ^{-/-} (9)	<i>Ndcbe</i> ^{+/+} (10)	<i>Ndcbe</i> ^{-/-} (10)
pH	7.24 ± 0.01	7.28 ± 0.02*	7.24 ± 0.01	7.25 ± 0.01
PCO ₂ , mmHg	60.0 ± 1.5	52.2 ± 2.6*	58.9 ± 2.0	53.2 ± 1.8
c[HCO ₃ ⁻], mmol/L	24.6 ± 0.4	23.8 ± 1.1	24.2 ± 0.7	22.7 ± 0.7
PO ₂ mmHg	84.9 ± 3.9	93.7 ± 8.4	86.8 ± 6.9	84.3 ± 7.2
[Na ⁺], mmol/L	148.4 ± 1.4	146.6 ± 1.2	143.9 ± 2.7	146.7 ± 1.1
[K ⁺], mmol/L	3.38 ± 0.10	3.40 ± 0.18	3.65 ± 0.13	3.74 ± 0.15
[Cl ⁻], mmol/L	115.0 ± 0.8	113.1 ± 0.4	116.5 ± 1.0	116.6 ± 1.1

Tableau 1 Paramètres physiologiques sanguins des souris *Ndcbe*^{+/+} and *Ndcbe*^{-/-} avant et après un régime sans NaCl de 7 jours

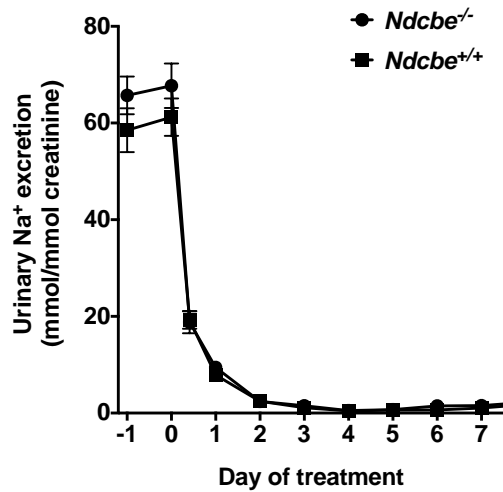
Les valeurs représentent les moyennes ± SEM, (n) = nombre de souris par groupe. La comparaison des groupes a été effectuée par le test t de Student non apparié. *p<0,05 ; **p<0,01 significatif par rapport au groupe de souris *Ndcbe*^{+/+}.

Paramètres urinaires	0.3 % Na ⁺		0 % Na ⁺	
	Ndcbe ^{+/+}	Ndcbe ^{-/-}	Ndcbe ^{+/+}	Ndcbe ^{-/-}
Urine output, ml/d	1,25 ± 0,24 (10)	2,06 ± 0,35 (10)	1,06 ± 0,3 (10)	1,49 ± 0,34 (10)
Na ⁺ , µmol/d	209,3 ± 23,6 (10)	263,7 ± 26,6 (10)	2,9 ± 0,7 (10)	4,5 ± 1,6 (10)
K ⁺ , µmol/d	205,5 ± 23,5 (10)	238,5 ± 25,6 (10)	181,2 ± 26,0 (10)	239,9 ± 29,4 (10)
Cl ⁻ , µmol/d	231,4 ± 30,1 (10)	284,7 ± 33,4 (10)	6,3 ± 2,3# (8)	3,1 ± 1,2# (9)
Cr, µmol/d	3,36 ± 0,28 (10)	3,62 ± 0,31 (10)	2,75 ± 0,30 (10)	3,29 ± 0,29 (10)

Tableau 2 Paramètres physiologiques urinaires des souris Ndcbe^{+/+} and Ndcbe^{-/-} avant et après un régime sans NaCl : # indique les valeurs de chlore après 2 jours de régime sans sel. Les valeurs représentent les moyennes ± SEM, (n) indique le nombre de souris par groupe. La comparaison des groupes a été effectuée par le test t de Student non apparié. *p<0,05 ; **p<0,01 significatif par rapport au groupe contrôle

Nous avons mesuré les paramètres sanguins (tableau 1) et urinaires (tableau 2) en régime normal chez les souris Ndcbe^{+/+} and Ndcbe^{-/-}. Aucune différence n'est à noter entre les deux groupes de souris. Comme attendu lorsque les souris ingèrent la même quantité de nourriture, il n'y a aucune différence d'excrétion de Na⁺ et Cl⁻. Pour tenter de mettre en évidence une perte rénale de NaCl chez les souris Ndcbe^{-/-}, la nourriture contenant une quantité de Na normale (0.3%) a été remplacée par un régime sans NaCl. Les niveaux urinaires de Na⁺ et Cl⁻ diminuent rapidement les premières 24 heures et aucune différence d'excrétion de Na et de Cl entre les deux groupes est observée (figure 2). Après 2 jours de déplétion sodée, un nouvel état d'équilibre est atteint.

Excretion urinaire de Na^+



Excretion urinaire de Cl^-

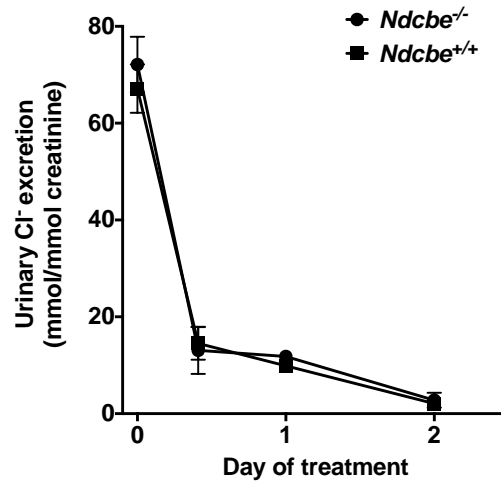


Figure 2 Effet du régime sans NaCl sur l'excrétion urinaire de Na^+ et de Cl^- . Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM, $n = 10$ souris par groupe. La comparaison des groupes a été effectuée par le test t de Student non apparié.

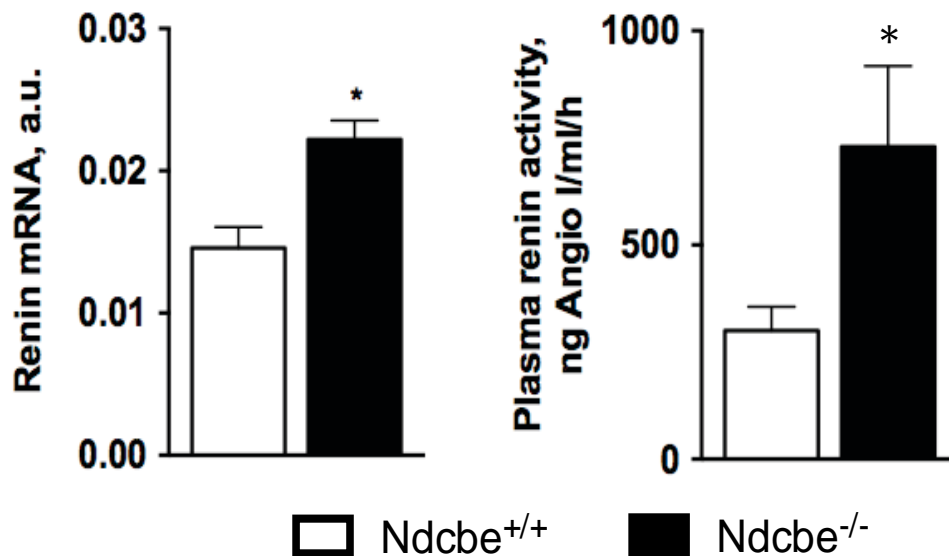


Figure 3 Mesure de l'expression de la rénine et de l'activité plasmatique de la rénine chez les souris sauvages (*Ndcbe*^{+/+}) et les souris NDCBE knock-out (*Ndcbe*^{-/-}) ayant reçues un régime normal en NaCl. L'expression de la rénine est mesurée par PCR quantitative (*Ndcbe*^{+/+} n=3 ; *Ndcbe*^{-/-} n=5) et l'activité rénine plasmatique par dosage radio-immunologique de l'angiotensine I générée par incubation de plasma en présence d'excès d'angiotensinogène (*Ndcbe*^{+/+} n=9 ; *Ndcbe*^{-/-} n=5). Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM. La comparaison des groupes a été effectuée par le test t de Student non apparié. *p<0,05 significatif par rapport au groupe de souris *Ndcbe*^{+/+}

Toutefois, la mesure de l'activité plasmatique de la rénine et de l'expression par PCR quantitative des ARNm codant pour la rénine dans des conditions normales montrent qu'elles sont légèrement mais significativement augmentées chez le souris *Ndcbe*^{-/-} (figure 3).

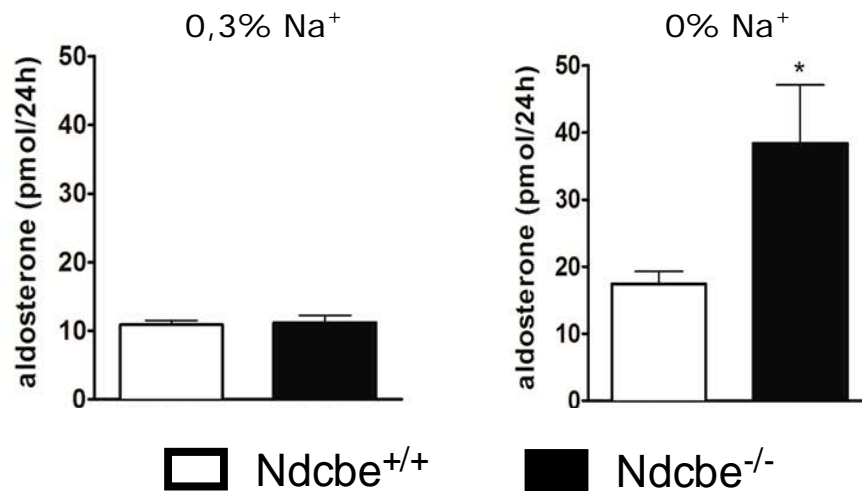


Figure 4 Effet d'un régime 0% Na sur l'excrétion urinaire d'aldostérone chez les souris sauvages Ndcbe^{+/+} et Ndcbe^{-/-}: La concentration d'aldostérone urinaire est mesurée par dosage radio-immunologique à partir de collection urinaire de 24h (n=7 dans chaque groupe) en régime normal et après 7 jours de régime sans NaCl. La comparaison des groupes a été effectuée par le test t de Student non apparié. *p<0,05 significatif par rapport au groupe de souris Ndcbe^{+/+}

De manière surprenante, malgré l'augmentation de l'expression et de l'activité de la rénine dans des conditions normales, nous n'observons aucune augmentation de la sécrétion d'aldostérone (figure 4). Par contre, en régime désodée, la sécrétion d'aldostérone est 2 fois plus importante chez les souris Ndcbe^{-/-} comparée aux souris sauvages. Ainsi, en régime désodé, les souris Ndcbe^{-/-} développent un hyperaldostéronisme secondaire. Donc, la légère augmentation de la rénine chez les souris invalidées pour Ndcbe et le développement d'un hyperaldostéronisme secondaire en réponse à une déplétion sodée suggèrent que ces souris présentent une déshydratation vasculaire modérée.

Les souris $Ndcbe^{-/-}$ présentent une hypotension qui peut être normalisée par un régime riche en sodium

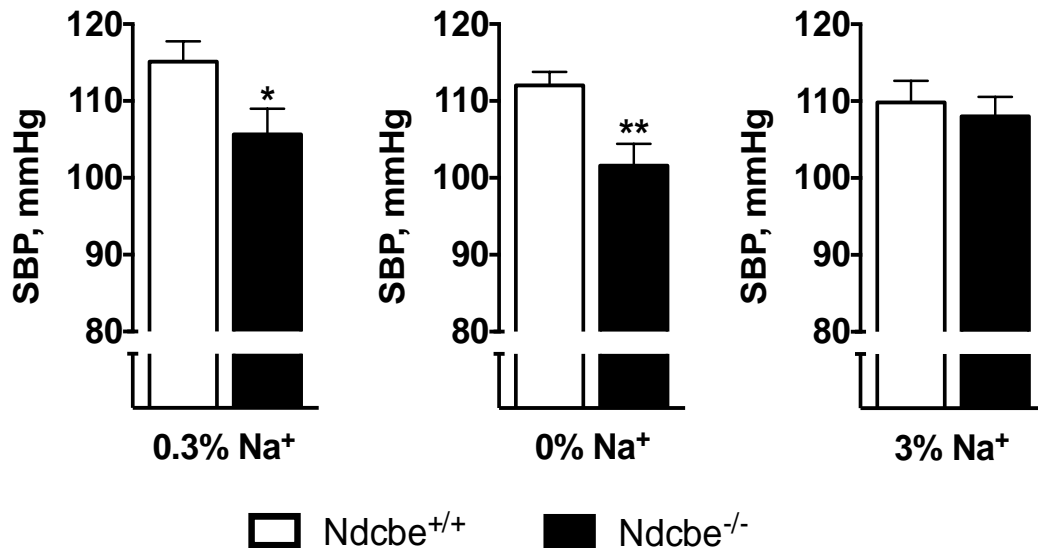


Figure 5 Mesure de la pression artérielle chez les souris sauvages $Ndcbe^{+/+}$ et $Ndcbe^{-/-}$. La pression artérielle a été mesurée à la queue sous trois différents régime, normal (0.3% Na⁺), sans NaCl (0% Na⁺) et riche en NaCl (3% Na⁺). Chaque régime a été administré pendant une période de deux semaines et les mesures de pression effectuée pendant la deuxième semaine. Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM. La comparaison des groupes a été effectuée par le test t de Student non apparié. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ significatif par rapport au groupe de souris $Ndcbe^{+/+}$

Nous avons ensuite mesuré la pression artérielle chez les souris $Ndcbe^{-/-}$ et sauvages (figure 5). Les résultats montrent qu'en régime normo sodé, les souris $Ndcbe^{-/-}$ présentent une hypotension. En régime désodé, l'hypotension des souris knock-out n'est pas aggravée. Par contre, avec un régime riche en NaCl, la pression artérielle retrouve une valeur normale comparée aux souris contrôles. Ces résultats montrent donc que l'hypotension observée est due à un défaut de la régulation du volume sanguin par le rein.

La perte de fonction de NDCBE est compensée par l'activation du cotransporteur NCC

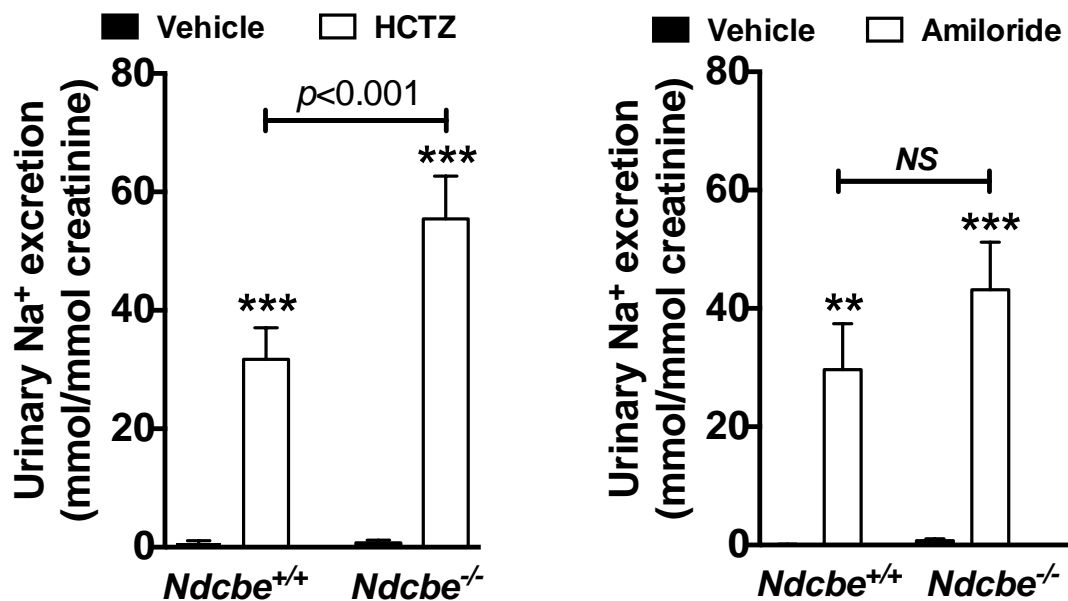


Figure 6 Effet de l'amiloride ou de l'hydrochlorothiazide (HCTZ) sur l'excrétion urinaire de Na⁺ chez des souris Ndcbe^{+/+} et Ndcbe^{-/-}. Les recueils d'urines sont effectués pendant deux jours consécutifs sur une période de 6 heures. Le premier jour, les souris reçoivent le matin une injection sous-cutanée du véhicule. Le deuxième jour, les souris reçoivent le matin une injection sous-cutanée d'amiloride (1,45mg/kg de masse corporelle) ou d'HCTZ (50 mg/kg de masse corporelle). Les urines des souris sont recueillies 6 heures après chaque injection. La quantité de sodium urinaire avant (barres noires) et après l'injection (barres blanches) est normalisée par la concentration en créatinine urinaire (en mmol) afin de prévenir les erreurs dues au recueil. 10 souris Ndcbe^{+/+} et 10 souris Ndcbe^{-/-} ont été étudiées. Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM. La comparaison des groupes a été effectuée par ANOVA suivie par le test de Bonferroni. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ avant versus après injection du diurétique.

Dans le but d'identifier les phénomènes compensatoires de réabsorption de NaCl suite à la perte de NDCBE nous avons traité les souris sauvages et Ndcbe knock-out à l'amiloride et à l'hydrochlorothiazide (HCTZ) (figure 6). Sous traitement amiloride, l'excrétion de sodium urinaire chez les souris Ndcbe^{-/-} n'est pas significativement différente comparée aux souris Ndcbe^{+/+}. Ce premier résultat montre que le canal ENaC n'est pas plus actif chez les souris Ndcbe^{-/-}. Sous traitement à l'HCTZ, on observe une

excrétion de sodium plus importante chez les souris *Ndcbe*^{-/-} montrant qu'elles sont plus sensibles à un traitement aux diurétiques thiazidiques que les souris sauvages. Cela signifie que l'activité de NCC est plus importante chez les souris *Ndcbe*^{-/-}.

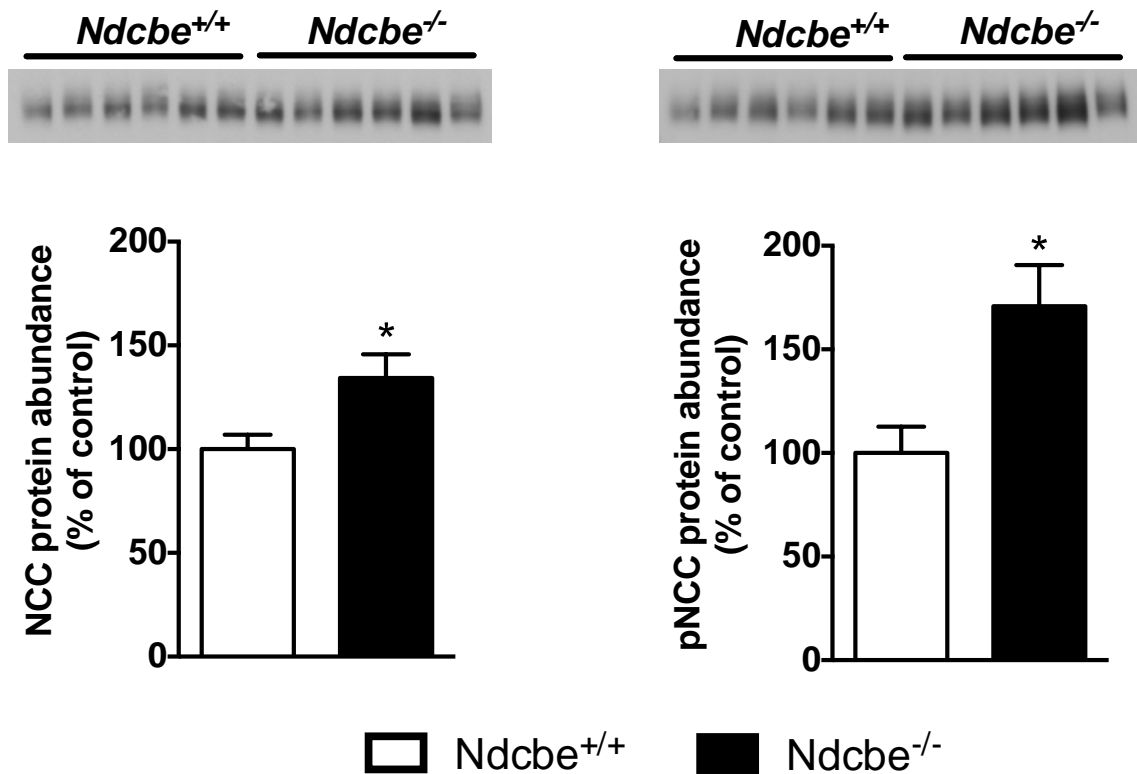


Figure 7 Expression du cotransporteur NCC (gauche) et NCC phosphorylé (pNCC) (droite). L'expression de NCC et phospho NCC est évaluée par des immunoblots réalisés sur des échantillons protéiques enrichies en membranes plasmiques préparés à partir de cortex rénaux de souris sauvages (barres blanches) et knock-out pour NDCBE (barres noires). Chaque puits est chargé avec 15 µg de protéines d'un échantillon préparé à partir d'une souris différente. Les valeurs représentent les moyennes ± SEM. La comparaison des groupes a été effectuée par le test t de Student non apparié. *p<0,05 significatif par rapport au groupe de souris *Ndcbe*^{+/+}

Nous avons ensuite mesuré l'expression de NCC et de sa forme phosphorylée, considérée comme la forme active de NCC, par des immunoblots semi-quantitatifs (figure 7). Les résultats montrent que la perte de NDCBE est compensée par une augmentation de l'expression et de l'activité du cotransporteur NCC.

Génération de souris *Ncc*/*Ndcbe* double knock-out

Afin de déterminer l'effet de l'inactivation de NCC chez les souris *Ndcbe*^{-/-}, des souris double knock-out pour NCC et NDCBE ont été générées (croisement de souris *Ncc*^{+/-} ; *Ndcbe*^{+/-} entre elles). Les souris ont été génotypées par PCR au sevrage. La population de souris analysées au sevrage (251 souris) présente des proportions conformes à celles attendues selon des lois de Mendel (test du Chi2).

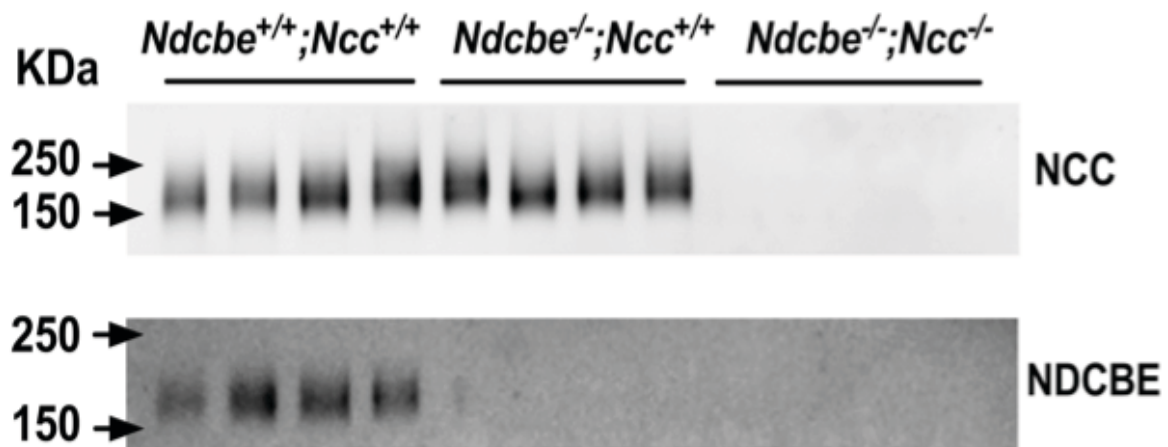


Figure 8 Expression de NCC (haut) et de NDCBE (bas) chez les souris *Ncc*^{+/+} ; *Ndcbe*^{+/+}, *Ncc*^{+/+} ; *Ndcbe*^{-/-} et *Ncc*^{-/-} ; *Ndcbe*^{-/-} : Les immunoblots ont été réalisés sur des préparations membranaires de rein de souris. Chaque puits est chargé avec 15 µg de protéines d'un échantillon préparé à partir d'une souris différente.

Les immunoblots de la figure 8 confirment l'absence à la fois de NCC et NDCBE chez les souris *Ncc*^{-/-} ; *Ndcbe*^{-/-}.

Paramètres sanguins	Ndcbe ^{+/+} ; Ncc ^{+/+} (3)	Ndcbe ^{-/-} ; Ncc ^{+/+} (5)	Ndcbe ^{-/-} ; Ncc ^{-/-} (4)
pH	7.27 ± 0.03	7.28 ± 0.01	7.32 ± 0.02
PCO ₂ , mmHg	54.0 ± 2.9	51.8 ± 1.8	53.0 ± 2.6
[HCO ₃ ⁻], mmol/L	20.5 ± 0.7	21.8 ± 0.9	23.0 ± 0.8*
[Na ⁺], mmol/L	151.0 ± 0.6	150.0 ± 0.8	149.0 ± 0.6
[K ⁺], mmol/L	4.10 ± 0.12	4.13 ± 0.15	4.03 ± 0.13
[Cl ⁻], mmol/L	114.8 ± 1.0	114.6 ± 0.7	111.5 ± 0.5*\$
Poids, g	31.8 ± 1.8	32.9 ± 2.2	32.3 ± 0.6

Tableau 3 Paramètres sanguins chez les souris sauvages (Ndcbe^{+/+};Ncc^{+/+}), simple knock-out Ndcbe (Ndcbe^{-/-};Ncc^{+/+}) et double knock-out Ncc et Ndcbe (Ndcbe^{-/-}; Ncc^{-/-}). Les valeurs représentent les moyennes ± SEM, (n) n=nombre de souris. La comparaison des groupes a été effectuée par le test t de Student non apparié. *p<0,05 significatif par rapport au groupe de souris Ndcbe^{+/+};Ncc^{+/+}. \$p<0.05 significatif par rapport au groupe de souris Ndcbe^{-/-}; Ncc^{+/+}

Hormis, une légère alcalose métabolique et une baisse de la chlorémie chez les souris Ncc^{-/-};Ndcbe^{-/-}, la mesure des paramètres sanguins ne révèlent aucune autre différence (tableau 3).

Les souris *Ncc/Ndcbe* double knock-out présentent une hypovolémie plus prononcée

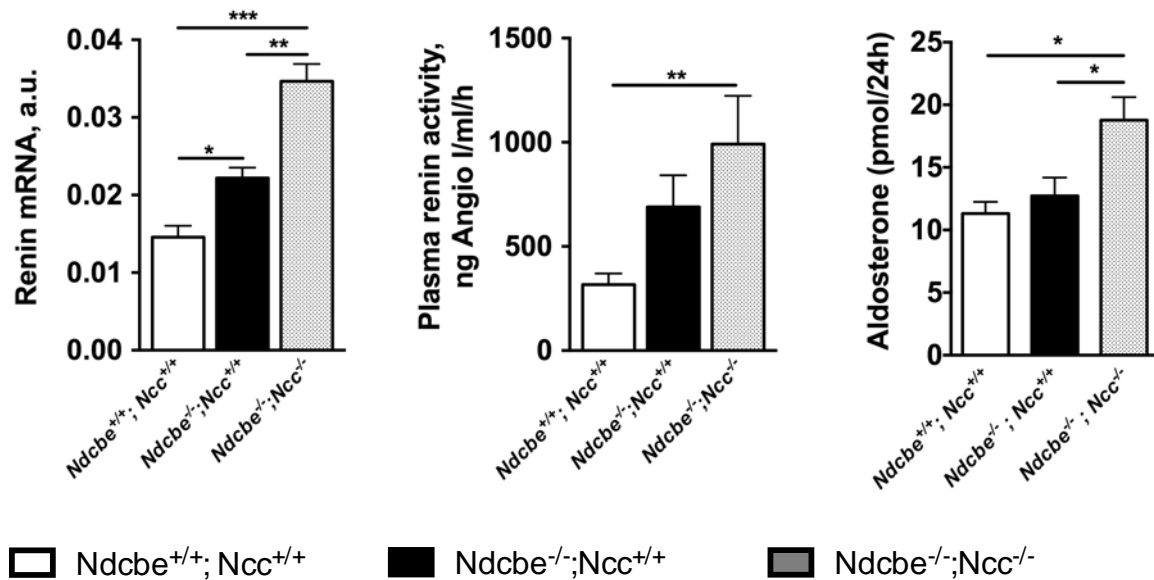


Figure 9 Etat du système Rénine-Angiotensine-Aldostérone chez les souris *Ncc*^{+/+};*Ndcbe*^{+/+}, *Ndcbe*^{-/-};*Ncc*^{+/+} et *Ncc*^{-/-};*Ndcbe*^{-/-}. L'expression de la rénine est mesurée par PCR quantitative chez 3 *Ncc*^{+/+};*Ndcbe*^{+/+}; 5 *Ndcbe*^{-/-};*Ncc*^{+/+} et 4 *Ncc*^{-/-};*Ndcbe*^{-/-}). L'activité rénine plasmatique est mesurée par dosage radioimmunologique de l'angiotensine I générée par incubation de plasma en présence d'excès d'angiotensinogène (11 *Ncc*^{+/+};*Ndcbe*^{+/+}; 8 *Ndcbe*^{-/-};*Ncc*^{+/+} and 6 *Ncc*^{-/-};*Ndcbe*^{-/-}). La concentration d'aldostérone urinaire est mesurée par dosage radioimmunologique sur les urines de 24h (9 *Ncc*^{+/+};*Ndcbe*^{+/+}; 11 *Ndcbe*^{-/-};*Ncc*^{+/+} and 5 *Ncc*^{-/-};*Ndcbe*^{-/-}). Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM. Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM. La comparaison des groupes a été effectuée par ANOVA suivi du test de Bonferroni. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Nous avons ensuite mesuré au niveau d'expression et d'activité de la rénine chez les souris double ko afin de voir si cette augmentation était encore plus importante (figure 9). Les mesures montrent que l'expression de la rénine et son activité sont plus élevées chez les souris *Ncc*^{-/-};*Ndcbe*^{-/-} par rapport aux souris sauvages et *Ndcbe*^{-/-}. De plus, on observe une augmentation significative de la sécrétion d'aldostérone chez les souris *Ncc*^{-/-};*Ndcbe*^{-/-}, laquelle n'avait pas été observée chez les souris *Ndcbe*^{-/-} en conditions standards. Ces résultats suggèrent que les souris double knock-out présentent une hypovolémie plus marquée que les souris *Ndcbe*^{-/-}.

Les transporteurs de sodium et chlore sont surexprimés chez les souris double ko pour NCC et NDCBE

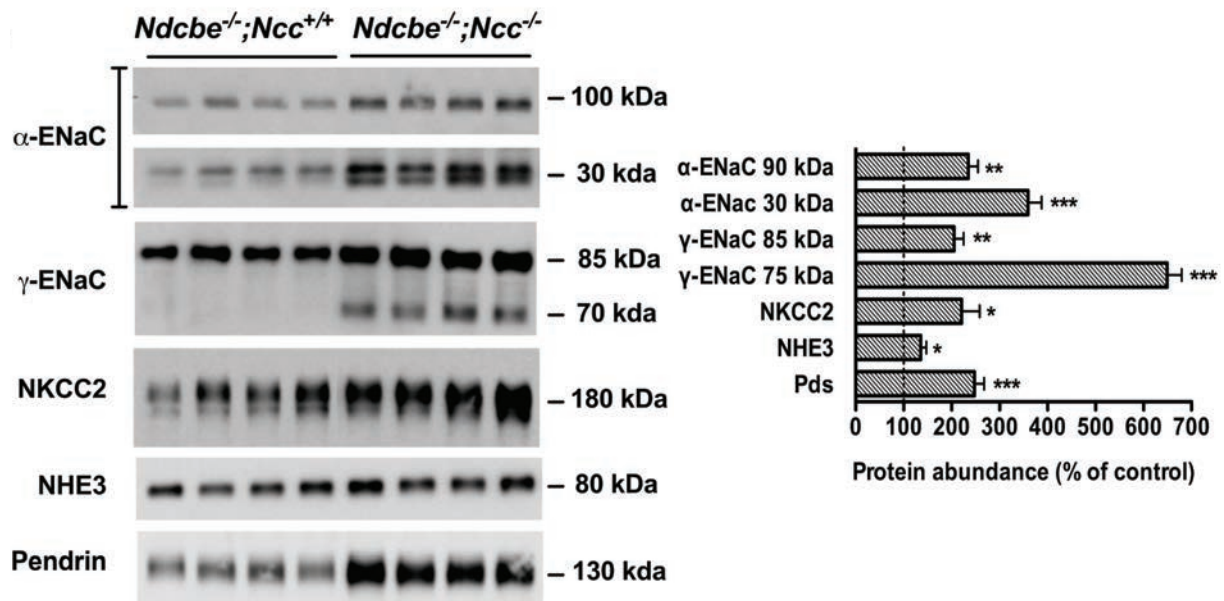


Figure 10 Expression d'autres transporteurs de Na^+ et de Cl^- chez les souris $\text{Ncc}^{-/-}$; $\text{Ndcbe}^{-/-}$ et $\text{Ncc}^{-/-}$; $\text{Ndcbe}^{-/-}$. Les immunoblots sont réalisés pour évaluer l'expression rénale des sous unités α et γ du canal ENaC, de NKCC2, de NHE3 et de la pendrine dans des préparations membranaires de cortex rénaux isolées à partir de souris $\text{Ndcbe}^{+/+}$; $\text{Ncc}^{+/+}$ et $\text{Ndcbe}^{-/-}$; $\text{Ncc}^{-/-}$. Chaque puits est chargé avec 15 μg de protéines d'un échantillon préparé à partir d'une souris différente. L'histogramme (à droite) représente l'analyse densitométrique des immunoblots (à gauche). Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM. La comparaison des groupes a été effectuée par le test t de Student non apparié. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ significatif par rapport au groupe de souris $\text{Ndcbe}^{+/+}$; $\text{Ncc}^{+/+}$.

Dans le but d'étudier l'effet de la perte de NCC chez les souris knock-out pour NDCBE, nous avons déterminé par western blot l'expression relative des transporteurs de Na^+ et de Cl^- (figure 10). L'étude montre que l'expression des sous-unités α et γ du canal ENaC, de NKCC2, de NHE3 et de la pendrine sont augmentées chez les souris $\text{Ncc}^{-/-}$; $\text{Ndcbe}^{-/-}$ comparées aux souris $\text{Ndcbe}^{-/-}$. La présence de la forme clivée de 70 kDa de la sous-unité γ du canal ENaC chez les souris $\text{Ncc}^{-/-}$; $\text{Ndcbe}^{-/-}$ suggèrent que ENaC est activé.

Le canal ENaC est plus actif chez les souris double knock-out NCC/NDCBE

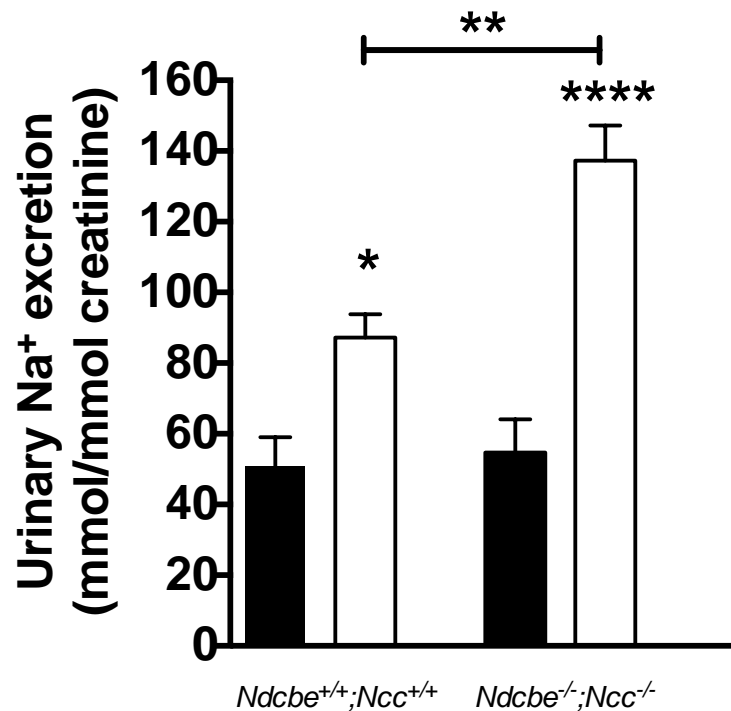


Figure 11 Effet de l'amiloride sur l'excrétion urinaire de Na⁺ chez des souris *Ndcbe*^{+/+};*Ncc*^{+/+} et *Ndcbe*^{-/-};*Ncc*^{-/-}. Les recueils d'urines sont effectués pendant deux jours consécutifs sur une période de 6 heures. Le premier jour, les souris reçoivent le matin une injection sous-cutanée du véhicule. Le deuxième jour, les souris reçoivent le matin une injection sous-cutanée d'amiloride (1,45mg/kg de masse corporelle). Les urines des souris sont recueillies 6 heures après chaque injection. La quantité de sodium urinaire avant (barres noires) et après l'injection (barres blanches) est normalisée par la concentration en créatinine urinaire (en mmol) afin de prévenir les erreurs dues au recueil. 5 souris *Ndcbe*^{+/+} et 4 souris *Ndcbe*^{-/-} ont été étudiées. Les valeurs représentent les moyennes ± SEM. La comparaison des groupes a été effectuée par ANOVA suivie par le test de Bonferroni. *p<0,05 ; ****p<0,0001 avant versus après injection du diurétique. **p<0.01, souris *Ndcbe*^{+/+} vs. *Ndcbe*^{-/-} après injection du diurétique

Afin de confirmer l'activation du canal ENaC chez les double ko, nous avons étudié l'effet de l'amiloride chez les souris sauvages *Ndcbe*^{+/+};*Ncc*^{+/+} et double knock-out *Ndcbe*^{-/-};*Ncc*^{-/-} sur l'excrétion urinaire de sodium (figure 11). Les souris double knock-out présentent une excrétion de sodium en réponse à l'amiloride significativement plus importante que celle des souris sauvages, suggérant que l'activité du

canal ENaC est plus importante chez les souris double knock-out $Ndcbe^{-/-}$; $Ncc^{-/-}$ par rapport aux souris sauvages.

Paramètres sanguins	$Ndcbe^{+/+}$; $Ncc^{+/+}$ (5)	$Ndcbe^{-/-}$; $Ncc^{-/-}$ (4)
pH	7,36 \pm 0,02	7,37 \pm 0,01
PCO ₂ , mmHg	48,3 \pm 3,2	48,8 \pm 2,1
[HCO ₃ ⁻], mmol/L	26,5 \pm 0,4	27,2 \pm 1,0
[Na ⁺], mmol/L	148,2 \pm 0,4	147,0 \pm 0,4
[Cl ⁻], mmol/L	110,0 \pm 0,6	107,5 \pm 0,9*
[K ⁺], mmol/L	4,57 \pm 0,06	3,60 \pm 0,07****
Hématocrite, %	41,5 \pm 0,3	44,5 \pm 0,6**
Renin activity, ng Angio I/mL/h	2001 \pm 267	6264 \pm 855**

Tableau 4 Paramètres sanguins chez les souris $Ncc^{+/+}$; $Ndcbe^{+/+}$ et $Ncc^{-/-}$; $Ndcbe^{-/-}$ en régime 0%NaCl : Les souris ont reçu un régime sans NaCl pendant 7 jours. Les paramètres sont mesurés à partir de sang prélevé à l'œil. Les souris sont anesthésiées sous isoflurane. Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM, (n) n=nombre de souris. La comparaison des groupes a été effectuée par le test t de Student non apparié.
*p<0,05 ; **p<0,01 ; ****p<0,0001 significatif par rapport au groupe de souris $Ncc^{+/+}$; $Ndcbe^{+/+}$

En régime désodé, les souris double knock-out $Ncc^{-/-}$; $Ndcbe^{-/-}$ présentent une hypovolémie sévère, comme en témoigne l'augmentation de l'hématocrite et la forte activité de la rénine plasmatique (tableau 4). Les souris double knock-out $Ncc^{-/-}$; $Ndcbe^{-/-}$ développent une hypokaliémie (Table 4) et une légère polyurie (1,22mL \pm 0,05 ; n=5 chez les souris sauvages contre 2.28mL \pm 0,11 chez les souris $Ncc^{-/-}$; $Ndcbe^{-/-}$; p<0,0001).

Discussion

Dans cette étude, nous montrons que l'expression de NDCBE est augmentée en réponse à un hyperaldostéronisme primaire ou secondaire qui active la réabsorption de NaCl dans le canal collecteur. L'inactivation génique de NDCBE conduit à une baisse modérée du volume vasculaire et de la pression sanguine, et ce malgré une compensation par le cotransporteur NCC. L'invalidation de NCC chez la souris knock-out pour NDCBE provoque une hypovolémie plus prononcée alors que l'expression des transporteurs principaux de Na⁺ et Cl⁻ est particulièrement augmentée chez les souris double knock-out *Ncc*^{-/-};*Ndcbe*^{-/-}. L'observation majeure de cette étude est que ces souris développent une déplétion volémique sévère et une hypokaliémie lorsqu'elles reçoivent un régime sans sel.

Nous avons déjà démontré que la perte de NDCBE abolit la réabsorption électroneutre de NaCl sensible aux diurétiques thiazidiques dans le tube collecteur cortical et proposé que NDCBE fonctionne en parallèle avec la pendrine (Leviel et al., 2010). Dans cette étude, nous démontrons le rôle physiologique de cet échangeur dans le maintien de la balance de Na⁺. Les souris knock-out pour *Ndcbe* présentent une activation du système rénine-angiotensine et une pression artérielle systémique plus basse, normalisée par une alimentation riche en sel. Ces résultats suggèrent fortement que la pression artérielle plus basse observée chez les souris knock-out NDCBE est la conséquence d'un volume vasculaire diminué. Ceci correspond aux résultats précédemment observés pour les souris knock-out pendrine, qui montrent une même augmentation de l'activité de la rénine confirmant une déshydratation vasculaire et une pression artérielle réduite sous un régime normosodé (Y. H. Kim et al., 2007). Nous nous sommes alors demandés dans quelle mesure la perte de NDCBE peut être compensée par d'autres transporteurs de sodium et chlore pour maintenir la balance du sodium. En effet, nous avons constaté

une forte augmentation de l'expression et de l'activité de NCC dans le rein de souris knock-out pour NDCBE. Inversement, les souris knock-out pour NCC montrent une forte stimulation de la réabsorption de NaCl par la voie NDCBE/pendrine dans le CCD (Leviel et al., 2010), ce qui explique pourquoi ces souris ne montrent qu'une déshydratation très modérée (Schultheis et al., 1998) (Loffing et al., 2004). Pour caractériser davantage le rôle de NCC chez les souris *Ndcbe*^{-/-}, nous avons généré des souris double knock-out pour ces deux transporteurs. En accord avec notre hypothèse proposant une compensation de la perte de NDCBE par NCC, ces souris présentent une déplétion volémique plus prononcée que les souris *Ndcbe*^{-/-}. L'administration de l'HCTZ, qui a été montré comme inhibant la voie NDCBE/pendrine dans les canaux collecteur isolés (Leviel et al., 2010) en plus de NCC dans le DCT, induit une diminution significative de l'expression de la pendrine et de NCC accompagnée d'une natriurèse transitoire et une déplétion volémique marquée après deux jours de traitement (M. Vallet et al., 2006) (Nijenhuis et al., 2003). De même, les souris invalidées à la fois pour NCC et la pendrine développent une déplétion volémique sévère et une insuffisance rénale (Soleimani et al., 2012). Par rapport à ces souris, le phénotype des souris *Ndcbe*^{-/-}; *Ncc*^{-/-} est étonnamment peu marqué. La suppression de la pendrine a été montrée comme diminuant l'expression et la localisation membranaire de γ -ENaC en réponse à une restriction de NaCl ou un traitement à l'aldostérone, ainsi qu'une inhibition de l'activité d'ENaC chez la souris traitée au furosémide (Y. H. Kim et al., 2007). Chez les souris *Ndcbe*^{-/-}; *Ncc*^{-/-}, l'expression de la pendrine et des sous-unités α et γ d'ENaC sont nettement augmentée, en particulier la forme de 70 kDa de γ -ENaC qui représente la forme active du canal ENaC. L'activité de ENaC est aussi augmentée chez ces souris. L'existence d'un lien fonctionnel entre la pendrine et les mécanismes de transport de Na⁺ dans le CCD, ENaC et NDCBE, a été proposée (Y. H. Kim et al., 2007) (Leviel et al., 2010). La suppression de la pendrine affecterait la voie de réabsorption de NaCl ENaC/pendrine mais aussi la voie NDCBE/pendrine alors que la

suppression de NDCBE préserverait l'absorption de NaCl par la voie ENaC/pendrine. L'augmentation de l'activité ENaC chez les souris double knock-out pour NCC et NDCBE devrait induire une hypokaliémie. Toutefois, la concentration de potassium dans le sang n'est pas diminuée de manière significative chez ces souris double knock-out en régime standard. Au cours d'un régime sans NaCl, les souris *Ndcbe*^{-/-}; *Ncc*^{-/-} développent une grave déplétion volémique et une hypokaliémie. Ce dernier résultat contraste avec ce qui a été observé chez les souris double knock-out pour la pendrine et NCC qui présentent une concentration de potassium dans le sang normale (Soleimani et al., 2012).

En conclusion, nous proposons que, dans le néphron distal sensible à l'aldostérone, en plus de NCC dans le tubule contourné distal, deux voies de réabsorption de NaCl coexistent dans le canal collecteur, le tandem ENaC/pendrine et le tandem NDCBE/pendrine, ce dernier jouant un rôle important dans la prévention de l'hypokaliémie pendant un régime sans NaCl.

II Rôle des cellules intercalaires dans la régulation de la balance du sodium

Introduction et objectif de l'étude

L'acidose tubulaire distale de type I (dRTA) est une anomalie du maintien de la balance acido-basique dans la partie distale du néphron. Elle est associée à une perte urinaire de sodium, chlore et potassium (Sebastian, McSherry, & Morris, 1971) (Sebastian, McSherry, & Morris, 1976) qui conduisent à déshydratation et une hypokaliémie. Le dRTA est également presque toujours associé par une hypercalciurie marquée provoquant la formation de calculs rénaux, une déminéralisation osseuse, néphrocalcinose et une insuffisance rénale chronique (Butler, 1936). Chez les enfants, le dRTA provoque un retard de croissance, une ostéopénie et un rachitisme. On observe parfois même une surdité. La maladie peut être transmise selon un mode autosomique récessif ou autosomique dominant. Le dRTA est connu pour être la conséquence de la mutation du gène ATP6V1B1 codant pour la sous-unité B1 de la pompe à proton H^+ -ATPase située du côté apicale des cellules intercalaires de type A et basolatéral des cellules β -intercalaires (Smith et al., 2000). Le dRTA peut aussi être dû à la mutation deux autres gènes, ATP6N1B (Karet et al., 1999) et SLC4A1 (Bruce et al., 1997). Le premier code pour la sous-unité A4 de la H^+ -ATPase, le second pour l'échangeur chlore/bicarbonate AE1 présent au pôle apical des cellules intercalaires de type A du canal collecteur. La H^+ -ATPase et AE1 sont nécessaires à l'extrusion des protons et des ions bicarbonates générés par l'anhydrase carbonique II cytoplasmique à partir de CO_2 . Si l'acidose peut être expliquée par l'inactivation de la pompe dans les cellules intercalaires de type A, les mécanismes impliqués dans la perte des sels ne sont pas clairs. Cependant Sebastian et al. montre que les anomalies persistent même si l'acidose est corrigée (Sebastian et al., 1971) (Sebastian et al., 1976). Ainsi, il a été suggéré que la néphrocalcinose est responsable de la perte de sels. Le transport de NaCl par les cellules β -intercalaires est dépendant de l'activité de la pompe à proton basolatérale. L'objectif de cette étude était de montrer que la perte de sel observée chez les patients dRTA où la pompe à proton H^+ -ATPase

est inactivée provient d'une inactivation du système pendrine/Ndcbe dans le canal collecteur.

Dans cette étude nous utilisons un modèle de souris knock-out pour la sous unités B1 de la H^+ -ATPase (Finberg et al., 2005). Ces souris développent une acidose comme attendue mais pas d'hypercalciurie, de néphrocalcinose ou de néphrite interstitielle.

Ainsi il s'agit d'un bon modèle pour étudier le mécanisme de la perte de sels chez les patients dRTA et plus particulièrement l'implication du dysfonctionnement des cellules β -intercalaires.

Des mutations inactivatrices de la sous-unité B1 de la H^+ -ATPase chez l'homme conduisent au développement d'une acidose tubulaire distale de type I qui est souvent associée à une perte rénale de sodium et de potassium. Dans un premier temps nous avons déterminé si les souris knock-out pour la sous-unité B1 de la pompe à proton ($ATP6V1B1^{-/-}$) présentent les mêmes anomalies que les patients dRTA.

Phénotypage des souris $Atp6v1b1^{-/-}$

Dans des conditions standard d'animalerie, les souris $Atp6v1b1^{-/-}$ présentaient, en plus du défaut attendu d'acidification des urines, une déshydratation (hyperréninisme -sans hyperaldostéronisme- et hyperprotidémie), une polyurie et une hypokaliémie avec une excrétion urinaire de K^+ identique à celle des souris sauvages indiquant un défaut de conservation du K^+ par le rein chez les souris $Atp6v1b1^{-/-}$.

Nous avons testé la capacité des souris $Atp6v1b1^{-/-}$ à s'adapter à un régime sans NaCl. Les souris sauvages ou transgéniques soumises à un tel régime diminuent rapidement leurs excrétions urinaires de Na^+ et de Cl^- . Cependant, la baisse de l'excrétion urinaire de Na^+ et de Cl^- étaient moins rapide chez les souris $Atp6v1b1^{-/-}$ que chez les souris contrôles, ce qui indique que les souris $Atp6v1b1^{-/-}$ ont une capacité réduite à

conserver le NaCl, comme le confirme une pression artérielle plus basse chez ces souris. Cette anomalie conduit à une déshydratation sévère avec un hyperaldostéronisme secondaire lorsque les souris sont soumises à un régime sans NaCl. Nous avons noté également que la polyurie et l'hypokaliémie des souris *Atp6v1b1*^{-/-} s'aggravait au cours de la restriction en NaCl.

Nous avons mesuré par la technique de microperfusion *in vitro* de CCD isolés à partir des reins de souris contrôles et *Atp6v1b1*^{-/-} les flux transépithéliaux de Na⁺ et de Cl⁻, et le voltage transépithélial. Les CCD isolés des souris *Atp6v1b1*^{-/-} montraient une réabsorption nette de Na⁺ et de Cl⁻ non significativement différente de zéro, une faible sécrétion de K⁺, et un voltage transépithélial très légèrement négatif. Les souris *Atp6v1b1*^{-/-} étant hypovolémiques, on aurait pu s'attendre à ce que les CCD isolés de ces souris réabsorbent du NaCl, sécrètent du K⁺ et développent un potentiel transépithélial négatif comme les CCD isolées des souris sauvages déplétées en NaCl. En conclusion, la perte rénale de NaCl des souris *Atp6v1b1*^{-/-} survient en partie au niveau du canal collecteur cortical, due à la perte d'activité du système pendrine/Ndcbe mais aussi de ENaC. Nous avons montré par la technique de western blot une quasi disparition de la pendrine et une baisse significative de l'expression des sous unités α - et γ -ENaC dans le cortex des souris *Atp6v1b1*^{-/-} alors que l'expression de ENaC était augmentée de façon appropriée dans le canal collecteur médullaire.

Ces résultats montrent que l'invalidation génique de la pompe à proton entraîne l'inactivation fonctionnelle de la pendrine. Dans la mesure où la pompe à proton et ENaC sont exprimés dans deux types cellulaires différents, l'absence d'activation de ENaC dans le canal collecteur cortical était particulièrement inattendue.

Ainsi, nous avons démontré que le transport de NaCl par les b-IC via le système de transport pendrine/Ndcbe est une étape nécessaire à la réabsorption de NaCl dans le canal collecteur cortical.

Contrôle des cellules principales par les cellules intercalaires : mise en évidence d'une cascade de signalisation ATP/PGE2

Au cours de notre étude des souris invalidées pour la sous-unité B1 de la H⁺-ATPase (Atp6v1b1^{-/-}) qui sont hypovolémiques, hypotentes, hypokaliémiques et polyuriques, nous avons noté que ENaC était inhibé dans le canal collecteur cortical alors que ENaC était régulé de façon appropriée (activé) dans le canal collecteur médullaire, ce qui suggère qu'un facteur libéré localement pourrait être responsable de l'inhibition de ENaC dans le cortex. Les β -ICs n'étant présentes que dans les canaux collecteurs corticaux, nous avons fait l'hypothèse que ces cellules libèrent un facteur inhibiteur de ENaC. Nous avons détecté dans les urines des souris Atp6v1b1^{-/-} de grandes quantités de PGE₂, une molécule connue pour ses propriétés natriurétiques. Nous avons montré que l'administration d'indométhacine, un inhibiteur des cyclooxygénases, des enzymes clés de la synthèse de PGE₂, normalise l'expression de ENaC dans le cortex des souris Atp6v1b1^{-/-}. L'indométhacine normalisait également la kaliémie et la diurèse des souris Atp6v1b1^{-/-} ainsi que l'expression des canaux potassique (maxi K) et à eau (AQP2). Nous avons également montré que l'inactivation pharmacologique de la pompe à proton des IC des canaux collecteurs corticaux isolés induit la libération de PGE₂ via l'activation des récepteurs purinergiques P2Y.

Dans cette étude, nous avons identifié une voie de signalisation paracrine ATP/PGE₂ en provenance des cellules intercalaires comme un mécanisme essentiel dans le développement du déséquilibre hydro-électrolytique associé à l'acidose tubulaire distale. Cette étude remet en question le rôle exclusif des cellules principales dans le paradigme actuel et ouvre un nouveau courant de pensée, à savoir que, les cellules intercalaires, comme les cellules principales, sont critiques pour le maintien de la balance du sodium, et donc, d'une pression artérielle normale.



Renal β -intercalated cells maintain body fluid and electrolyte balance

Victor Gueutin,¹ Marion Vallet,^{2,3} Maximilien Jayat,⁴ Janos Peti-Peterdi,⁵
Nicolas Cornière,^{2,3} Françoise Leviel,^{1,2,3} Fabien Sohet,¹ Carsten A. Wagner,⁶
Dominique Eladari,^{2,3,4} and Régine Chambrey⁴

¹INSERM UMRS 872, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France. ²Faculté de Médecine Paris-Descartes, Paris, France. ³Hôpital Européen Georges Pompidou, Département de Physiologie, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris France. ⁴INSERM U970, Paris Cardiovascular Research Center, Université Paris-Descartes, Paris, France. ⁵Department of Physiology and Biophysics, Keck School of Medicine, Zilkha Neurogenetic Institute, University of Southern California, Los Angeles, California, USA. ⁶Institute of Physiology and Zurich Center for Integrative Human Physiology (ZIHP), University of Zurich, Zurich, Switzerland.

Inactivation of the B1 proton pump subunit (ATP6V1B1) in intercalated cells (ICs) leads to type I distal renal tubular acidosis (dRTA), a disease associated with salt- and potassium-losing nephropathy. Here we show that mice deficient in ATP6V1B1 (*Atp6v1b1*^{-/-} mice) displayed renal loss of NaCl, K⁺, and water, causing hypovolemia, hypokalemia, and polyuria. We demonstrated that NaCl loss originated from the cortical collecting duct, where activity of both the epithelial sodium channel (ENaC) and the pendrin/Na⁺-driven chloride/bicarbonate exchanger (pendrin/NDCBE) transport system was impaired. ENaC was appropriately increased in the medullary collecting duct, suggesting a localized inhibition in the cortex. We detected high urinary prostaglandin E₂ (PGE₂) and ATP levels in *Atp6v1b1*^{-/-} mice. Inhibition of PGE₂ synthesis *in vivo* restored ENaC protein levels specifically in the cortex. It also normalized protein levels of the large conductance calcium-activated potassium channel and the water channel aquaporin 2, and improved polyuria and hypokalemia in mutant mice. Furthermore, pharmacological inactivation of the proton pump in β -ICs induced release of PGE₂ through activation of calcium-coupled purinergic receptors. In the present study, we identified ATP-triggered PGE₂ paracrine signaling originating from β -ICs as a mechanism in the development of the hydroelectrolytic imbalance associated with dRTA. Our data indicate that in addition to principal cells, ICs are also critical in maintaining sodium balance and, hence, normal vascular volume and blood pressure.

Introduction

The distal parts of the nephron, i.e., the connecting tubule (CNT) and the collecting duct, play a critical role in renal acid excretion, and thus in acid-base homeostasis (1, 2). Acid secretion is achieved by α -intercalated cells (α -ICs), a highly specialized renal cell type expressing an apical vacuolar H⁺-ATPase (v-H⁺-ATPase) and a basolateral Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger kAE1 (3, 4). Protons generated from the hydration of CO₂ within these cells are extruded actively across the apical membrane by the pump, while bicarbonate ions, which are also produced by this process, are translocated across the basolateral membrane by AE1. Dysfunction of either the pump or the anion exchanger can block proton secretion (1, 2). This failure of α -ICs to decrease urine pH results in insufficient acid excretion and accumulation of acid in the body. This defect characterizes “classical” (or type I) distal renal tubular acidosis (dRTA). Accordingly, inactivating mutations of *ATP6V1B1* (5) or *ATP6V0A4* (6) genes, which encode the B1 or the A4 subunits of the proton pump, respectively, or mutations of *SLC4A1* (7, 8), the gene encoding for the Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger kAE1, have been identified in patients with the inherited form of type I dRTA (4).

The characteristics of dRTA are not limited to abnormal acid-base balance, i.e., to acidemia of variable intensity, but often include a salt- and potassium-losing nephropathy that may lead to renal hypokalemia and dehydration (9, 10). dRTA is also almost invariably

complicated by a marked hypercalciuria resulting in kidney stones, bone demineralization, nephrocalcinosis, and ultimately chronic renal failure. Since α -ICs are dedicated to acid secretion and are not thought to play a role in sodium absorption or in potassium secretion, the pathophysiology of the aforementioned sodium and potassium losses observed in patients suffering from dRTA is not well understood. These losses were initially believed to be consecutive to a direct effect of acidosis to depress several transporters along the nephron (11). However, Sebastian et al. demonstrated that sustained correction of acidemia in patients suffering from type I dRTA does not reverse the abnormalities in renal sodium or potassium handling (9, 10). Based on these observations, the authors concluded that impairments in renal sodium and potassium conservation may not be a reversible consequence of acidosis but instead may be consecutive to chronic interstitial nephropathy and nephrocalcinosis. However, the molecular defects that lead to inactivation of the proton pump, i.e., inactivating mutations of *ATP6V1B1* or *ATP6V0A4*, which are frequent mutations observed in human patients, are not expected to affect only α -ICs. In fact, the proteins encoded by these genes are also expressed by the β (or base-secreting) subtype of ICs (β -ICs) that is also present in the distal nephron (12, 13). These cells share some of the characteristics with the α -ICs but with an opposite polarity, i.e., they express the v-H⁺-ATPase basolaterally and the Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger pendrin (SLC26A4) at their apical membrane (14). Until recently, β -ICs were thought to be exclusively involved in base secretion. However, this paradigm has been challenged by recent observations showing that β -ICs exhibit electroneutral NaCl absorption (15, 16) and participate in the renal regulation of extracellular volume and blood pressure

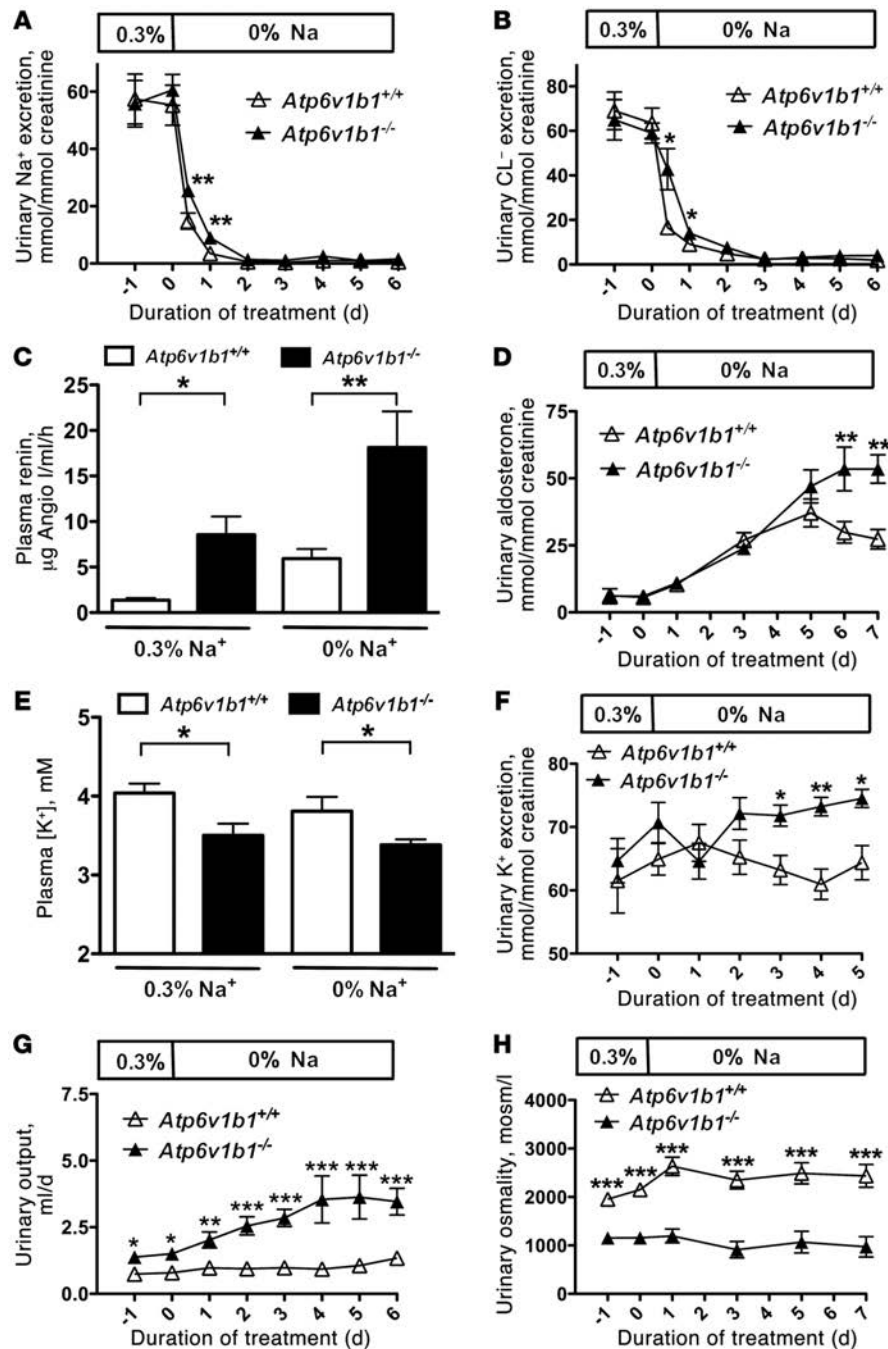
Authorship note: Victor Gueutin, Marion Vallet, and Maximilien Jayat contributed equally to this work.

Conflict of interest: The authors have declared that no conflict of interest exists.

Citation for this article: *J Clin Invest.* 2013;123(10):4219–4231. doi:10.1172/JCI63492.



research article

**Figure 1**

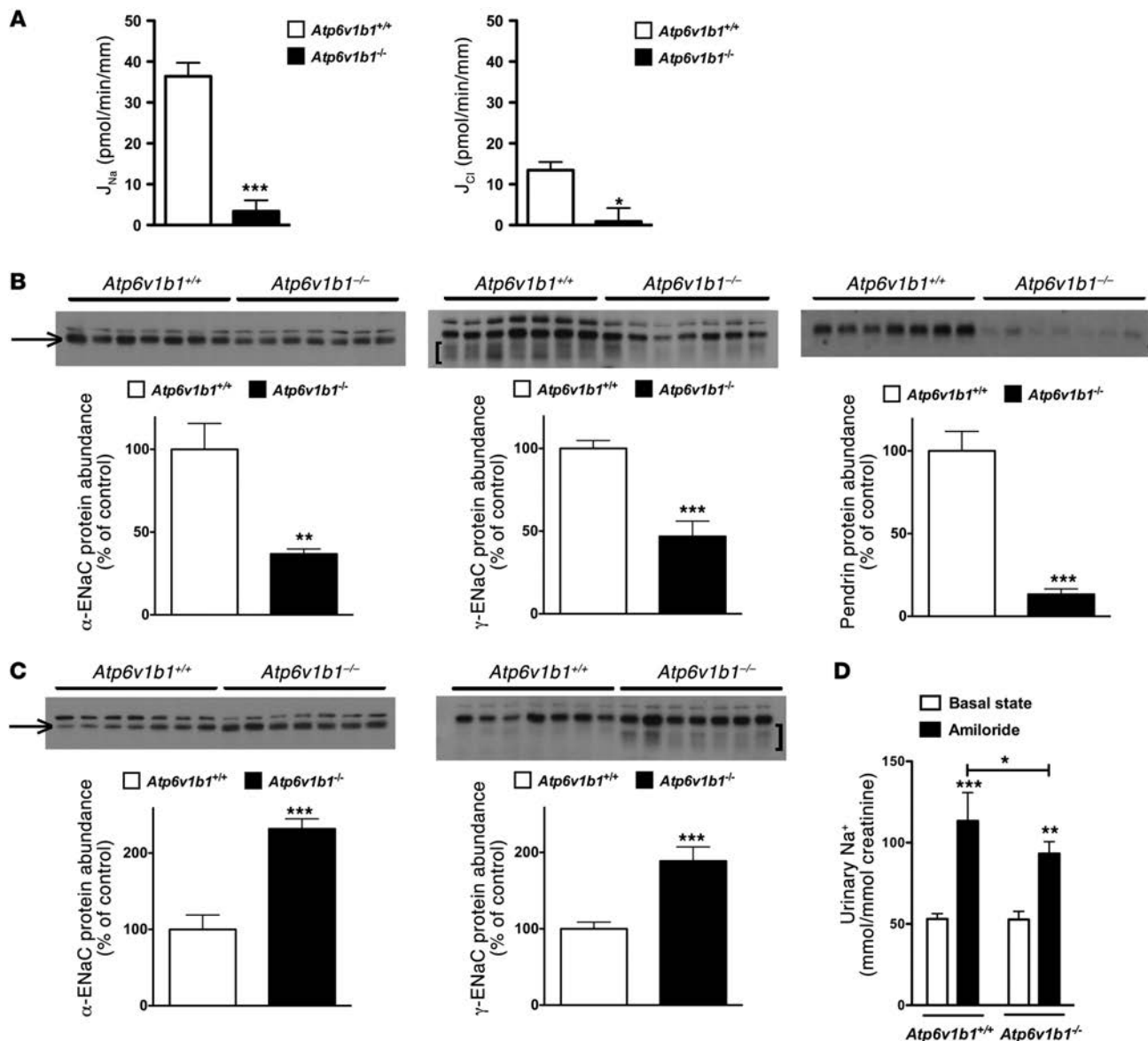
Effects of dietary NaCl restriction and renal K⁺ and water handling in *Atp6v1b1*^{-/-} mice. (A) Time course of renal excretion of Na⁺ in *Atp6v1b1*^{-/-} and *Atp6v1b1*^{+/+} mice fed a normal-salt diet and then switched to a NaCl-restricted diet. (B) Time course of renal Cl⁻ excretion. (C) Plasma renin concentration was measured on a normal-salt diet and after 6 days of NaCl restriction. (D) Time course of urinary excretion of aldosterone. (E) Plasma [K⁺] was measured in *Atp6v1b1*^{-/-} and *Atp6v1b1*^{+/+} mice fed a normal-salt diet or after 6 days of NaCl restriction. (F) Time course of renal K⁺ excretion when animals shown in E were switched from normal to NaCl-restricted diet. (G) Time course of urine output. (H) Time course of urine osmolality. Data are presented as means ± SEM; *n* = 8 for *Atp6v1b1*^{+/+} and *n* = 7 for *Atp6v1b1*^{-/-}. Statistical significance was assessed using an unpaired Student's *t* test. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, and ****P* < 0.001 vs. *Atp6v1b1*^{+/+}.

sure (17, 18). In β-ICs, apical Cl⁻ influx, which occurs through the Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger pendrin, is linked to apical Na⁺ influx by the Na⁺-driven Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger NDCBE (15, 16). Thus, in theory, mutations that directly affect the proton pump are expected to impair both α-IC and β-IC functions, thereby affecting not only acid secretion but also NaCl absorption.

Finberg et al. generated a mouse model with disruption of the *Atp6v1b1* gene encoding for the β1 subunit of the H⁺-ATPase as a model of human dRTA (19). As expected from human studies, mice with *Atp6v1b1* disruption (*Atp6v1b1*^{-/-}) exhibit an impaired response to acid loading (19). However, these mice slightly dif-

fer from patients, in that they do not have overt acidemia under standard laboratory conditions. They also do not exhibit hypercalciuria and develop neither nephrocalcinosis nor interstitial nephritis. Hence, these knockout mice represent an interesting model to study the mechanisms that account for impaired sodium and potassium conservation in patients with dRTA consecutive to dysfunction of the proton pump, and particularly, to assess the involvement of β-IC dysfunction in this model.

Therefore, our goal was to determine whether *Atp6v1b1* disruption leads to a salt- and potassium-losing nephropathy as observed in human dRTA, and then to determine the mecha-

**Figure 2**

Differential effects of *Atp6v1b1* disruption on the cortical and MCD. **(A)** Effects of *Atp6v1b1* disruption on $NaCl$ transport in the CCD. J_{Na} and J_{Cl} were measured in CCDs isolated from *Atp6v1b1^{+/+}* mice and *Atp6v1b1^{-/-}* mice fed a salt-depleted diet for 2 weeks. $n = 5-7$ tubules from different mice in each group. * $P < 0.05$. *** $P < 0.001$, 2-tailed unpaired Student's *t* test. **(B)** Effects of *Atp6v1b1* disruption on ENaC and pendrin expression in the CCD. α -ENaC, γ -ENaC, and pendrin protein abundance were assessed with Western blot of protein extracted from the renal cortex of *Atp6v1b1^{-/-}* and *Atp6v1b1^{+/+}* mice. **(C)** Effects of *Atp6v1b1* disruption on ENaC expression in the MCD. α -ENaC and γ -ENaC protein abundance was assessed with Western blot of protein extracted from the renal medulla of *Atp6v1b1^{-/-}* and *Atp6v1b1^{+/+}* mice. **(B and C)** Lanes were loaded with a protein sample from different mice, with 15 μ g (**B**) and 5 μ g (**C**) proteins per lane; equal loading confirmed by parallel Coomassie-stained gels. The α -ENaC antibody recognized 2 bands at 90 and 100 kDa. Bands at 90 kDa (arrows) were not detected in kidneys from α -ENaC knockout mice, and were quantified. The γ -ENaC antibody recognized a doublet band at 85–80 kDa and a large band centered around 70 kDa (brackets). Bar graphs summarize densitometric analyses of doublet 85-kDa and broad 70-kDa bands. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. *Atp6v1b1^{+/+}*, unpaired Student's *t* test. **(D)** Effect of amiloride on urinary Na^+ excretion in *Atp6v1b1^{+/+}* and *Atp6v1b1^{-/-}* mice. Urines were collected before and 6 hours after amiloride injection (1.45 mg/kg BW) into *Atp6v1b1^{+/+}* and *Atp6v1b1^{-/-}* mice. * $P < 0.05$ vs. *Atp6v1b1^{+/+}* after amiloride injection; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. basal state; 1-way ANOVA.

nisms by which dysfunction of the proton pump affects the transport of Na^+ , Cl^- , and K^+ . Here we report that impaired renal sodium and potassium conservation observed in type I dRTA is not the consequence of acidosis or of chronic interstitial nephritis, but is instead the consequence of the proton pump

defect in β -ICs. We demonstrate that in mice with *Atp6v1b1* disruption, β -ICs impair functions of neighboring principal cells (PCs), which normally transport sodium, water, and potassium, through the paracrine ATP/prostaglandin E_2 (ATP/PGE₂) signaling cascade. Furthermore, gain of ATP-triggered PGE₂ signal-



research article

Table 1

Densitometric analyses of immunoblots on renal cortex and medulla homogenates from *Atp6v1b1*^{+/+} and *Atp6v1b1*^{-/-} mice without treatment and during indomethacin treatment (5 mg/kg/d for 48 hours) fed a normal-salt diet (0.3% Na⁺)

	No treatment		48 hours indomethacin	
	<i>Atp6v1b1</i> ^{+/+} (n = 7)	<i>Atp6v1b1</i> ^{-/-} (n = 7)	<i>Atp6v1b1</i> ^{+/+} (n = 6)	<i>Atp6v1b1</i> ^{-/-} (n = 6)
Cortex				
α-ENaC	100 ± 9.0	48.0 ± 3.0 ^A	100 ± 7.1	74.6 ± 10.4
γ-ENaC (total)	100 ± 4.8	46.7 ± 9.3 ^A	100 ± 4.1	104.6 ± 4.1
Pendrin	100 ± 1.8	13.3 ± 3.3 ^A	100 ± 3.3	16.5 ± 4.4 ^A
AQP2 (total)	100 ± 7	59 ± 13 ^B	100 ± 8.6	137.3 ± 19.5
α-BKCa	100 ± 9	163.3 ± 5.2 ^A	100 ± 4.6	97.6 ± 3.4
β-Actin	100 ± 6.2	107.2 ± 4.6	100 ± 6.2	101.4 ± 4.0
Medulla				
α-ENaC	100 ± 18.9	231.6 ± 13.1 ^A	100 ± 23.9	362.6 ± 23.1 ^A
γ-ENaC (total)	100 ± 8.8	188.8 ± 18.5 ^A	100 ± 11.3	193.2 ± 12.4 ^A
AQP2 (total)	100 ± 3.0	30.1 ± 8.3 ^A	100 ± 7.1	78.4 ± 13.1
α-BKCa	100 ± 10	258.8 ± 14 ^A	100 ± 11.1	101.3 ± 4.0
ROMK	100 ± 21	176 ± 10 ^C	100 ± 24	185 ± 5 ^C
β-Actin	100 ± 5.7	103.6 ± 5.5	100 ± 11.6	114 ± 4.3

Data (mean ± SEM) are expressed as percent of control. ^A*P* ≤ 0.001, ^B*P* < 0.05, ^C*P* < 0.01 vs. wild-type, unpaired Student's *t* test.

ing alters electrolytes and water balance in a paracrine manner. Beyond the inherited distal tubular acidosis, our findings also challenge the existing paradigm on the exclusive role of PCs and offer the new view that ICs and PCs are both critical in maintaining sodium balance and, thus, normal vascular volume.

Results

Atp6v1b1^{-/-} mice have an impaired ability to conserve Na⁺, Cl⁻, K⁺, and water despite the absence of interstitial nephritis or nephrocalcinosis. To test whether *Atp6v1b1*^{-/-} mice have an impaired renal ability to conserve Na⁺ and Cl⁻, physiological blood and urine parameters were measured in *Atp6v1b1*^{-/-} mice and their wild-type counterparts (*Atp6v1b1*^{+/+}) that were pair-fed either a normal (0.3% Na⁺) or a Na⁺-free diet (all data are summarized in Supplemental Table 1; supplemental material available online with this article; doi:10.1172/JCI63492DS1). As shown in Figure 1, urinary excretion of Na⁺ and Cl⁻ was similar in both groups when the animals were fed a normal diet. During the first 24 hours of NaCl restriction, *Atp6v1b1*^{-/-} mice excreted more Na⁺ (Figure 1A) and Cl⁻ (Figure 1B) than pair-fed wild-type mice. However, within 3 days of NaCl restriction, all mice reached steady state, resulting in similar rates of Na⁺ and Cl⁻ excretion in both genotypes. We also observed that *Atp6v1b1*^{-/-} mice, even when fed a normal-salt diet, exhibited hallmarks of vascular dehydration, as evident from increased plasma renin activity (PRA) (Figure 1C) and plasma protein concentrations (45.7 ± 0.8 g/l in *Atp6v1b1*^{+/+} vs. 50.2 ± 1.2 g/l in *Atp6v1b1*^{-/-}, *n* = 10 and 9, respectively; *P* = 0.005) (Supplemental Table 1). In addition, *Atp6v1b1*^{-/-} mice exhibited lower systolic blood pressure (112.4 ± 2.8 mmHg in *Atp6v1b1*^{+/+} vs. 95.4 ± 2.5 mmHg in *Atp6v1b1*^{-/-}, *n* = 10 and 6, respectively; *P* < 0.001). The development of marked secondary hyperaldosteronism in *Atp6v1b1*^{-/-} mice subjected to NaCl restriction (Figure 1D) further suggests the presence of vascular dehydration in these animals. Taken together, these observations indicate that *Atp6v1b1*^{-/-} mice have vascular dehydration and an impaired renal ability to conserve both Na⁺ and Cl⁻, and hence, that they have salt-losing nephropathy.

Under basal conditions *Atp6v1b1*^{-/-} mice exhibited a lower plasma K⁺ concentration (Figure 1E) than control mice but an appropriately normal urinary excretion of K⁺ (Figure 1F). Moreover, when animals were subjected to NaCl restriction (i.e., under conditions of maximal stimulation of aldosterone), urinary excretion of K⁺ in mutant animals was exacerbated and became higher (i.e., inappropriate for hypokalemia) than in controls (Figure 1F), demonstrating a renal defect in K⁺ conservation.

In addition, we noticed that *Atp6v1b1*^{-/-} mice exhibited polyuria that was also dramatically magnified by salt restriction (Figure 1G). Figure 1H shows that urine produced by *Atp6v1b1*^{-/-} mice had a lower osmolality (1,160 ± 124 mOsmol/kg; *n* = 7) than that of wild-type mice (2,151 ± 31 mOsmol/kg; *n* = 8) under a normal-Na⁺ diet. A Na⁺-depleted diet had no significant effect on urine osmolalities (2,437 ± 236 mOsmol/kg in wild-type mice vs. 971 ± 211 mOsmol/kg in knockout mice; *n* = 8 and 6, respectively).

These experiments demonstrate that *Atp6v1b1* disruption leads to a complex tubulopathy, which recapitulates major features observed in some patients suffering from classic type I dRTA and which have been attributed to chronic interstitial nephritis. However, careful examination by light microscopy of kidney sections from *Atp6v1b1*^{-/-} mice demonstrated the absence of interstitial nephritis, and no evidence of microscopic nephrocalcinosis was found in sections examined after Von Kossa staining (Supplemental Figure 1).

Atp6v1b1 gene deletion inhibits epithelial Na channel in the cortical collecting duct but not in the medullary collecting duct. *Atp6v1b1* disruption leads to markedly reduced proton pump activity in α-ICs (19, 20) and possibly also in β-ICs. Pharmacologic blockade of the pump has been shown to inhibit pendrin-dependent Cl⁻ absorption by cortical collecting duct (CCDs) (21). Therefore, we hypothesized that *Atp6v1b1* disruption should reduce the electroneutral NaCl transport system via β-ICs that we recently described and that requires normal pendrin activity (16). To test this hypothesis, Na⁺ and Cl⁻ transepithelial fluxes (J_{Na} and J_{Cl}, respectively) were measured in CCDs isolated from *Atp6v1b1*^{-/-} mice fed either a normal or low-salt diet. In a previous study we showed that CCDs isolated from wild-type mice fed a nor-

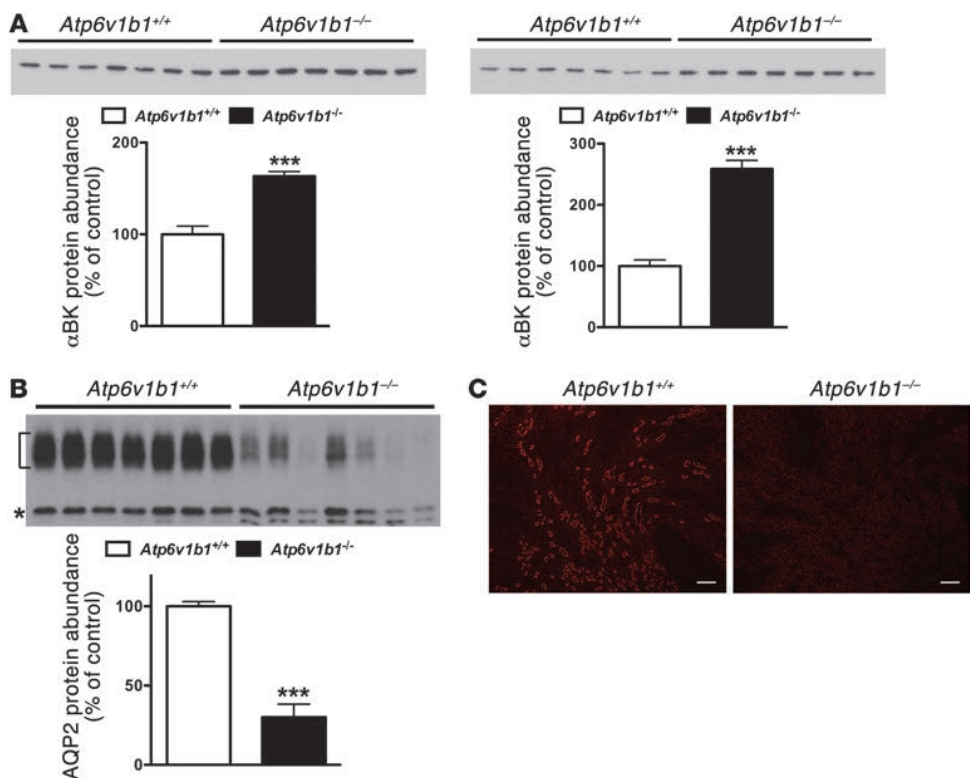


Figure 3 BKCα and AQP2 protein expression assessed in *Atp6v1b1*^{-/-} and *Atp6v1b1*^{+/+} mice. **(A)** Western blot for α-BKCα on renal cortex (left) or renal medulla (right). Each lane was loaded with a protein sample from a different mouse; 15 μg and 5 μg proteins were loaded per gel lane for cortical samples and medullary samples, respectively. **(B)** Western blot for AQP2 on renal medulla. Bracket and asterisk show the glycosylated 37-kDa and the unglycosylated 25-kDa forms of AQP2, respectively. Each lane was loaded with a protein sample from a different mouse; 5 μg proteins were loaded per gel lane. Equal loading was confirmed by parallel Coomassie-stained gels. Bar graphs summarize densitometric analyses. For AQP2, bar graphs summarize bracketed and asterisked bands. ****P* < 0.01 vs. *Atp6v1b1*^{+/+}, unpaired Student's *t* test. **(C)** Immunohistochemistry of kidney sections showing AQP2 staining in renal medulla from *Atp6v1b1*^{+/+} and *Atp6v1b1*^{-/-} mice. Scale bars: 250 μm.

mal-salt diet do not exhibit any detectable transport activity, whereas CCDs isolated from mice fed a salt-depleted diet absorb NaCl through the epithelial Na⁺ channel (ENaC) in PCs and the pendrin/Ndcbe transport system in ICs (16). As *Atp6v1b1*^{-/-} mice fed a normal-salt diet exhibited higher PRA (similar to that of wild-type mice maintained on salt-depleted diet for 6 days), one would have expected their CCDs to absorb NaCl similarly as CCDs from wild-type mice maintained on a salt-depleted diet. However, CCDs isolated from *Atp6v1b1*^{-/-} mice were not able to absorb Na⁺ or Cl⁻ (*J*_{Na} = -4.23 ± 4.43 and *J*_{Cl} = -4.05 ± 6.92 pmol/min/mm; *n* = 5). This was also the case for CCDs isolated from *Atp6v1b1*^{-/-} mice fed a salt-depleted diet (Figure 2A), in which *J*_{Na} and *J*_{Cl} were approximately 10-fold less than in *Atp6v1b1*^{+/+} mice fed a salt-depleted diet. These results suggest that in addition to impairing electroneutral Na⁺ absorption through ICs, *Atp6v1b1* disruption also inhibits Na⁺ absorption mediated by ENaC through the neighboring PCs. Since ENaC is expressed exclusively in PCs, *Atp6v1b1* disruption was not expected to directly affect electrogenic Na⁺ absorption by CCD.

To dissect the mechanisms by which *Atp6v1b1* disruption impairs NaCl reabsorption in the CCD, we next performed semiquantitative immunoblotting to measure pendrin and ENaC protein abundance in the renal cortex of *Atp6v1b1*^{-/-} mice under basal conditions. Figure 2B shows that abundances of both α-ENaC and γ-ENaC were approximately 50% lower in knockout mice than in wild-type mice. Pendrin protein level was reduced by 80% when compared with controls (Figure 2B). Data are summarized in Table 1. Taken

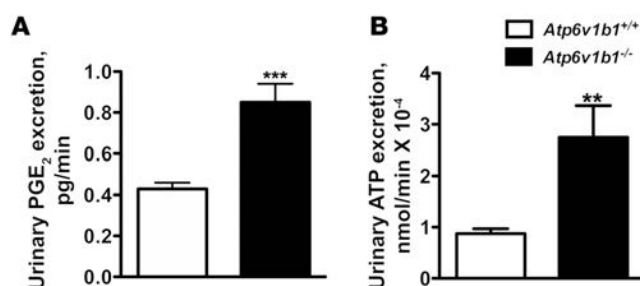
Table 2 Physiologic parameters from *Atp6v1b1*^{-/-} mice before and during indomethacin treatment

	Basal state	Indomethacin	
		24 h	48 h
Weight, g	24.4 ± 0.6	25.2 ± 0.6	25.0 ± 0.7
Food intake, g	4.18 ± 0.19	4.07 ± 0.24	3.79 ± 0.23
Water intake, g	7.69 ± 0.81	7.17 ± 0.73	6.72 ± 0.39
Urine output, ml/24 h	2.73 ± 0.2	1.97 ± 0.18 ^A	1.98 ± 0.21 ^B
Urine osmolality, mosm/l	1564 ± 70	2048 ± 134 ^A	1986 ± 122 ^A
Urine Na, μmol/24 h	248 ± 13	173 ± 31 ^B	200 ± 33
Urine K, μmol/24 h	697 ± 24	596 ± 50	574 ± 38 ^B

Values are means ± SEM. *n* = 12 mice. ^A*P* ≤ 0.01, ^B*P* < 0.05 vs. basal state, unpaired Student's *t* test.



research article

**Figure 4**

Effects of *Atp6v1b1* disruption on urine excretion of PGE₂ and ATP. (A and B) Urinary excretion of PGE₂ (A) and ATP (B) in *Atp6v1b1*^{-/-} and *Atp6v1b1*^{+/+} mice. Data are means ± SEM. For PGE₂, *n* = 26–27 mice in each group. For ATP, *n* = 15 mice in each group. ***P* < 0.01 vs. *Atp6v1b1*^{+/+}; ****P* < 0.001 vs. *Atp6v1b1*^{+/+}, unpaired Student's *t* test with Welch's correction.

together, our results demonstrate that *Atp6v1b1* disruption inhibits electroneutral NaCl absorption by reducing pendrin expression in β -ICs, but also impairs PC function by decreasing ENaC expression and function. Of interest, mice with gene disruption of pendrin have been shown to exhibit similar alterations in ENaC abundance as *Atp6v1b1*^{-/-} mice (22). We next studied the effects of *Atp6v1b1* disruption in the medullary collecting duct (MCD), a nephron segment that contains exclusively PCs and α -ICs but does not have β -ICs. Figure 2C and Table 1 show that in the renal medulla, in contrast to our observations in the renal cortex, abundance of both α and γ subunits of ENaC were dramatically increased in knockout mice, as expected from mice with secondary hyperaldosteronism. Unfortunately, we could not measure Na⁺ fluxes in MCDs, as this segment is not easily accessible for in vitro micropuncture. Alternatively, we estimated total ENaC activity in *Atp6v1b1*^{-/-} mice by assessing the effects of an acute injection of amiloride (1.45 mg/kg of BW) on urinary excretion of Na⁺. Amiloride injection significantly increased urine Na⁺ excretion in both genotypes and was only slightly less effective in *Atp6v1b1*^{-/-} mice than in controls (Figure 2D), indicating that ENaC-dependent Na⁺ absorption in the distal nephron is slightly lower in *Atp6v1b1*^{-/-} mice. These results suggest that decreased ENaC activity in the CNT/CCD is almost fully compensated by increased ENaC activity in the MCD. In summary, our results show that β -IC dysfunction consecutive with *Atp6v1b1* disruption inhibits NaCl absorption and impairs the sensitivity of PCs to renin-angiotensin-aldosterone system activation in the CCD, while PCs in the MCD have a normal response to hyperaldosteronism. Our results strongly suggest that a factor originating from the β -ICs locally reduces ENaC activity in the cortex.

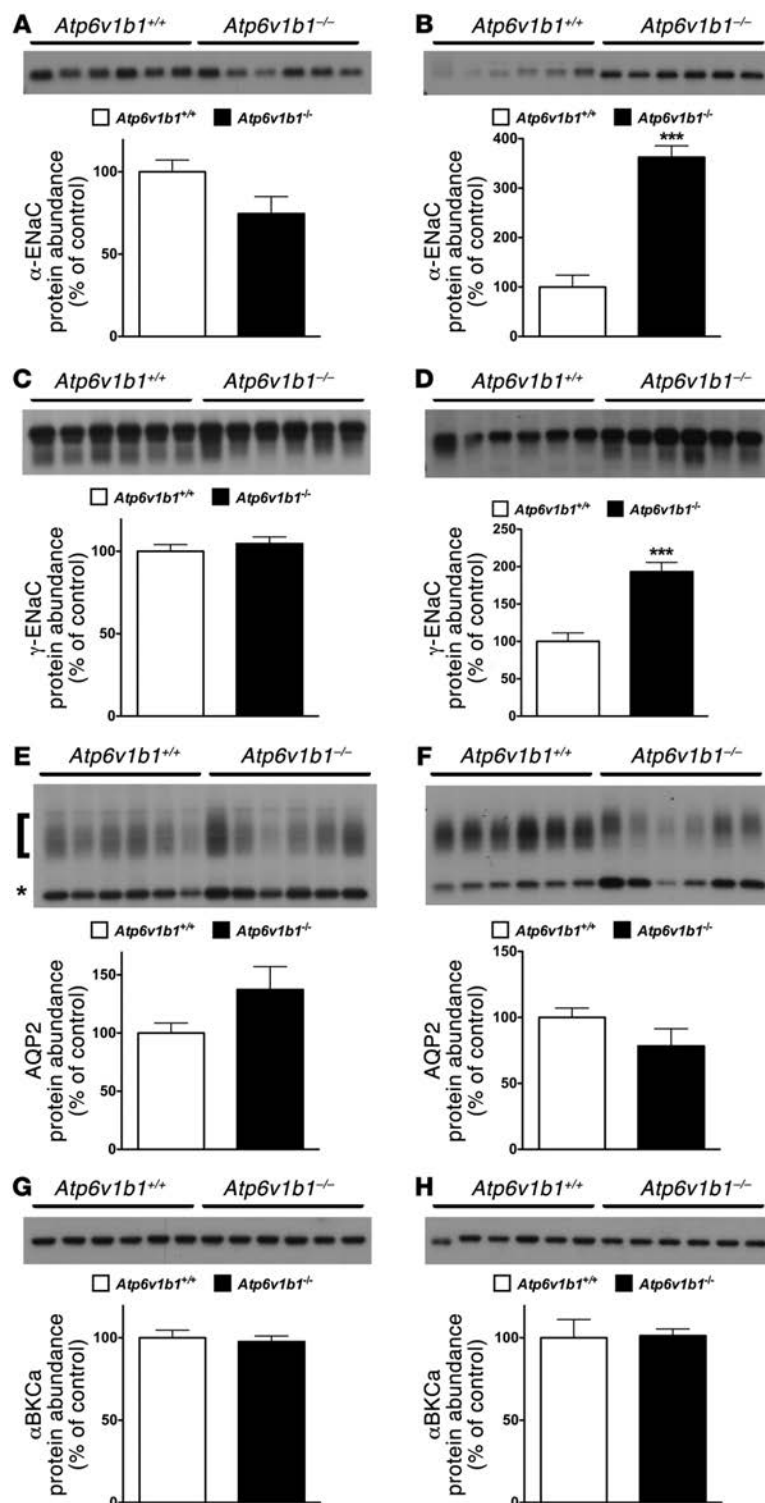
Atp6v1b1^{-/-} mice have increased expression of the large-conductance calcium-activated potassium channel in collecting ducts. In the CNT and the collecting duct, K⁺ secretion occurs through 2 types of apical K⁺ channels: the renal outer medullary K⁺ (ROMK) channel and the large-conductance calcium-activated K⁺ channel (BKCa).

Movement of K⁺ across the apical membrane through selective apical K⁺ channels required a favorable electrical driving force, which is provided by electrogenic reabsorption of Na⁺ through ENaC. Since ENaC was found upregulated in the MCD (Figure 2C), we tested whether K⁺ leak could occur through ROMK in the MCD of *Atp6v1b1*^{-/-} mice. We next analyzed the abundance of ROMK protein in the medulla. As detailed in Supplemental Figure 2A, in the medulla, anti-ROMK antibody detected a triplet around 37 kDa in which the upper band was shown to correspond to the molecular form of ROMK expressed exclusively in the collecting duct. We found that ROMK protein abundance was markedly increased in MCD from *Atp6v1b1*^{-/-} mice (Table 1 and Supplemental Figure 2B). The BKCa mediates the flow-induced K⁺ secretion in the collecting duct (23). Elevated urinary flow in

Atp6v1b1^{-/-} mice may activate BKCa channels and K⁺ secretion. When assessed with immunoblotting, the protein level of the α subunit of the BKCa channel was increased by 1.6- and 2.6-fold in cortical and medullary samples from *Atp6v1b1*^{-/-} mice, respectively (Figure 3A and Table 1). These results show increases in K⁺ channel expression in *Atp6v1b1*^{-/-} mice, which parallel upregulation of ENaC in the MCD.

Expression of aquaporin 2 was dramatically decreased in collecting ducts of *Atp6v1b1*^{-/-} mice. Accumulation of aquaporin 2 (AQP2) in the apical plasma membrane increases water permeability of the collecting duct, allowing water to be reabsorbed from the collecting duct lumen and increasing the concentration of the urine. Immunoblotting studies showed that renal medulla AQP2 protein level was dramatically reduced (by 70%) in *Atp6v1b1*^{-/-} mice as compared with control mice (Figure 3B and Table 1). In the cortex, AQP2 protein level in *Atp6v1b1*^{-/-} mice was decreased by 40% (Supplemental Figure 3A and Table 1). These results were confirmed by immunofluorescence on kidney sections (Figure 3C and Supplemental Figure 3B). These results suggest that water loss in *Atp6v1b1*^{-/-} mice is likely a consequence of downregulation of AQP2.

Abnormal prostaglandin E₂ release impairs ENaC regulation in CCDs. Increased urine PGE₂ excretion is often associated with salt- and water-losing nephropathies (24). The collecting duct is a major site of PGE₂ synthesis in the kidney, where PGE₂ inhibits both salt and water absorption (25, 26). We next measured PGE₂ excretion in the urine of *Atp6v1b1*^{-/-} mice and their controls. Urinary PGE₂ was increased 2-fold in *Atp6v1b1*^{-/-} mice (Figure 4A). To test whether PC dysfunction in our model could arise from an abnormal PGE₂ release, we treated *Atp6v1b1*^{-/-} mice with indomethacin, an unselective inhibitor of cyclooxygenases, the enzyme responsible for prostaglandin generation. Urinary PGE₂ excretion of *Atp6v1b1*^{-/-} mice was significantly decreased 24 hours after the first injection of indomethacin (5 mg/kg BW/d) and a maximal 60% decrease was observed after 2 days. At day 2, indomethacin improved the polyuria and normalized urine osmolality (Table 2), and abolished the difference in plasma potassium concentration (without indomethacin treatment: 4.10 ± 0.07 mM in *Atp6v1b1*^{+/+} mice vs. 3.54 ± 0.08 mM in *Atp6v1b1*^{-/-} mice, *n* = 25 and 24, respectively; *P* < 0.0001; following indomethacin treatment: 4.11 ± 0.07 mM in *Atp6v1b1*^{+/+} mice vs. 3.90 ± 0.09 mM in *Atp6v1b1*^{-/-} mice, *n* = 24 and 27, respectively; NS). Urinary Na⁺ and K⁺ excretions also decreased in response to indomethacin treatment in mutant mice (Table 2). Indomethacin reduced differences in PRA between wild-type and mutant mice (without indomethacin, PRA in *Atp6v1b1*^{-/-} mice was 6-fold that of *Atp6v1b1*^{+/+} mice; with indomethacin, PRA was 2.3-fold that of *Atp6v1b1*^{+/+} mice; *P* = 0.047) and abolished the difference in hematocrit (without indomethacin treatment: 41% ±

**Figure 5**

Effects of 2 days of indomethacin injection on the protein abundance of ENaC, AQP2, and BKCa in *Atp6v1b1*^{-/-} and *Atp6v1b1*^{+/+} mice. (A–H) Protein abundance of α-ENaC subunit (A and B), γ-ENaC subunit (C and D), AQP2 (E and F), and α-BKCa (G and H) was assessed with Western blot analysis of protein extracted from renal cortex (A, C, E, and G) or medulla (B, D, F, and H) of *Atp6v1b1*^{-/-} and *Atp6v1b1*^{+/+} mice after 2 days of indomethacin injections. Each lane was loaded with a protein sample from a different mouse; 15 μg and 5 μg proteins were loaded per gel lane for cortical samples and medullary samples, respectively. Equal loading was confirmed with parallel Coomassie-stained gels. Bar graphs summarize densitometric analyses. ****P* < 0.001 vs. *Atp6v1b1*^{+/+}. In A and B, arrow indicates the 90-kDa-specific band for α-ENaC. In E and F, bar graphs summarize bands indicated by brackets (glycosylated 37-kDa form of AQP2) and asterisks (unglycosylated 25-kDa form of AQP2).

in cortical homogenates was no longer downregulated, and was even slightly higher for γ-ENaC in treated *Atp6v1b1*^{-/-} mice when compared with control mice. In contrast, pendrin expression remained low (Table 1) in treated *Atp6v1b1*^{-/-} mice. Expression of α- and γ-ENaC in the CCD was still increased in treated *Atp6v1b1*^{-/-} mice (Figure 5, B and D) when compared with control mice as well as the expression of ROMK (Table 1). These results demonstrate that abnormal ENaC regulation in the CCD is due to a disturbance in PGE₂ paracrine signaling, whereas the reduction of pendrin is a direct consequence of proton pump dysfunction. Expression of AQP2 was also normalized by indomethacin treatment in both cortical and medullary samples (Figure 5, E and F, and Table 1). After indomethacin treatment, the expression of the α subunit of the BKCa channel was not different from that of control mice in both cortical and medullary samples (Figure 5, G and H, and Table 1). All densitometric analyses of immunoblots are summarized in Table 1. Taken together, these results indicate that renal K⁺ loss in *Atp6v1b1*^{-/-} mice is likely a consequence of activation of flow-activated BKCa potassium channels.

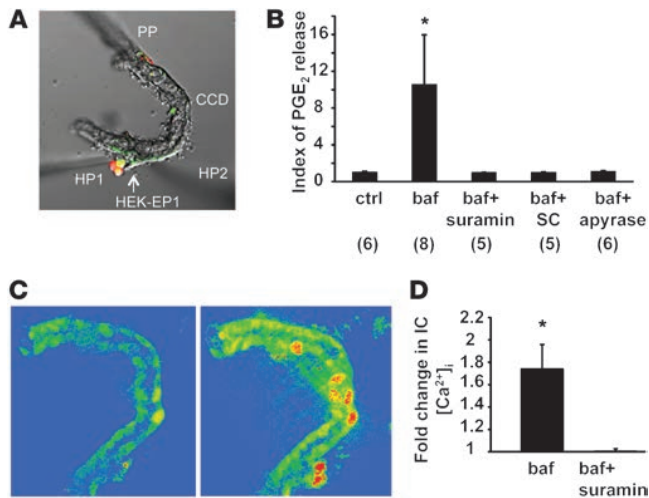
Inactivation of the basolateral H⁺-ATPase induced ATP-dependent PGE₂ release by the CCD. The preceding experiments suggest that PGE₂ reduced ENaC activity in CCD PCs. To get a better insight into the mechanism by which PGE₂ regulates ENaC function in CCD PCs, we measured PGE₂ release into the tubular fluid in freshly isolated microperfused wild-type CCDs in response to pharmacologic

1% in *Atp6v1b1*^{+/+} mice vs. 44% ± 1% in *Atp6v1b1*^{-/-} mice, *n* = 38 and 40, respectively; *P* < 0.01; following indomethacin treatment: 40% ± 1% in *Atp6v1b1*^{+/+} mice vs. 39 ± 2% in *Atp6v1b1*^{-/-} mice, *n* = 16 and 17, respectively; NS). Indomethacin treatment had no significant effect in wild-type mice. Western blot analyses shown in Figure 5, A and C, indicate that protein abundance for α- and γ-ENaC

inhibition of basolateral H⁺-ATPases in β-ICs using the previously established PGE₂ biosensor technique (27, 28). We used HEK cells overexpressing the calcium-coupled PGE₂ receptor E-prostanoid 1 (EP1) as PGE₂ biosensors by loading them with Fluo-4/Fura Red to measure cytosolic calcium and positioning them in direct contact with the tubular fluid (Figure 6A). As shown in Figure 6B,



research article

**Figure 6**

Paracrine signaling in the isolated microperfused CCD. **(A and B)** Measurement of bafilomycin A1-induced luminal PGE₂ release in the isolated microperfused CCD using a biosensor technique. **(A)** HEK cells overexpressing the EP1 receptor were loaded with Fluo-4 and Fura Red, held by a holding pipette (HP1), and positioned in the lumen of the split-open microperfused CNT/CCD, in contact with the tubular fluid. PP, CCD perfusion pipette; HP2, holding pipette to keep the tubule end in position. DIC image and fluorescence overlay are shown. **(B)** Summary of PGE₂ biosensor responses. Fold change in Fluo-4/Fura Red fluorescence ratio is shown as index of PGE₂ release. Addition of 40 nM bafilomycin (baf) to the bathing solution caused elevation in HEK-EP1 biosensor cell calcium indicating luminal PGE₂ release. The effects of bafilomycin were prevented by the addition of the purinergic (ATP) receptor blocker suramin (50 μ M) to the tubular perfusate. Similarly, the selective PGE₂ EP1 receptor inhibitor SC51322 (SC; 10 μ M) added to the luminal perfusate blocked bafilomycin-induced biosensor responses indicating PGE₂ specificity. Addition of the ATP scavenger apyrase (50 U/ml) to the tubular perfusate also abolished PGE₂ biosensor responses consistent with its dependence on luminal ATP release. * $P < 0.05$ bafilomycin vs. baseline (ctrl). Numbers per group are indicated in parentheses. **(C and D)** Fluorescence imaging of bafilomycin-induced purinergic calcium signaling in the isolated microperfused CCD. CCDs were perfusion-loaded with Fluo-4 and Fura Red. **(C)** Gradient pseudocolor images show CCD [Ca²⁺]_i levels before (left) and after (right) addition of 40 nM bafilomycin to bathing solution. Bafilomycin caused significant elevations in CCD [Ca²⁺]_i, most significantly in ICs, which were identified based on anatomical considerations (lower cell density and higher cell volume compared with PCs). **(D)** Summary of bafilomycin-induced changes in CCD [Ca²⁺]_i. The purinergic (ATP) receptor blocker suramin added to the tubular perfusate (50 μ M) abolished the effects of bafilomycin. * $P < 0.05$ bafilomycin vs. bafilomycin and suramin; $n = 5$ /group.

addition of bafilomycin A1 to the bathing solution inhibiting basolateral H⁺-ATPases in β -ICs caused significant elevation in HEK-EP1 biosensor cell calcium, indicating luminal PGE₂ release. The selective EP1 receptor inhibitor SC51322 added to the luminal perfusate blocked bafilomycin-induced biosensor responses, indicating PGE₂ specificity (Figure 6B).

Luminal ATP via activation of P2Y₂ receptors is known to mediate inhibition of Na⁺ absorption via ENaC in mouse CCD (29, 30). Recent studies have shown that local ATP can act either directly or via a signaling cascade that involves generation of active prostanoids, particularly PGE₂ (31–33), exerting natriuretic effects on

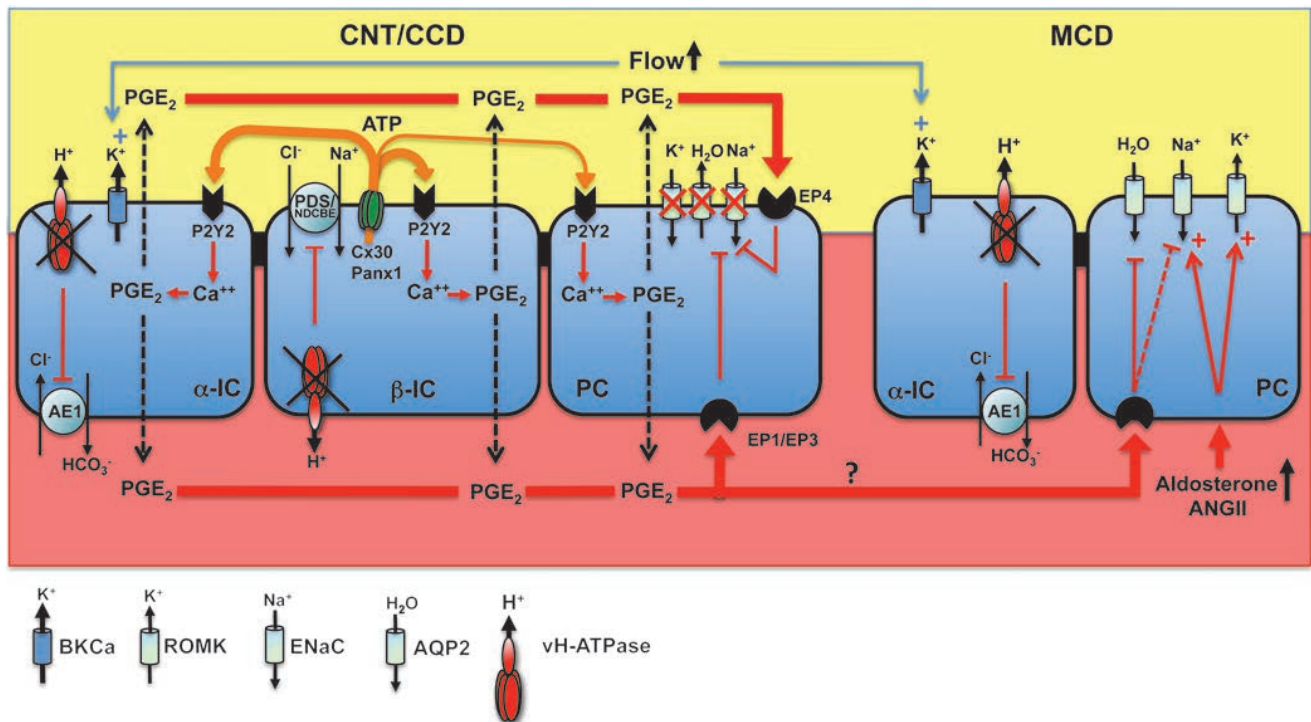
the CCD. We thus tested the effect of the addition of the purinergic (ATP) receptor blocker suramin to the tubular perfusate and showed that bafilomycin-induced PGE₂ release was prevented by suramin (Figure 6B). Similarly, addition of the ATP scavenger apyrase (50 U/ml) to the tubular perfusate abolished PGE₂ biosensor responses consistent with its dependence on luminal ATP release (Figure 6B). Of note, as PGE₂, urinary ATP excretion was increased by 3.1-fold in *Atp6v1b1*^{−/−} mice (Figure 4). Daily injection of indomethacin to *Atp6v1b1*^{−/−} mice for 2 days, which normalized ENaC expression in the cortex (Figure 5, A and C), had no significant effect on urinary ATP excretion (0.36 ± 0.12 pmol/min before vs. 0.54 ± 0.20 pmol/min after indomethacin injection, $n = 7$) while decreasing PGE₂ excretion by 60%. These results suggest that ATP had no direct effect on ENaC expression but rather acted through PGE₂ generation in our model.

When CCDs were loaded with the calcium-sensitive ratiometric fluorophore pair Fluo-4 and Fura Red, the addition of bafilomycin to the bathing solution caused significant elevations in CCD [Ca²⁺]_i, most significantly in ICs (Figure 6C). Suramin added to the tubular perfusate completely abolished the effects of bafilomycin (Figure 6D). These experiments evidence a significant intracellular calcium elevation in ICs, which reflects activation of luminal purinergic receptors in response to inactivation of the basolateral H⁺-ATPase.

Overall, inhibition of basolateral H⁺-ATPase in β -ICs leads to ATP release, which then triggers PGE₂ release by acting on luminal calcium-coupled purinergic P2 receptors, presumably P2Y₂ receptors, the main luminal P2 receptor subtype expressed in the distal nephron.

Discussion

Type I dRTA is associated with a salt- and potassium-losing nephropathy that can lead to renal hypokalemia and dehydration (9, 10). dRTA is also almost invariably complicated by a marked hypercalciuria resulting in kidney stones, bone demineralization, nephrocalcinosis, and ultimately chronic renal failure. Mice with disruption of the *Atp6v1b1* gene encoding the B1 subunit of the H⁺-ATPase develop an abnormal response to an acid load (19), which is the direct consequence of impaired proton secretion as expected from dysfunction of α -ICs. Our current results demonstrate that *Atp6v1b1*^{−/−} mice, like patients with severe type I dRTA, have a salt-losing nephropathy that leads to severe vascular dehydration when the animals are fed a NaCl-depleted diet. However, in the absence of nephrocalcinosis, this cannot be attributed solely to chronic interstitial nephritis but instead reflects abnormal NaCl handling by renal epithelial cells. In a previous study (16), we showed that CCDs isolated from mice with secondary hyperaldosteronism absorb Na⁺ through ENaC in PCs and through the Na⁺-driven Cl[−]/HCO₃[−] exchanger NDCBE in ICs. Cl[−] absorption has been shown to occur in β -ICs through the Na⁺-independent Cl[−]/HCO₃[−] exchanger pendrin (18, 34). Here, we demonstrate that, despite marked hypovolemia, CCDs isolated from *Atp6v1b1*^{−/−} mice did not absorb NaCl, indicating that ENaC and NDCBE/pendrin activities are both impaired. Accordingly, expressions of pendrin, α -ENaC, and γ -ENaC were decreased in the cortex of *Atp6v1b1*^{−/−} mice. Reduction in protein expression as assessed by immunoblotting of renal cortex likely reflects changes in ENaC and pendrin expression in the CNTs as well. In contrast, in the renal medulla, protein abundances of both α - and γ -ENaC were dramatically increased as expected in hypovolemic animals. In vivo injection of amiloride further shows that global ENaC activity was only slightly altered in these mice, indicating that

**Figure 7**

Schematic description of the consequence of v-H⁺-ATPase dysfunction on Na⁺, K⁺, and water transport in the CNT/CCD and the MCD. *Atp6v1b1* disruption impairs both electroneutral Na⁺ absorption through β-ICs and ENaC-mediated Na⁺ absorption through the neighboring PCs. Local ATP/PGE₂ signaling cascade is responsible for decreased ENaC protein and activity as well as AQP2 protein and contributes to Na⁺ and water losses, thereby promoting high tubular flow. ENaC inhibition in the CNT/CCD likely blocks K⁺ secretion through ROMK. In contrast, PCs in the MCD have a normal response to hyperaldosteronism (i.e. increased ENaC expression). Increased ENaC activity in the MCD is expected to favor K⁺ secretion through ROMK. High tubular flow activates BKCα potassium channels and K⁺ secretion, leading to renal K⁺ loss in *Atp6v1b1*^{-/-} mice. Indeed, indomethacin, which reduced urinary flow and restored AQP2 protein levels in *Atp6v1b1*^{-/-} mice, also normalized protein levels of BKCα and decreased urinary K⁺ excretion in *Atp6v1b1*^{-/-} mice, leading to normal plasma potassium concentration.

increased ENaC activity in the MCD almost fully compensated for decreased ENaC activity in the CNT/CCD of *Atp6v1b1*^{-/-} mice. We conclude that β-IC dysfunction consecutive to *Atp6v1b1* disruption impairs the sensitivity of PCs to renin-angiotensin-aldosterone system activation in the CCD, while PCs in the MCD have a normal response to hyperaldosteronism.

Unlike human dRTA patients, *Atp6v1b1*^{-/-} mice do not develop spontaneous acidosis. It has been shown that the B2 subunit, which is normally co-expressed with the B1 subunit in ICs, compensates for the lack of the B1 subunit of the H⁺-ATPase in α-ICs and that its activity is sufficient to maintain acid base homeostasis in *Atp6v1b1*^{-/-} mice under basal conditions but not in conditions of acid load (20, 35) or stimulation of angiotensin II (36). Our data showing no electroneutral NaCl transport in the CCD of *Atp6v1b1*^{-/-} mice suggested that the B2 isoform is not capable of compensating for the absence of B1 in β-ICs under all circumstances (normal- and low-salt diet), conditions that may require angiotensin II mediated regulation of H⁺-ATPases.

Our results provide an explanation for hypokalemia in patients suffering from type I dRTA. K⁺ is freely filtered at the glomerulus and is almost totally reabsorbed by the proximal tubule and the loop of Henle. The amount of K⁺ excreted by the kidney is then determined by mechanisms beyond the early distal tubule, where either reabsorption or secretion of K⁺ can occur. The 2

main mechanisms identified yet that account for K⁺ secretion in the distal nephron are the small conductance K⁺ channel ROMK and the BKCα (37). Apical ROMK channels are expressed in PCs and K⁺ secretion through ROMK channels depends on electrogenic Na⁺ transport. BK channels have been primarily detected in apical membrane of ICs (38, 39), where basolateral Na-K-2Cl cotransporters (40, 41) may provide a mechanism for K⁺ uptake, thereby allowing K⁺ secretion through these cells. It is unlikely that K⁺ secretion occurs through excessive activity of ROMK in CCD of *Atp6v1b1*^{-/-} mice, since ENaC activity in this tubule segment is blocked, as indicated by our microperturbation data (see Figure 2A). Upregulation of ENaC in the OMCD of *Atp6v1b1*^{-/-} mice is expected to drive excessive K⁺ secretion through ROMK. High luminal flow rates are known to enhance K⁺ secretion due to activation of BKCα channels (23). Thus, elevated urinary flow in mutant mice probably activates BKCα potassium channels and K⁺ secretion. In line with this hypothesis, we found that BKCα expression was increased in mutant mice and that a reduction of urinary flow in *Atp6v1b1*^{-/-} mice by indomethacin normalized expression level of BKCα and decreased urinary K⁺ excretion in *Atp6v1b1*^{-/-} mice. This data also indicates that PGE₂, which antagonizes the actions of vasopressin in the distal nephron (26), is responsible for the dramatic decreased expression of the AQP2 water channel seen in *Atp6v1b1*^{-/-} mice and hence their urinary concentration defect.



research article

Our findings showing differential regulation of ENaC in the CNT/CCD system and MCD suggest that ENaC expression and activity in the CNT and the CCD are modulated by β -ICs. This is in line with recent studies showing that pendrin-null mice have an impaired ability to conserve Na^+ during dietary NaCl restriction and reduced ENaC expression (22). It has been shown that pendrin can increase ENaC abundance and function in part by increasing luminal HCO_3^- concentration and/or pH (42). However, it is unlikely that this mechanism can fully explain reduced cortical ENaC activity and expression observed in *Atp6v1b1*^{-/-} mice. In fact, *Atp6v1b1*^{-/-} mice exhibited much higher urinary pH than control mice (6.6 ± 0.03 vs. 5.8 ± 0.02 , $n = 7$ and 8 , respectively; $P < 0.0001$). Moreover, indomethacin, which decreased urinary PGE_2 excretion in *Atp6v1b1*^{-/-} mice, normalized ENaC expression specifically in the renal cortex. Indomethacin also tended to decrease urinary Na^+ excretion in these mice and reduced differences in PRA and hematocrit between wild-type and mutant mice. Furthermore, we demonstrate that inactivation of the H^+ -ATPase induces PGE_2 release by isolated microperfused CCD. Considering these data, and because PGE_2 has been repeatedly shown to decrease electrogenic Na^+ transport in isolated and microperfused CCDs (25, 26, 43), we propose that PGE_2 production has a primary role in downregulating ENaC expression and function in the CCD of *Atp6v1b1* deficient mice. This autocrine/paracrine function of PGE_2 in regulating Na^+ transport in the CCD has been recently evidenced in isolated and microperfused tubules by Flores et al. (44). The authors showed that indomethacin enhanced flow-stimulated Na^+ absorption in microperfused CCDs and concluded that flow-activated PGE_2 release inhibits Na^+ absorption. Opposing regulations of ENaC in the CCD and the MCD highlight the importance of this paracrine PGE_2 signaling in antagonizing the action of the renin-angiotensin-aldosterone system on ENaC in the CCD.

The present studies demonstrate that PGE_2 release by isolated microperfused CCDs in response to the preferential inactivation of the basolateral H^+ -ATPase requires activation of luminal G protein-coupled purinergic (ATP) receptor. Such ATP-induced PGE_2 release has been observed in other cell types including astrocytes (33), vascular smooth vessel cells (31), and inner MCD cells (32).

In the mouse kidney, ATP-permeable hemichannel connexin 30 (Cx30), which has been localized solely to the apical membrane of β -ICs of the distal nephron (45), is involved in ATP release from the collecting duct cells (15, 28). More recently, pannexin 1 channels (Panx1), expressed at the apical membrane of ICs, has also been proposed to regulate ATP release as *Panx1*-deficient mice excrete less ATP than their wild-type littermates (15, 46). Thus, ATP released via Cx30 and/or Panx1 is theoretically available for autocrine and paracrine signaling to ICs and PCs, respectively. The calcium-coupled P2Y2 receptor is the main luminal P2 receptor subtype expressed in the distal nephron and was located in PCs using confocal microscopy imaging (47). With calcium imaging experiments on isolated CCDs, we also evidence a strong intracellular calcium elevation in ICs in response to the preferential inactivation of the basolateral H^+ -ATPase, which was abolished in the presence of luminal suramin. These data strongly suggest that ICs themselves respond to purinergic signaling.

In the collecting duct, luminal ATP via activation of P2Y2 receptors inhibits Na^+ ENaC-dependent Na^+ transport (29, 30). Activation of purinergic P2 receptors also decreases AVP-induced water permeability and downregulates AQP2 (48, 49). Our experiments showing that indomethacin treatment restores normal protein

levels of ENaC and AQP2 in the renal cortex of *Atp6v1b1*^{-/-} mice but has no effect on urinary ATP excretion suggest that ATP acts through PGE_2 generation in CCDs of *Atp6v1b1*^{-/-} mice. However, we cannot rule out the possibility of a direct effect of ATP on ENaC activity through a reduction in channel open probability.

The effects of PGE_2 are mediated by a distinct class of G protein-coupled receptors referred to as EP receptors. Among the 3 EP receptor subtypes that have been localized in the CCD (e.g., EP1, EP3, and EP4), activation of EP1 receptors by basolateral PGE_2 increases intracellular calcium levels and inhibits Na^+ absorption in the in vitro microperfused CCD (25). Basolateral PGE_2 through G_i protein-coupled EP3 receptors inhibits vasopressin-stimulated water permeability of this epithelium (26). PGE_2 produced by the cortical collecting cells and released across the basolateral membrane of these cells may enter the bloodstream by diffusing into the peritubular capillaries and could potentially circulate and activate their remote EP3 receptors in the medulla. Alternatively, activation of the renin-angiotensin-aldosterone system has been suggested to induce PGE_2 synthesis in the renal medulla (50). In addition to this well-known basolateral effect of PGE_2 , there is evidence for luminal prostaglandin receptors in the CCD, activation of which suppresses ENaC-mediated Na^+ transport (43). As indicated by our biosensor experiments, which measured luminal PGE_2 , PGE_2 release also occurs through luminal cell membranes of the CCD. Luminal PGE_2 has been reported to increase cAMP production in culture CCD cells (51, 52), suggesting that the effects of luminal PGE_2 are mediated by G_s protein coupled EP receptors. EP2 and EP4 are coupled to the G_s protein and signal by increasing intracellular cAMP levels, but only the EP4 receptor has been localized in the CCD (53). Thus, PGE_2 release through luminal and basolateral cell membranes of the CCD may inhibit Na^+ transport through activation of EP1 and EP4 receptors and water transport through EP3 receptor activation.

The importance of the intratubular paracrine factor ATP as a regulator of electrolytes and water balance in the distal nephron is emerging (15). In contrast to aldosterone, which is a powerful stimulatory factor of Na^+ absorption through PCs, ATP as PGE_2 exerts an inhibitory effect on Na^+ absorption. The importance of these paracrine factors in blood pressure regulation is highlighted by previous studies showing that disruption of the purinergic P2Y2 receptor or the microsomal PGE synthase 1, a key enzyme in PGE_2 synthesis, leads to salt-sensitive hypertension in mice (54, 55). In the present study, we identified β -ICs as an important site of ATP release, which triggers through P2Y2 receptor activation the local production and release of PGE_2 . We also show that β -ICs can downregulate ENaC in the neighboring PCs through this PGE_2 /ATP signaling. Genetic ablation of Cx30 in mice causes a salt-sensitive increase in blood pressure (28). Impairment of this paracrine signaling originating from β -ICs may be involved in the pathogenesis of several forms of salt-sensitive hypertension.

This paracrine ATP/ PGE_2 signaling originating from β -ICs for modulating Na^+ absorption in the CCD seems well adapted to acutely modulate Na^+ absorption in response to tubular NaCl overloading. Indeed, the distal nephron is challenged daily by variations in tubular fluid NaCl concentration as a direct consequence of dietary salt intake. Urinary ATP levels have been shown to increase with dietary Na^+ intake (56, 57). We propose a paradigm in which β -ICs would sense the increase in NaCl delivery to the distal nephron and in turn release ATP/ PGE_2 to decrease Na^+ absorption by adjacent PCs. We have reported that pendrin is



primarily regulated in response to chronic changes in Cl^- balance (i.e., pendrin expression is decreased when Cl^- excretion increases) (58, 59). Thus, coordinated inhibition of Na^+ and Cl^- absorption through both PCs and ICs will allow the body to get rid of the excess of NaCl brought about by the diet.

In conclusion, we demonstrate that impaired renal sodium and potassium conservation observed in type I (or pump-defect type) dRTA is not the consequence of acidosis or of chronic interstitial nephritis, but is instead the consequence of the dysfunction of the proton pump in the β -IC. We propose a new paradigm where dysfunction of the proton pump in α -IC results in an acidification defect while dysfunction of the pump in β -ICs is responsible for renal loss of NaCl, K^+ , and water (Figure 7). In light of the present study, it would be of interest to measure urinary prostaglandin excretion in human dRTA patients in future studies and to determine whether indomethacin treatment would improve dehydration and hypokalemia in these patients.

Methods

Animals. *Atp6v1b1*^{-/-} mice were provided by R. Lifton (Yale University, New Haven, Connecticut, USA). Mice heterozygous for *Atp6v1b1* gene disruption were crossed, and wild-type (*Atp6v1b1*^{+/+}) and homozygous knockout mice (*Atp6v1b1*^{-/-}) were genotyped in their offspring by PCR of tail biopsies. In all experiments, controls consisted of wild-type littermates.

Physiological studies. All experiments were performed using age- and sex-matched *Atp6v1b1*^{+/+} and *Atp6v1b1*^{-/-} littermate mice (3–5 months old). For urine collection, mice were housed in metabolic cages (Techniplast). Mice were given deionized water ad libitum and pair-fed with standard laboratory chow containing 0.3% of sodium (INRA). They were first allowed to adapt for 3–5 days to the cages. At steady state, urine collection was performed daily under mineral oil in the urine collector for electrolyte measurements. Mice were then switched to a NaCl-free diet (INRA). After the switch, urines were collected for the 6 first hours and for the subsequent 18 hours, and then each 24 hours for 7 days. Urine creatinine (modified kinetic Jaffé colorimetric method) was measured with a Konelab 20i auto-analyzer (Thermo Electron Corporation). Urinary chloride was measured with a DL 55 titrator (Mettler Toledo). Urinary Na^+ and K^+ were measured by flame photometry (IL943; Instruments Laboratory). Urine osmolalities were measured with a freezing point osmometer (Roebing). Plasma renin concentration was determined using radioimmunoassay of angiotensin I generated by incubation of the plasma at pH 8.5 in the presence of an excess of rat angiotensinogen (60). Urine aldosterone was measured via RIA (DPC Dade Behring). Urinary PGE_2 was measured by EIA (Prostaglandin E₂ EIA kit; Cayman Chemical). Urinary ATP was measured on diluted urines using the FLAA kit from Sigma-Aldrich. Blood collection by tail incision on anesthetized mice by peritoneal injection of a mixture (0.1 ml/g body weight) of ketamine (Imalgene; Rhône Mérieux; 10%) and xylazine (Rompun; Bayer AG; 5%) was performed for K^+ measurement with an ABL 77 pH/blood-gas analyzer (Radiometer). Blood gases analyses were performed by retro-orbital puncture, and pH, PCO_2 , PO_2 , Na^+ , and Cl^- were measured with an ABL 77 pH/blood-gas analyzer (Radiometer). Blood bicarbonate concentration was calculated from the measured values using the Henderson-Hasselbach equation.

For indomethacin treatment, indomethacin (Sigma-Aldrich) dissolved in ethanol (10% volume) and saline was injected intraperitoneally once a day for up to 6 days (5 mg/kg BW/d). Urines were collected daily and kept frozen at -80°C .

Blood pressure measurements in conscious mice. Systolic blood pressure was measured in conscious mice fed a normal-salt diet using a computerized tail-cuff system after 1 week of daily training, as described elsewhere (61).

Then at least 10 measurements were performed every day for at least 7 consecutive days. Only the last 4 days were kept for analyses. If the variability of the measurements made in a single day exceeded the SD by more than 20%, the measurements for that day were discarded and replaced by an additional day of measurement. This method has been extensively validated and correlates well with direct measurements of intra-arterial pressure (61).

Immunoblot analyses. Animals were sacrificed with ketamine and xylazine (0.1 and 0.01 mgg BW⁻¹, respectively). Kidneys were removed and cut into 5-mm slices, and the cortex and medulla were excised under a stereoscopic microscope and placed into ice-cold isolation buffer (250 mM sucrose, 20 mM Tris-Hepes, pH 7.4) containing protease inhibitors (in $\mu\text{g/ml}$): 4 aprotinin, 4 leupeptin, 1.5 pepstatin A, and 28 4-(2- aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride (AEBSF). Minced renal tissues were homogenized in a Dounce homogenizer (pestle A, 5 passes) followed by 10 passes through a Teflon-glass homogenizer rotating at 1,000 rpm. The homogenate was centrifuged at 1,000 g for 10 minutes (rotor JS-13.1; Beckman), and the supernatant was centrifuged at 360,000 g for 40 minutes at 4°C (rotor 70.1 Ti; Beckman). The pellet was resuspended in isolation buffer. Protein contents were determined using the Bradford protein assay (microBradford; BioRad Laboratories).

Membrane proteins were solubilized in SDS-loading buffer (62.5 mM Tris HCl, pH 6.8, 2% SDS, 100 mM dithiothreitol, 10% glycerol and bromophenol blue), incubated at room temperature for 30 minutes. Electrophoresis was initially performed for all samples on 7.5% polyacrylamide minigels (XCell SureLock Mini-cell; Invitrogen Life Technologies), which were stained with Coomassie blue to provide quantitative assessment of loading (Supplemental Figure 4), as previously described (58). For immunoblotting, proteins were transferred electrophoretically (XCell II Blot Module; Invitrogen Life Technologies) for 1.5 h at 4°C from unstained gels to nitrocellulose membranes (Amersham) and then stained with 0.5% Ponceau S in acetic acid to check uniformity of protein transfer onto the nitrocellulose membrane. Membranes were first incubated in 5% nonfat dry milk in PBS, pH 7.4, for 1 h at room temperature to block nonspecific binding of antibody, followed by overnight at 4°C with the primary antibody (anti-Pendrin 1:10,000; anti-AQP2 1:100; anti- α -ENaC 1:10,000; anti- γ -ENaC 1:30,000; anti-ROMK 1:2,000; anti-BKCa α subunit 1:500; anti β -actin 1:500,000) in PBS containing 1% nonfat dry milk. After four 5-min washes in PBS containing 0.1% Tween-20, membranes were incubated with 1:10,000 dilution of goat anti-rabbit IgG (Bio-Rad) or horse anti-goat IgG (Vector Laboratories) conjugated to horseradish peroxidase in PBS containing 5% nonfat dry milk for 2 hours at room temperature. Blots were washed as described above, and luminol-ECL (PerkinElmer Life Science Products) was used to visualize bound antibodies before exposure to Hyperfilm ECL (Amersham). The autoradiography was digitized with the use of a laser scanner (Perfection 1650; Epson), and quantification of each band was performed via densitometry using NIH Image software. Densitometric values were normalized to the mean for the control group that was defined as 100% and results were expressed as mean \pm SEM.

Antibodies against α and γ subunits of ENaC were a gift from J. Loffing (University of Zurich, Zurich, Switzerland). Antibody against α -ENaC was raised against the N terminus of mouse α -ENaC (MLDHTRAPELNLD-LDLVSNC) (62). Antibody against γ -ENaC has been described elsewhere (63). Antibodies against pendrin (64) were a gift from P. Aronson (Yale University, New Haven, Connecticut, USA). Antibodies against AQP2 used for immunoblotting were purchased from Santa Cruz Biotechnology. Antibodies against ROMK and BK α subunit were purchased from Alomone labs. Antibodies against β -actin were purchased from Abcam.

Immunofluorescence labeling on kidney tissue. Mouse kidneys were fixed *in situ* by perfusion of 4% paraformaldehyde in PBS. Coronal kidney sections containing all kidney zones were then postfixed for 4–6 h at 4°C in 4% paraformaldehyde and then embedded in paraffin. Subsequently, 4- μm



research article

sections of the paraffin block were deparaffinized in toluene and rehydrated through graded ethanol. Rehydration was completed in TBS, pH 7.6. Slides were then placed in a plastic tank filled with Target Retrieval Solution (Dako) and heated 45 minutes in a water bath at 98°C. These steps unmasked antigens and allowed immunostaining of paraformaldehyde-fixed paraffin sections, as determined in preliminary experiments (data not shown). To reduce nonspecific binding, sections were rinsed in TBS for 10 minutes and incubated with background-reducing buffer (Dako) for 20 minutes. Mouse kidney sections were then labeled with the rabbit polyclonal AQP2 antibody as follows. Anti-AQP2 was applied for 1 hour at room temperature. After 3 washes, sections were incubated with a 1:1,000 dilution (in background-reducing buffer) of donkey anti-rabbit IgG coupled to Cy3 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) in TBS, 30 minutes at room temperature, followed by 3 TBS washes. Rabbit anti-AQP2 antibodies (AQP2 H7661) were a gift from S. Frische (Aarhus University, Aarhus, Denmark) and were used by de Seigneux et al. (65).

In vitro microperfusion of mouse CCDs and transepithelial ion flux measurement. Kidneys were removed and cut into 1- to 2-mm coronal slices that were transferred into a chilled dissection medium containing (in mM): 118 NaCl, 25 NaHCO₃, 2.0 K₂HPO₄, 1.2 MgSO₄, 2.0 calcium lactate, 1.0 sodium citrate, 5.5 glucose, and 12 creatinine, pH 7.4, and gassed with 95% O₂/5% CO₂. CCD segments were isolated from cortico-medullary rays under a dissecting microscope with a sharpened forceps. Because CCDs are highly heterogeneous, relatively short segments (0.45–0.6 mm) were dissected to maximize the reproducibility of the isolation procedure. In vitro microperfusion was performed as described by Burg et al. (66): isolated CCDs were rapidly transferred to a 1.2-ml temperature- and environment-controlled chamber, mounted on an inverted microscope, and then perfused and bathed initially at room temperature with dissection solution. The specimen chamber was continuously suffused with 95% O₂/5% CO₂ to maintain pH at 7.4. Once secure, the inner perfusion pipette was advanced, and the tubule was opened with a slight positive pressure. The opposite end of the tubule was then pulled into a holding collection pipette. In the holding collection pipette, 2–3 cm of water-saturated mineral oil contributed to maintain the tubule open at a low flow rate of perfusion. The perfusing and collecting end of the segment was sealed into a guard pipette using Dow Corning 200 dielectric fluid (Dow Corning Corp.). The tubules were then warmed to 37°C and equilibrated for 20 minutes while the collection rate was adjusted to a rate of 2 nl/min. The length of each segment was measured using an eyepiece micrometer. Because CCDs from mice are frequently unstable and collapse rapidly, measurements were conducted during the first 90 minutes of perfusion. Usually, collections from 4 periods of 15 minutes were performed in which 25 to 30 nanoliters of fluid were collected. The volume of the collections was determined under water-saturated mineral oil with calibrated volumetric pipettes. For [Na⁺] and [creatinine] measurements, 20 nl were required, while 2–3 nanoliters were used for [Cl[−]] determinations.

[Na⁺] and [creatinine] measurements were performed by HPLC and [Cl[−]] was measured by microcoulometry as previously described (16, 67, 68).

Creatinine was used as the volume marker and therefore was added to the perfusion solutions (both perfusate and bath) at a concentra-

tion of 12 mM. The rate of fluid absorption (J_v) was calculated as $J_v = (V_{\text{perf}} - V_{\text{coll}}) / L$, with $V_{\text{perf}} = Cr_{\text{coll}} / Cr_{\text{perf}} \times V_{\text{coll}}$, where Cr_{coll} and Cr_{perf} are the concentrations of creatinine in the collected fluid and perfusate, respectively, V_{coll} is the collection rate at the end of the tubule, and L is the length of the tubule.

For each collection, Na⁺ flux (J_{Na}) was calculated and reported to the length of the tubule: $J_{\text{Na}} = [(Na)_{\text{perf}} \times V_{\text{perf}}] - [(Na)_{\text{coll}} \times V_{\text{coll}}] / L$ and $J_{\text{Cl}} = [(Cl)_{\text{perf}} \times V_{\text{perf}}] - [(Cl)_{\text{coll}} \times V_{\text{coll}}] / L$, where perf indicates perfusate and coll indicates collection fluid. Therefore, positive values indicate net absorption, whereas negative values indicate net secretion of the ion. For each tubule, the mean of the 4 collection periods was used.

Fluorescence microscopy. The [Ca²⁺]_i of HEK/EP1 biosensor cells was measured as described previously (27). On average, 3–4 HEK/EP1 biosensor cells were placed at the tubule exit, and almost all biosensor cells produced PGE₂-induced calcium elevations.

Statistics. Experimental results are summarized as means ± SEM. All statistical comparisons were made using the unpaired Student's *t* test (2-tailed) or ANOVA followed by a Bonferroni's post hoc test when appropriate. A *P* value less than 0.05 was considered significant.

Study approval. All the experimental procedures were approved by the ethics committee at the University Pierre et Marie Curie (agreement Ce5/2010/053) and were performed in accordance with the NIH *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* and with the French Government animal welfare policy (agreement RA024647151FR).

Acknowledgments

We thank Luciana Morla for technical assistance. R. Chambrey and D. Eladari are funded by INSERM, by CNRS, by the Transatlantic Network for Hypertension of the Fondation Leducq, by grant "subvention de recherche 2010 AMGEN" from the Société de Néphrologie (to R. Chambrey), by grant subvention de recherche 2010 from the Association pour l'Information et la Recherche sur les Maladies Rénales Génétiques (to R. Chambrey), and by grants from l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) (ANR BLANC 2012-R13011KK to R. Chambrey and ANR BLANC 2010-R10164DD to D. Eladari). N. Cornière is funded by la Fondation pour la Recherche Médicale (DEA20100619499). M. Jayat is funded by the CODDIM from the Region Ile de France. Some of these studies were funded by NIH grant DK64324 and an American Heart Association Established Investigator Award (to J. Peti-Peterdi). C.A. Wagner is supported by a grant from the Swiss National Science Foundation (31003A_138143/1).

Received for publication February 27, 2012, and accepted in revised form June 28, 2013.

Address correspondence to: Régine Chambrey, INSERM UMR 970, PARCC, 56 rue Leblanc, F-75015, Paris, France. Phone: 33.1.53.98.81.17; Fax: 33.1.53.98.79.52; E-mail: regine.chambrey@inserm.fr.

- Alper SL. Genetic diseases of acid-base transporters. *Annu Rev Physiol*. 2002;64:899–923.
- Wagner CA, Devuyst O, Bourgeois S, Mohebbi N. Regulated acid-base transport in the collecting duct. *Pflügers Arch*. 2009;458(1):137–156.
- Alper SL, Natale J, Gluck S, Lodish HF, Brown D. Subtypes of intercalated cells in rat kidney collecting duct defined by antibodies against erythroid band 3 and renal vacuolar H⁺-ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(14):5429–5433.
- Wagner CA, Finberg KE, Breton S, Marshansky V, Brown D, Geibel JP. Renal vacuolar H⁺-ATPase.

Physiol Rev. 2004;84(4):1263–1314.

- Karet FE, et al. Mutations in the gene encoding B1 subunit of H⁺-ATPase cause renal tubular acidosis with sensorineural deafness. *Nat Genet*. 1999;21(1):84–90.
- Smith AN, et al. Mutations in ATP6N1B, encoding a new kidney vacuolar proton pump 116-kD subunit, cause recessive distal renal tubular acidosis with preserved hearing. *Nat Genet*. 2000;26(1):71–75.
- Bruce LJ, et al. Familial distal renal tubular acidosis is associated with mutations in the red cell anion exchanger (Band 3, AE1) gene. *J Clin Invest*.

1997;100(7):1693–1707.

- Karet FE, et al. Mutations in the chloride-bicarbonate exchanger gene AE1 cause autosomal dominant but not autosomal recessive distal renal tubular acidosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(11):6337–6342.
- Sebastian A, McSherry E, Morris RC. Renal potassium wasting in renal tubular acidosis (RTA): its occurrence in types 1 and 2 RTA despite sustained correction of systemic acidosis. *J Clin Invest*. 1971;50(3):667–678.
- Sebastian A, McSherry E, Morris RC. Impaired renal conservation of sodium and chloride dur-



- ing sustained correction of systemic acidosis in patients with type 1, classic renal tubular acidosis. *J Clin Invest.* 1976;58(2):454–469.
11. Gill JR, Bell NH, Bartter FC. Impaired conservation of sodium and potassium in renal tubular acidosis and its correction by buffer anions. *Clin Sci.* 1967;33(3):577–592.
 12. Finberg KE, Wagner CA, Stehberger PA, Geibel JP, Lifton RP. Molecular cloning and characterization of Atp6v1b1, the murine vacuolar H⁺-ATPase B1-subunit. *Gene.* 2003;318:25–34.
 13. Stehberger PA, et al. Localization and regulation of the ATP6V0A4 (a4) vacuolar H⁺-ATPase subunit defective in an inherited form of distal renal tubular acidosis. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14(12):3027–3038.
 14. Royaux IE, et al. Pendrin, encoded by the Pendred syndrome gene, resides in the apical region of renal intercalated cells and mediates bicarbonate secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(7):4221–4226.
 15. Eladari D, Chambrey R, Peti-Peterdi J. A new look at electrolyte transport in the distal tubule. *Annu Rev Physiol.* 2012;74:325–349.
 16. Leviel F, et al. The Na⁺-dependent chloride-bicarbonate exchanger SLC4A8 mediates an electroneutral Na⁺ reabsorption process in the renal cortical collecting ducts of mice. *J Clin Invest.* 2010;120(5):1627–1635.
 17. Verlander JW, et al. Deoxycorticosterone upregulates PDS (Slc26a4) in mouse kidney: role of pendrin in mineralocorticoid-induced hypertension. *Hypertension.* 2003;42(3):356–362.
 18. Wall SM, et al. NaCl restriction upregulates renal Slc26a4 through subcellular redistribution: role in Cl⁻ conservation. *Hypertension.* 2004;44(6):982–987.
 19. Finberg KE, et al. The B1-subunit of the H⁽⁺⁾ ATPase is required for maximal urinary acidification. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(38):13616–13621.
 20. Paunescu TG, et al. Compensatory membrane expression of the V-ATPase B2 subunit isoform in renal medullary intercalated cells of B1-deficient mice. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007;293(6):F1915–F1926.
 21. Pech V, Kim YH, Weinstein AM, Everett LA, Pham TD, Wall SM. Angiotensin II increases chloride absorption in the cortical collecting duct in mice through a pendrin-dependent mechanism. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007;292(3):F914–F920.
 22. Kim YH, et al. Reduced ENaC protein abundance contributes to the lower blood pressure observed in pendrin-null mice. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007;293(4):F1314–F1324.
 23. Satlin LM, Carattino MD, Liu W, Kleyman TR. Regulation of cation transport in the distal nephron by mechanical forces. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2006;291(5):F923–F931.
 24. Hao CM, Breyer MD. Physiological regulation of prostaglandins in the kidney. *Annu Rev Physiol.* 2008;70:357–377.
 25. Guan Y, et al. Prostaglandin E2 inhibits renal collecting duct Na⁺ absorption by activating the EP1 receptor. *J Clin Invest.* 1998;102(1):194–201.
 26. Hebert RL, Jacobson HR, Fredin D, Breyer MD. Evidence that separate PGE2 receptors modulate water and sodium transport in rabbit cortical collecting duct. *Am J Physiol.* 1993;265(5 pt 2):F643–F650.
 27. Peti-Peterdi J, et al. Luminal NaCl delivery regulates basolateral PGE2 release from macula densa cells. *J Clin Invest.* 2003;112(1):76–82.
 28. Sipos A, Vargas SL, Toma I, Hanner F, Willecke K, Peti-Peterdi J. Connexin 30 deficiency impairs renal tubular ATP release and pressure natriuresis. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20(8):1724–1732.
 29. Lehrmann H, Thomas J, Kim SJ, Jacobi C, Leipziger J. Luminal P2Y2 receptor-mediated inhibition of Na⁺ absorption in isolated perfused mouse CCD. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13(1):10–18.
 30. Pochynyuk O, et al. Paracrine regulation of the epithelial Na⁺ channel in the mammalian collecting duct by purinergic P2Y2 receptor tone. *J Biol Chem.* 2008;283(52):36599–36607.
 31. Lin CC, et al. Functional coupling expression of COX-2 and cPLA2 induced by ATP in rat vascular smooth muscle cells: role of ERK1/2, p38 MAPK, and NF- κ B. *Cardiovasc Res.* 2009;82(3):522–531.
 32. Welch BD, Carlson NG, Shi H, Myatt L, Kishore BK. P2Y2 receptor-stimulated release of prostaglandin E2 by rat inner medullary collecting duct preparations. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003;285(4):F711–F721.
 33. Xia M, Zhu Y. Signaling pathways of ATP-induced PGE2 release in spinal cord astrocytes are EGFR transactivation-dependent. *Glia.* 2011;59(4):664–674.
 34. Wall SM, et al. Localization of pendrin in mouse kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003;284(1):F229–F241.
 35. Vedovelli L, et al. Altered V-ATPase expression in renal intercalated cells isolated from B1 subunit-deficient mice by fluorescence-activated cell sorting. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2013;304(5):F522–F532.
 36. Rothenberger F, Velic A, Stehberger PA, Kovacicova J, Wagner CA. Angiotensin II stimulates vacuolar H⁺-ATPase activity in renal acid-secreting intercalated cells from the outer medullary collecting duct. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18(7):2085–2093.
 37. Hebert SC, Desir G, Giebisch G, Wang W. Molecular diversity and regulation of renal potassium channels. *Physiol Rev.* 2005;85(1):319–371.
 38. Najjar F, et al. Dietary K⁺ regulates apical membrane expression of maxi-K channels in rabbit cortical collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005;289(4):F922–F932.
 39. Palmer LG, Frindt G. High-conductance K channels in intercalated cells of the rat distal nephron. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007;292(3):F966–F973.
 40. Ginns SM, et al. Immunolocalization of the secretory isoform of Na-K-Cl cotransporter in rat renal intercalated cells. *J Am Soc Nephrol.* 1996;7(12):2533–2542.
 41. Liu W, et al. Role of NKCC in BK channel-mediated net K⁽⁺⁾ secretion in the CCD. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2011;301(5):F1088–F1097.
 42. Pech V, et al. Pendrin modulates ENaC function by changing luminal HCO₃⁻. *J Am Soc Nephrol.* 2010;21(11):1928–1941.
 43. Ando Y, Asano Y. Luminal prostaglandin E2 modulates sodium and water transport in rabbit cortical collecting ducts. *Am J Physiol.* 1995;268(6 pt 2):F1093–F1101.
 44. Flores D, Liu Y, Liu W, Satlin LM, Rohatgi R. Flow-induced prostaglandin E2 release regulates Na and K transport in the collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2012;303(5):F632–F638.
 45. McCulloch F, Chambrey R, Eladari D, Peti-Peterdi J. Localization of connexin 30 in the luminal membrane of cells in the distal nephron. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005;289(6):F1304–F1312.
 46. Hanner F, Lam L, Nguyen MT, Yu A, Peti-Peterdi J. Intrarenal localization of the plasma membrane ATP channel pannexin1. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2012;303(10):F1454–F1459.
 47. Deetjen P, Thomas J, Lehrmann H, Kim SJ, Leipziger J. The luminal P2Y receptor in the isolated perfused mouse cortical collecting duct. *J Am Soc Nephrol.* 2000;11(10):1798–1806.
 48. Kishore BK, Chou CL, Knepper MA. Extracellular nucleotide receptor inhibits AVP-stimulated water permeability in inner medullary collecting duct. *Am J Physiol.* 1995;269(6 pt 2):F863–F869.
 49. Wildman SS, et al. Nucleotides downregulate aquaporin 2 via activation of apical P2 receptors. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20(7):1480–1490.
 50. Zusman RM, Keiser HR. Prostaglandin biosynthesis by rabbit renomedullary interstitial cells in tissue culture. Stimulation by angiotensin II, bradykinin, and arginine vasopressin. *J Clin Invest.* 1977;60(1):215–223.
 51. Garcia-Perez A, Smith WL. Apical-basolateral membrane asymmetry in canine cortical collecting tubule cells. Bradykinin, arginine vasopressin, prostaglandin E2 interrelationships. *J Clin Invest.* 1984;74(1):63–74.
 52. Sakairi Y, Jacobson HR, Noland TD, Breyer MD. Luminal prostaglandin E receptors regulate salt and water transport in rabbit cortical collecting duct. *Am J Physiol.* 1995;269(2 pt 2):F257–F265.
 53. Jensen BL, Stubbe J, Hansen PB, Andreassen D, Skott O. Localization of prostaglandin E(2) EP2 and EP4 receptors in the rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2001;280(6):F1001–F1009.
 54. Facemire CS, Griffiths R, Audoly LP, Koller BH, Coffman TM. The impact of microsomal prostaglandin synthase 1 on blood pressure is determined by genetic background. *Hypertension.* 2010;55(2):531–538.
 55. Rieg T, et al. Mice lacking P2Y2 receptors have salt-resistant hypertension and facilitated renal Na⁺ and water reabsorption. *FASEB J.* 2007;21(13):3717–3726.
 56. Mironova E, Peti-Peterdi J, Bugaj V, Stockand JD. Diminished paracrine regulation of the epithelial Na⁺ channel by purinergic signaling in mice lacking connexin 30. *J Biol Chem.* 2011;286(2):1054–1060.
 57. Stockand JD, et al. Purinergic inhibition of ENaC produces aldosterone escape. *J Am Soc Nephrol.* 2010;21(11):1903–1911.
 58. Quentin F, et al. The Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger pendrin in the rat kidney is regulated in response to chronic alterations in chloride balance. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2004;287(6):F1179–F1188.
 59. Vallet M, et al. Pendrin regulation in mouse kidney primarily is chloride-dependent. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17(8):2153–2163.
 60. Menard J, Catt KJ. Measurement of renin activity, concentration and substrate in rat plasma by radioimmunoassay of angiotensin I. *Endocrinology.* 1972;90(2):422–430.
 61. Ito M, et al. Regulation of blood pressure by the type 1A angiotensin II receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(8):3521–3525.
 62. Sorensen MV, et al. Rapid dephosphorylation of the renal sodium chloride cotransporter in response to oral potassium intake in mice. *Kidney Int.* 2013;83(5):811–824.
 63. Wagner CA, et al. Mouse model of type II Bartter's syndrome. II. Altered expression of renal sodium- and water-transporting proteins. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008;294:F1373–F1380.
 64. Knauf F, Yang CL, Thomson RB, Mentone SA, Giebisch G, Aronson PS. Identification of a chloride-formate exchanger expressed on the brush border membrane of renal proximal tubule cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(16):9425–9430.
 65. de Seigneux S, Malte H, Dimke H, Frokiaer J, Nielsen S, Frische S. Renal compensation to chronic hypoxic hypercapnia: downregulation of pendrin and adaptation of the proximal tubule. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007;292(4):F1256–F1266.
 66. Burg M, Grantham J, Abramow M, Orloff J. Preparation and study of fragments of single rabbit nephrons. *Am J Physiol.* 1966;210(6):1293–1298.
 67. Chambrey R, et al. Renal intercalated cells are rather energized by a proton than a sodium pump. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(19):7928–7933.
 68. El Moghrabi S, et al. Tissue kallikrein permits early renal adaptation to potassium load. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(30):13526–13531.

III Régulation par la kinase WNK4 de la voie NDCBE/Pendrine

Introduction

Longtemps, la suractivation de NCC a été considérée comme étant la seule cause du phénotype FHHT. Aujourd'hui cette hypothèse est remise en question depuis la description de plusieurs modèles surexprimant NCC et ne présentant pas de phénotype FHHT, à savoir la souris transgénique Tg-NCC, possédant plusieurs copies du gène *Ncc*, les souris knock-out pour KS-WNK1 ou Nedd4-2 (McCormick et al., 2011) (Hadchouel et al., 2010) (Ronzaud et al., 2013). La surexpression de NCC ne suffit donc pas à expliquer l'apparition du phénotype et il doit exister d'autres systèmes eux-mêmes dérégulés permettant, avec NCC, la mise en place de la pathologie. La sensibilité aux diurétiques thiazidiques du couple Pendrine/NDCBE nous a amenés à penser qu'il pourrait exister un lien entre l'activité de cette voie et la pathologie.

Dans cette étude, nous proposons de tester cette hypothèse grâce à la caractérisation de l'activité de la pendrine et de NDCBE dans le modèle de FHHT par mutation de WNK4. Dans ce modèle de souris transgénique TgWNK4^{PHAI}, il y a une surexpression de la kinase WNK4 et nous pensons que la surabondance de WNK4 stimule la réabsorption de NaCl à la fois par NCC mais aussi par la voie Pendrine/NDCBE. Par microperfusion de canaux collecteur microperfusés, nous avons mesuré l'activité de transport électroneutre de NaCl chez les souris et observé l'effet des diurétiques thiazidiques sur ce transport. Nous avons aussi mesuré l'activité de la pendrine des souris TgWNK4^{PHAI} comparée à celle des souris sauvages. L'expression de la pendrine, NCC et de NDCBE ont été mesurée par western blot ainsi que l'expression du canal ENaC dont nous pensons qu'elle est aussi modulée par WNK4. Enfin, nous avons voulu savoir si des mécanismes de régulation paracrine de l'activité d'ENaC étaient plus importants chez les souris TgWNK4^{PHAI}.

Matériels et méthodes

Animaux : Les souris TgWnk4^{PHAI} nous ont été fournies par R. Lifton (Yale University, New Haven, Connecticut, USA).

Etudes physiologiques : toutes les expériences utilisent des portées de souris sauvages et TgWnk4 ayant le même âge (3 à 5 mois) et de même sexe. Pour la collection d'urine, les souris sont logées dans des cages à métabolisme (Techniplast). Les souris ont reçu de l'eau déionisée à volonté et nourries avec de la nourriture en poudre standard contenant 0,3% de sodium (INRA). Une durée de 3 à 5 jours est nécessaire à l'habituation des souris aux cages à métabolisme. A l'état d'équilibre, les collections d'urine, dans des réceptacles à urine contiennent de l'huile de paraffine saturée en eau, pour la mesure des électrolytes. La créatinine urinaire est mesurée par la méthode colorimétrique de Jaffé grâce à un automate Konelab 20i auto-analyzer (Thermo Electron Corporation). La concentration en sodium et potassium est mesurée par un photomètre de flamme (IL943, Instruments Laboratory). La concentration en rénine plasmatique a été déterminée par dosage radio-immunologique de l'angiotensine I générée par incubation de plasma en présence d'excès d'angiotensinogène (Menard et al Endocrinology 1972). L'aldostérone urinaire a été déterminée par dosage radio-immunologique (DPC Dade Behring). Le prélèvement de sang est réalisé par une incision de la queue sur des souris anesthésiées par une injection d'un mélange (0,1ml/g de masse corporelle) de kétamine (Imalgene®, Rhône Mérieux; 10%) et de xylazine (Rompun®, Bayer AG; 5%). La mesure de la concentration de potassium plasmatique est réalisée sur un analyseur ABL 77 (Radiometer). La concentration en bicarbonate est calculée des valeurs mesurées par l'équation d'Henderson-Hasselbach.

Pour les injections aiguës d'amiloride, les souris sont placées dans des cages à métabolismes et nourries avec de la nourriture sans NaCl et injectées en sous-cutané avec de l'amiloride à une dose de 1,45mg/ kg de

masse corporelle. Les urines sont collectées sur deux jours de 9h à 15h. Le premier jour, les souris sont injectées uniquement avec le véhicule et les diurétiques le lendemain à 9h. La concentration de sodium urinaire est normalisée par la concentration en créatinine (en mmol/L) afin de minimiser les effets dus à un recueil incomplet sur une si courte période. Le dosage urinaire d'ATP est réalisé grâce à un kit de dosage commercial (référence FLAA Sigma Aldrich) suivant les instructions du fabricant et un luminomètre. Le kit étant sensible à la concentration de sels, les urines sont diluées préalablement au 1/200. Une courbe étalon est réalisée par la mesure de la luminescence des solutions standards en ATP de 2×10^{-9} à 2×10^{-12} mmol/L permet de calculer la valeur de la concentration d'ATP de chaque échantillon. Chaque valeur est normalisée par la concentration urinaire de créatinine.

Microperfusion in vitro de CCD de souris et mesure du flux ionique transépithéliale : Les reins enlevés sont coupés en fines sections de 1 à 2mm puis mis dans un milieu de dissection contenant en mM (118 NaCl, 25 NaHCO₃, 2 K₂HPO₄, 1.2 MgSO₄, 2 Lactate de Calcium, 1 Citrate de Sodium, 5.5 Glucose, 12 Créatinine, pH7.4) et chargé en gaz avec 95% d'O₂ et 5% de CO₂. Des CCDs sont isolés sous microscope (puisque les CCDs sont très hétérogènes, des segments courts de 0,45 à 0,6mm sont disséqués pour maximiser la reproductibilité des mesures). La microdissection in vitro est faite suivant le protocole décrit par Burg (Burg MB, 1982, Kidney Int). Les CCDs isolés sont rapidement transférés dans 1.2 ml de milieu dans une chambre où la température et l'environnement sont contrôlés, puis montés et perfusés à température ambiante avec le milieu, la chambre est continuellement en contact avec 95% et 5% CO₂ pour maintenir le pH à 7,4. La pipette de perfusion est avancée vers le tubule qui s'ouvre sous pression, le côté opposé du tubule est en contact avec une pipette de collection dans laquelle 2 à 3 cm d'huile minérale saturée en eau contribue au maintien de l'ouverture du tubule. Les extrémités, côtes perfusion et collection, sont protégées et étanchéifiées à

l'aide de pipettes dites de « maintien » remplies à leurs extrémités d'un produit de type Dow-Corning 200 dielectric fluid (Dow Corning Corp Midland, MI). Les tubules sont équilibrés à 37°C pendant 20min jusqu'à ce que le flux de collection atteigne le débit de 1 à 4nl/min. La lumière de chaque segment est mesurée en utilisant un micromètre « eyepiece » et puisque les CCDs des souris sont fréquemment instables et se referment rapidement, les mesures ont lieu pendant les 90 premières minutes de perfusion. Quatre périodes de collection d'une durée de 15min chacune pendant lesquelles 15 à 20nl de fluide sont collectés et les volumes des collections sont déterminés sous huile minérale saturée en eau avec des pipettes volumétriques calibrées. 20nL sont nécessaires pour les mesures des concentrations de K⁺ et de créatinine. Le voltage transépithélial est mesuré continuellement entre des électrodes d'argent (Ag-AgCl) connectées à des ponts (NaCl-Agar) insérés dans la pipette de perfusion. La valeur initiale après calibration du tubule est notée puis la moyenne des valeurs pour chaque période est calculée.

Mesure de [Na], [K] et [Créatinine] par HPLC (High-pressure liquid chromatography) : La concentration des cations est déterminée suivant un protocole décrit auparavant (Di Stefano et al 2001). Le système Dionex (Dionex DX-500, Dionex Corp) consiste en autosampler (AS50), une pompe pour mesurer le gradient (GPSO), un détecteur électrochimique (ED40) (pour Na⁺ et K⁺) et un détecteur d'absorbance d'UV 235nm (AD20) (pour la créatinine). Le signal de mesure de la conductivité est amplifié en utilisant un suppresseur de l'autorégénération des cations (CSRS-ultra, 2mm) mis sur le mode « autosuppression recycle ». La colonne HPLC est une colonne Dionex Ion Pac CS12 (4X250mm) équipée avec un protège colonne CG12A (4X50mm). La phase mobile est l'acide méthasulfonique. Le fluide tubulaire, la solution de perfusion et les solutions standards sont distribuées sous huile minérale avec une pipette de calibration de 20n1 puis transférées dans des fioles contenant 35µL de la phase mobile de HPLC en plus du carbonate de lithium (LiNO₃) utilisé

comme standard interne. Les pics obtenus pour chaque mesure sont ajustés avec la valeur du standard interne Li⁺ pour limiter les variations dues à l'injection automatique.

Mesure de l'absorption des fluides : La créatinine est utilisée comme marqueur du volume, ensuite sont ajoutées les solutions de perfusions (celle du bain et le perfusât) à des concentrations de 12mM. Le taux d'absorption des fluides (J_v) est calculé suivant l'équation suivante :

$J_v = (V_{perf} - V_{coll}) / L$, avec « $V_{per} = C_{rcoll} / C_{rperf} \times V_{coll}$ »

C_{rcoll} et C_{rperf} sont les concentrations de la créatinine dans le fluide collecté et le perfusât respectivement, V_{coll} est le taux de collection à la fin du tubule et L correspond à la longueur du tubule.

Calcul du taux d'absorption de le K⁺ : Pour chaque collection, le flux (J) a été calculé et rapporté à la longueur du tubule :

$J_{Na} = ([Na]_{perf} \times V_{per}) - ([Na]_{coll} \times V_{coll}) / L$

$J_K = ([K]_{perf} \times V_{per}) - ([K]_{coll} \times V_{coll}) / L$

$J_{Cl} = MCl_{perf} \times V_{per} - x \times V_{coll} J / L$

Les valeurs positives indiquent une absorption et les valeurs négatives indiquent une sécrétion des ions, pour chaque tubule 4 à 5 périodes de collection ont été testées.

Mesure du pH intracellulaire sur des CCDs microperfusés : Le CCD isolé est transféré dans la chambre de perfusion sur le plateau du microscope inversé contenant la solution A (voir Table 1 ci-après) et cette chambre est continuellement bullée par de l'O₂ pur. Le CCD est ensuite monté sur le système de perfusion puis perfusé d'abord avec la solution A sans sodium sans ammonium et où Na⁺ a été remplacé de manière équimolaire par N-méthyl-D-glucamine⁺ (NMDG⁺). Pour identifier les cellules principales et les cellules intercalaires, ces dernières sont

marquées par la Peanut Lectin Fluorescent (PNA, Vectorlabs) ajoutée du côté apical pendant 5min; à ce terme, et les cellules fluorescentes sont observées. Les cellules du CCD sont ensuite chargées avec la sonde fluorescente BCECF (2'-7'-bis-(2-carboxyethyl)—5(6)-carboxyfluorescein) à une concentration finale de 10 μ M pendant 20min à 37 \pm 0.5°C. Les tubules sont ensuite rincés par l'écoulement du liquide péritubulaire (dépourvu de BCECF) puis équilibrés dans la solution péritubulaire pendant 5 à 10min. La solution est délivrée à un débit de 20ml/min et à la température de 37 \pm 0.5°C. Après équilibration, le fluide péritubulaire est remplacé par un fluide dépourvu de chlorure de manière à dépléter les cellules en Cl⁻. Au début de l'acquisition, le fluide luminal est dépourvu de Na⁺ et NH₄⁺ (solution A). Après 3 minutes, le fluide luminal est remplacé par un liquide contenant 20mM de NH₄⁺ sans chlore (solution B) ce qui entraîne une alcalinisation immédiate des cellules. Après 3 minutes, le fluide luminal est de nouveau changé pour un fluide dépourvu de Na⁺ et de NH₄⁺ (solution A). Cette manœuvre entraîne une acidification cellulaire intense et brutale. La récupération du pH intracellulaire est alors enregistrée pendant 6 minutes. La solution de perfusion est délivrée à la pipette de perfusion via une chambre soumise à la pression d'un gaz inerte (N₂) connecté à une valve manuelle. Avec ce système, l'ouverture de la valve active instantanément le flux des solutions. Le fluide est délivré à la pipette de perfusion à un débit de 4ml/min ce qui permet le changement complet du fluide luminal en 3 à 4 secondes. Pendant l'acquisition, la sonde intracellulaire BCECF, est excitée alternativement à 490 puis 440nm toutes les 2.5 secondes grâce à une lampe halogène 100W. La longueur d'onde d'excitation est déterminée par l'interposition d'un filtre à 440 ou 490 nm placé sur une roue porte filtre contrôlée par un ordinateur. La lumière émise est collectée via un miroir dichroïque puis un filtre de 530nm vers une caméra CCD (ICCD 2525F, Videoscope International). L'intensité de la lumière mesurée est numérisée avec une précision de 8bit (256 niveaux de gris). La fluorescence de base est soustraite de l'intensité de la fluorescence

mesurée à chaque valeur d'excitation pour obtenir les intensités de fluorescence intracellulaire. Pour chaque tubule, 4 à 5 cellules intercalaires et 4 à 5 cellules principales sont analysées. Le ratio 490/440nm est utilisé comme un indicateur de pH intracellulaire (pHi). Le milieu intracellulaire est calibré à la fin de chaque expérience en perfusant les tubules puis en les laissant baigner dans un tampon Hepes contenant 90mM de K⁺ et 10μM de l'échangeur K⁺/H⁺ Nigericine, 4 solutions de calibration titrées à pH égale à 6.3, 6.5, 7 et 7.3 sont utilisées et les valeurs obtenues sont converties en pHi.

en mM	Solution A	Solution B
NMG Cl	119	0
NMG gluconate	0	119
NMG OH	23	23
Ca gluconate	0	15
Glucose	5,5	0
Alanine	5	5,5
HEPES	10	10
CaCl ₂	1,5	0
MgSO ₄	1,2	1
K ₂ HPO ₄	2	2

Table 1 : Composition des solutions pour la mesure du pH intracellulaire

Marquage par immunofluorescence sur du tissu rénal : Les reins de souris sont fixés in situ par la perfusion d'une solution de PBS contenant 4% de paraformaldehyde. Les reins sont ensuite retirés, coupés en tranches de 3-4 mm d'épaisseur et congelés dans de l'azote liquide. Des sections de 5μM d'épaisseur sont réalisées grâce à un cryostat Leica CM 3050S et réhydratées dans une solution de PBS. Les coupes sont ensuite saturées par une solution de PBS contenant 0,05% d'albumine et 10% de sérum de chèvre ou 5% de sérum de chèvre et 5% de sérum d'âne selon l'espèce de l'anticorps secondaire. Les coupes sont ensuite lavées et marquées avec

l'anticorps primaire dans une solution de PBS toute la nuit à 4°C (anticorps de cochon d'Inde dirigé contre AE1 1/2000 ; anticorps de lapin dirigé contre la Pendrine au 1/10000 ; anticorps de poulet dirigé contre la sous-unité E de la V-ATPase au 1/500, anticorps de lapin dirigé contre la sous-unité α du canal ENaC au 1/10000). Après 3 lavages, les coupes sont marquées avec l'anticorps secondaire pendant deux heures à température ambiante (anticorps dirigé contre l'Ig de cochon d'Inde couplé au Cy5 au 1/2000 ; anticorps dirigé contre l'Ig de lapin couplée au fluorochrome 555 au 1/800; anticorps dirigé contre l'Ig de poulet couplée au fluorochrome 488 au 1/2000). Les images sont réalisées grâce à un microscope confocal (Zeiss LSM710).

Comptage du nombre de cellule intercalaire : le comptage est effectué sur toute la surface corticale des coupes histologiques. La surface corticale est déterminée par la présence de glomérule et la partie située après de la dernière ligne de glomérule est exclue. Les cellules α -intercalaires sont identifiées par le marquage apical de la pompe à proton H^+ -ATPase (vert) et de l'échangeur AE1 basolatéral (bleu). Les cellules β -intercalaires sont identifiées par le marquage apical de la pendrine (rouge) et la pompe H^+ -ATPase basolatérale (vert). Les tubules possédant un marquage net et bien différenciés des trois protéines et situés dans les raies médullaires sont identifiés comme étant des canaux collecteurs corticaux. Le reste des tubules possédant le triple marquage est considéré comme des tubules connecteurs. Toutes les cellules intercalaires corticales sont comptées sur chaque coupe (4 coupes de souris sauvage et 4 coupes de souris TgWnk4). Le nombre total de cellules compté entre les coupes n'est pas statistiquement différent. (Test t de Student)

Mesure de la fraction volumique : la fraction volumique des CCDs et des CNTs est mesurée in silico comme décrit précédemment (Mutig K et al. J Biol Chem. 2011 Aug 26;286(34):30200-10). Une grille transparente

régulière avec un espacement de 50µM entre chaque ligne horizontale et verticale est appliquée sur l'image de la coupe. La fraction volumique correspond au nombre d'intersections superposées sur les CCDs ou CNTs par rapport au nombre total d'intersection de la surface corticale de la coupes histologique.

Analyse par immunoblot : les animaux sont anesthésiés avec de la kétamine et de la xylazine (0,1 and 0,01 mg/g de masse corporelle, respectivement). Les reins sont retirés. Lorsque nécessaire, les reins sont coupés en tranche d'épaisseur d'environ 5mm. Le cortex et la médullaire rénales sont séparés sous une loupe binoculaire et placé dans une solution froide tamponnée (250 mM sucrose, 20 mM Tris-Hepes, pH 7,4) contenant des inhibiteurs de protéases: 4 µg/ml d'aprotinine, 4 µg/ml leupeptine, 1,5 µg/ml pepstatine A and 28 µg/ml 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride (AEBSF). Les tissus sont broyé dans 1mL de tampon avec un homogénéiseur Ultraturrax à vitesse maximale (24000 tpm) pendant 30 secondes dans la glace. L'homogénat est centrifugé à 4000g pendant 10 minutes à 4°C et le surnageant est par la suite centrifugé à 17000g pendant 30 minutes à 4°C. Le culot est resuspendu dans du tampon. La concentration en protéine est déterminée par la méthode de Bradford (microBradford, Bio Rad Laboratories).

Les protéines sont solubilisées dans un tampon de charge (62,5 mM Tris HCl, pH 6,8, 2% SDS, 100 mM dithiotreitol, 10% glycérol et bleu de bromophenol), incubées températures ambiantes pendant 30 minutes. L'électrophorèse est effectuée sur des gel polyacrylamide à 7,5% (XCell SureLock Mini-cell, Invitrogen Life Technologies), et coloré avec du bleu de Coomassie afin de mesuré la quantité total dans chaque puits de protéines. Les protéines sont transférées par électrophorèse pendant 2 heures à 4°C sur un membrane de nitrocellulose (Amersham) et marquée au rouge Ponceau dans de l'acide acétique afin de vérifier l'uniformité du transfert sur la membrane. Les membrane sont ensuite incubées pendant 1 heure à température ambiante dans une solution

saline tamponnée au phosphate et contenant 5% de lait en poudre écrémé pour bloqué les sites non-spécifiques de fixation de l'anticorps, suivie par une incubation toute la nuit dans une solution de PBS contenant l'anticorps primaire (anti-NDCBE 1:500 ; anti-NCC 1:50000; ; anti-Pendrin 1:10000; anti α -ENaC 1:10000 ; anti γ -ENaC 1:30000 ; anti α -ENaC 1:10000) et contenant 1% de lait en poudre écrémé. Après 5 lavage avec une solution PBS contenant 0,01% de Tween-20, les membranes sont incubée pendant 2 heures à température ambiante dans une solution de PBS 5% lait et l'anticorps secondaire conjuguée à la peroxydase (chèvre anti lapin au 1:10000 (Biorad) ; cheval anti-chèvre (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Les membranes sont nettoyées et une solution chimioluminescence contenant du luminol (ECL, Perkin Elmer Life Science Products) est utilisée pour visualiser les anticorps liés avant son exposition sur un film photographique (Hyperfilm ECL (Amersham)). L'autoradiographie est numérisée à l'aide d'un scanner (Epson Perfection V500 Photo) et chaque bande est quantifiée grâce au logiciel NIH Image. Les valeurs densitométriques sont normalisées par rapport à la moyenne des valeurs du groupe contrôle définie à 100% et les résultats sont exprimés en moyenne \pm S.E.

Résultat

Le transport électroneutre de NaCl, sensible aux diurétiques thiazidiques, dans le canal collecteur est activé chez les souris TgWnk4^{PHAI}

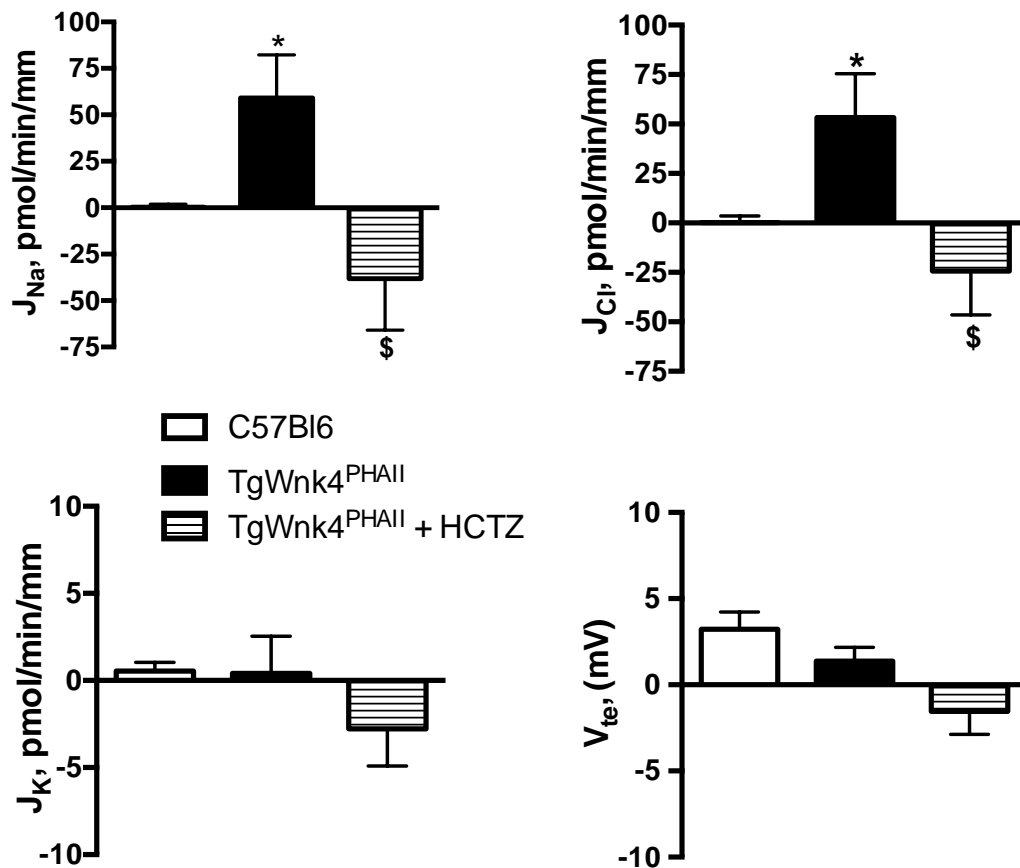


Figure 1 Mesure du transport de sodium (J_{Na}), de chlorure (J_{Cl}) et de potassium (J_K) et du voltage transépithélial (V_{te}) par microperfusion de canal collecteur isolé chez la souris sauvage (blanc) et TgWnk4^{PHAI} (noir) en l'absence ou en présence d'hydrochlorothiazide HCTZ (hachurée). Des canaux collecteurs corticaux microdisséqués sont microperfusés par l'une des extrémités et le perfusé collecté par l'autre extrémité. La mesure de la différence de concentration en Na^+ , Cl^- et K^+ entre la solution perfusée et collectée permet de déduire le flux net d'ions. L'effet de l'HCTZ sur le flux de Na, Cl et K ainsi que la V_{te} est observé par ajout de $10^{-4}M$ d'HCTZ dans la lumière du tubule. Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM. La comparaison des groupes a été effectuée par le test t de Student non apparié. * $p < 0,05$ significatif par rapport au groupe contrôle ; \$ $p < 0,05$ significatif par rapport au groupe TgWnk4^{PHAI}.

Afin de vérifier l'hypothèse selon laquelle, chez les souris PHAII, la réabsorption de NaCl par la voie électroneutre NDCBE/Pendrine est activée dans le canal collecteur cortical (CCD), nous avons mesuré les flux transépithéliaux de sodium, de chlorure et de potassium chez des souris sauvage et TgWnk4^{PHAII} en régime normal en NaCl (0,3% Na⁺) par microperfusion de CCD microdisséqués (figure 1). Dans ces conditions, chez les souris sauvages nous ne détectons pas de transport de NaCl. Sur la figure 1, on observe que les souris transgéniques TgWnk4^{PHAII} présentent une réabsorption nette de NaCl et ne développent pas de lumière transépithéliale négative ou de sécrétion de potassium. Ces résultats suggèrent que le canal ENaC n'est pas responsable du transport observé. Afin de montrer que ce transport passe par la voie NDCBE/Pendrine nous avons répété l'expérience en présence d'hydrochlorothiazide. Ce traitement abolit complètement le transport de NaCl chez les souris transgéniques (figure 1).

L'activité pendrine est plus importante chez les souris TgWnk4^{PHAII}

Afin de confirmer que la voie NDCBE/Pendrine est plus active chez les souris TgWnk4^{PHAII}, nous avons évalué l'activité de la pendrine en mesurant la vitesse d'alcalinisation des cellules intercalaires en réponse à un retrait du chlore dans la lumière sur des CCDs microperfusés (figure 2). Lorsque le tubule est perfusé avec une solution de concentration en chlorure de 120 mmol/L, la pendrine fait rentrer du chlore dans la cellule et sortir du bicarbonate. Lors de l'injection de la solution déplétée en chlore, la pendrine suit le gradient de concentration du chlore, le fait sortir de la cellule et rentrer du bicarbonate (figure 2 à gauche) Nous mesurons alors les variations du pH intracellulaire lors du changement de concentration en chlore luminal. La vitesse d'alcalinisation de la cellule β -intercalaires nous permet de déterminer l'activité de transport de bicarbonate et donc l'activité de la pendrine. Les résultats indiquent une

vitesse d'alcalinisation plus importante chez les souris transgéniques par rapport aux souris sauvages, soit une activité de transport par la pendrine plus grande chez ces souris $TgWnk4^{PHAI}$.

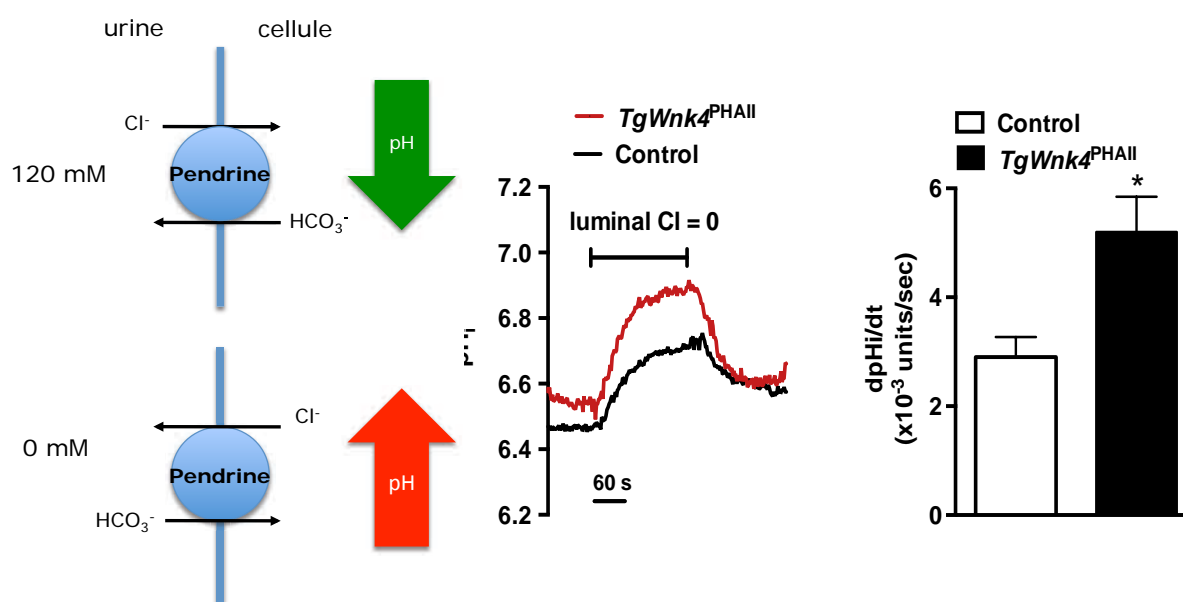
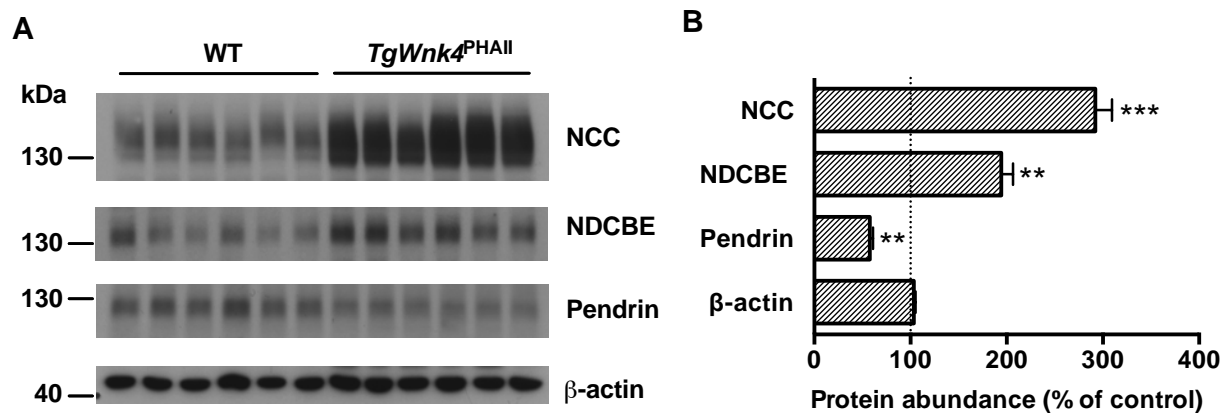


Figure 2 Mesure de l'activité de la pendrine dans des canaux collecteurs corticaux (CCD) isolés et microperfusés de souris sauvages (blanc) et $TgWnk4^{PHAI}$ (noir). Les cellules des CCDs sont chargées en BCECF, une sonde fluorescente sensible à des variations de pH. Le CCD est perfusé dans un premier temps avec une solution physiologique contenant 120 mmolL^{-1} de chlore puis avec une solution sans chlore. La variation de pH en fonction du temps (dpH/dt) donne la vitesse d'alcalinisation des cellules β -intercalaires qui sont identifiées par le marquage de leur membrane apicale avec de la peanut lectine fluorescente. 4 souris sauvages et 7 souris $TgWnk4^{PHAI}$ ont été étudiées. Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM. La comparaison des groupes a été effectuée par le test t de Student non apparié. * $p < 0,05$ significatif par rapport au groupe de souris sauvages.

Expression de NDCBE et de la Pendrine chez les souris $TgWnk4^{PHAI}$



avons mesuré l'expression par western blot de NCC, de NDCBE et de la pendrine dans des préparations de membranes plasmiques de cortex de rein de souris sauvages (WT) et mutées ($TgWnk4^{PHAI}$). Comme attendu, l'expression de NCC est augmentée chez les souris $TgWnk4^{PHAI}$. L'expression de NDCBE est fortement augmentée chez les souris $TgWnk4^{PHAI}$. De manière surprenante, l'expression de la pendrine est diminuée chez les souris transgéniques comparées aux souris sauvages. Ces résultats suggèrent que l'augmentation de l'activité de la pendrine dans le CCD peut être le résultat de mécanismes régulateurs post-traductionnels et/ou une expression diminuée de la pendrine dans d'autres segments du néphron tels que le CNT, ce segment étant beaucoup plus représentés dans le cortex rénal que le canal collecteur.

Le nombre de cellules intercalaires de type B et la fraction volumique des CCD sont augmentés chez les souris $TgWnk4^{PHAI}$

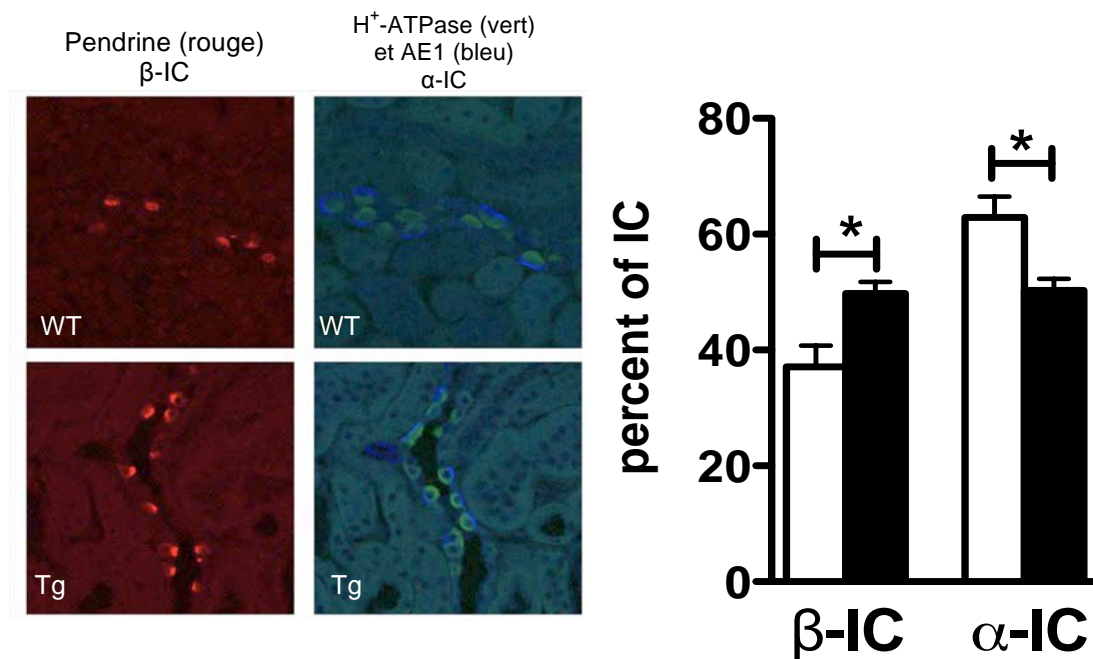


Figure 4 Expression de la pendrine par immunohistochimie sur des coupes de rein de souris sauvages et mutantes et comptage des cellules intercalaires α et β . Les cellules α -intercalaires sont identifiées par le co-marquage de la H⁺-ATPase apicale (vert) et AE1 basolatéral (bleu) et les cellules β -intercalaires par le marquage pendrine (rouge) chez les souris sauvages (WT) et mutantes (Tg). La proportion de cellules α et β chez les souris sauvages (blanc) et TgWnk4^{PH^{all}} (noir) est obtenue par le comptage de toutes les cellules intercalaires des CCDs visibles sur la coupe (n=4 pour les deux groupes). Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM. La comparaison des groupes a été effectuée par le test t de Student non apparié. *p<0,05 significatif par rapport au groupe de souris sauvages.

Des immunomarquages de la pendrine sur des coupes de rein congelés montrent que l'expression de la pendrine est augmentée chez les souris TgWnk4^{PH^{all}} (figure 4, gauche). Nous avons entrepris le comptage des cellules intercalaires dans les canaux collecteurs corticaux. Les cellules α -intercalaires sont détectées grâce au co-immunomarquage de la pompe à proton H⁺-ATPase apicale et l'échangeur AE1 et les cellules β -intercalaires par le co-immunomarquage de la pendrine apicale et de la pompe à proton H⁺-ATPase basolatérale (figure 4 gauche). Le comptage des cellules a été effectué sur l'ensemble de la coupe transversale du rein et limité aux raies médullaires qui contiennent les canaux collecteurs corticaux. Chez les souris sauvages, 1867 cellules ont été comptées

réparties en 4 coupes de 4 souris différentes. Chez les souris $TgWnk4^{PHAI}$, 1955 cellules ont été comptées réparties aussi en 4 coupes de 4 souris différentes. Le nombre total de cellules comptées entre les deux populations n'est pas statistiquement différent. Chez les souris sauvages, les cellules β -intercalaires représentent environ 37% des cellules intercalaires alors que chez les souris $TgWnk4^{PHAI}$ elles représentent près de 45% des cellules intercalaires (figure 4, droite). A l'inverse le nombre de souris α -intercalaires est diminué chez les souris transgéniques par rapport aux souris sauvages.

Ces résultats montre que le nombre de cellules qui expriment la pendrine augmente dans les CCD des souris $TgWnk4^{PHAI}$. L'activité de la pendrine par cellule étant augmentée (figure 2), nous concluons que l'activité de transport de la pendrine est globalement augmentée dans les CCD des souris $TgWnk4^{PHAI}$. Cette augmentation d'activité est associée à une augmentation de la fraction volumique des CCD (figure 5). La fraction volumique correspond au volume de l'ensemble des CCDs sur le volume total du cortex rénal.

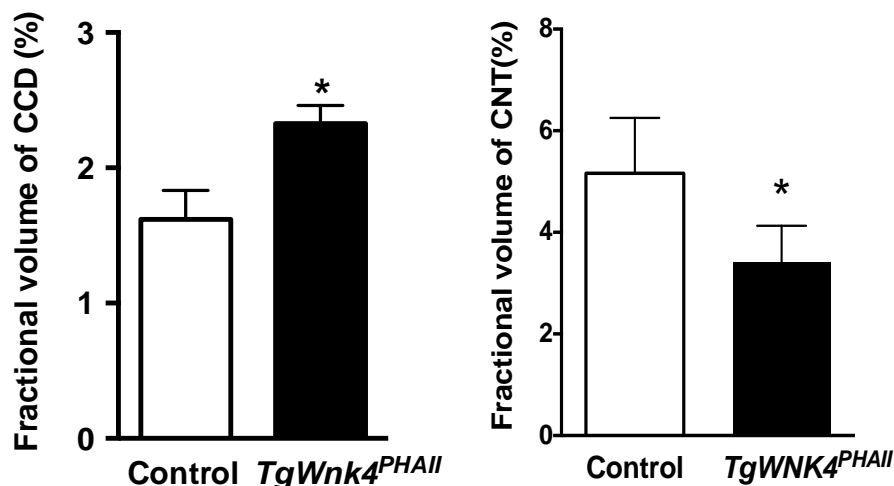


Figure 5 Fraction volumique des CCDs (gauche) et CNTs (droite) chez la souris sauvage (blanc) et $TgWnk4^{PHAI}$ (noir). Le volume des canaux collecteurs dans le cortex rénal est déterminé in silico à partir des clichés ayant servis au comptage des cellules intercalaires. La fraction volumique est le rapport du volume de l'ensemble des CCDs ou des CNTs sur le volume totale du rein. Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM. La comparaison des groupes a été effectuée par le test t de Student non apparié. * $p < 0,05$ significatif par rapport au groupe de souris sauvages.

L'expression de ENaC augmente chez les souris TgWnk4^{PHAI} mais pas son activité

Nos expériences réalisées sur des CCD isolés et microperfusés montrent qu'aucune activité ENaC n'est détectable chez les souris TgWnk4^{PHAI}. Ces résultats sont en apparente contradiction avec des études précédentes montrant que l'activité de ENaC et son expression sont augmentées chez les souris portant la mutation Wnk4^{PHAI} (Ring et al. PNAS 2007 ; Yang et al. Cell metabolism 2007). Nous avons donc mesuré l'expression des sous-unités α et γ par western blot à partir de préparations de membranes plasmiques de cortex rénal (n=6 dans les deux populations). La figure 6B montre que l'expression de la sous unité α est augmentée chez les souris TgWnk4^{PHAI} comme précédemment décrit (Yang et al. Cell metabolism 2007). L'expression de la forme clivée de la sous-unité γ n'est pas significativement augmentée. Des expériences d'immunohistochimie confirment l'augmentation de l'expression de la sous-unité α de ENaC chez les souris TgWnk4^{PHAI} (figure 6A). Cette augmentation de l'expression de ENaC chez les souris TgWnk4^{PHAI} est en accord avec l'augmentation de la excrétion urinaire d'aldostérone observée chez ces mêmes souris ($4,37 \pm 0,36$ nmol/mmol créatinine ; n=8 chez les sauvage contre $5,93 \pm 0,47$ nmol/mmol créatinine ; n=6 chez les souris TgWnk4^{PHAI} ; $p < 0,05$).

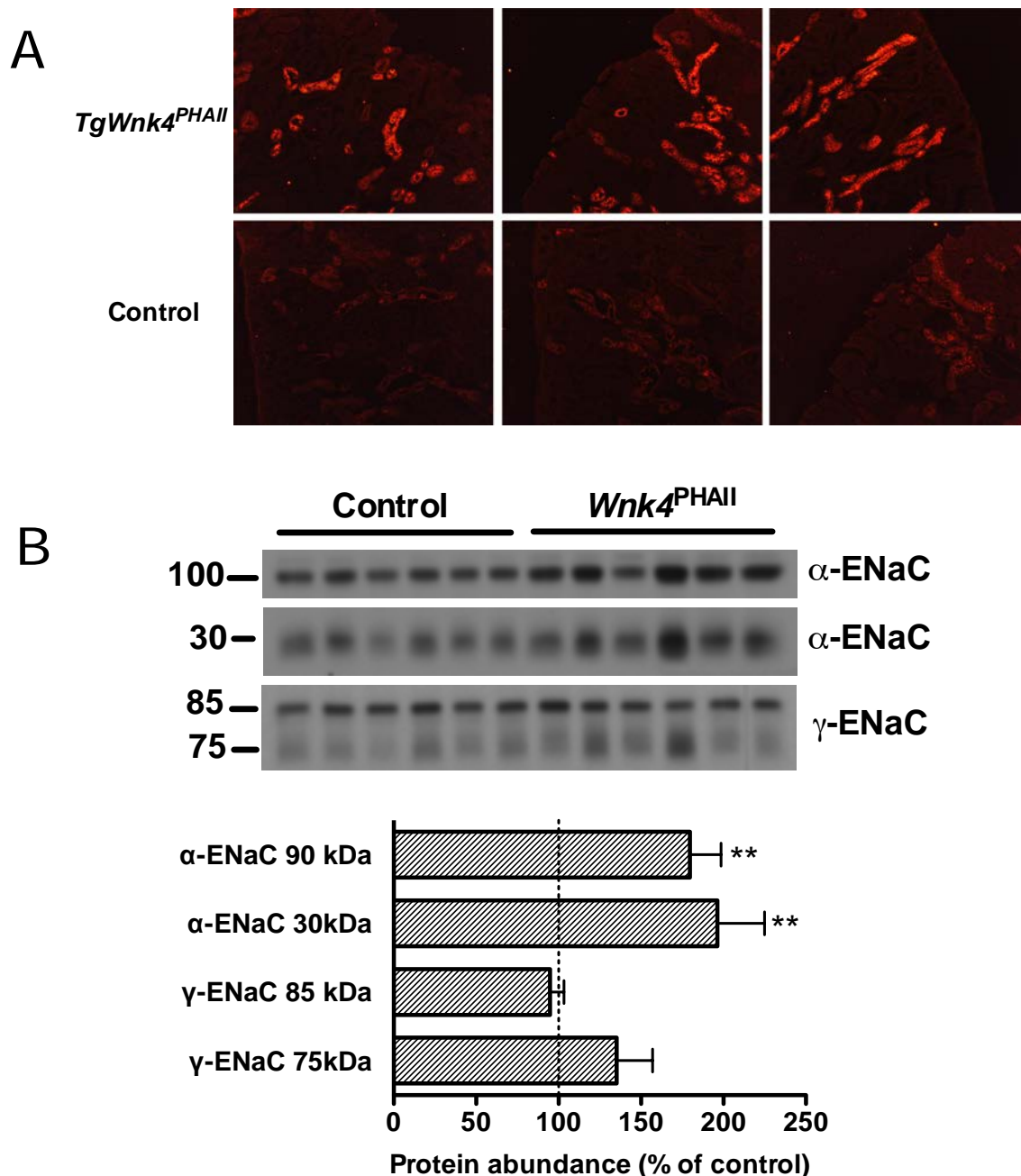


Figure 6 Expression de ENaC chez les souris sauvages et mutantes par immunohistochimie et immunoblots. **A.** Des coupes de rein congelé sont immunomarquées avec un anticorps dirigé contre la sous-unité α du canal ENaC, l'augmentation du signal chez le *TgWnk4^{PHAI}* est observée sur trois coupes de rein provenant de trois souris différentes. **B.** L'expression des sous-unités α et γ du canal ENaC sont mesurée par immunoblot. L'anticorps dirigé contre la sous unité α reconnaît deux bandes à 90kDa et 30kDa. L'anticorps dirigé contre la sous-unité γ reconnaît deux bandes à 85 et 75kDa. Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM. La comparaison des groupes a été effectuée par le test t de Student non apparié. ** $p < 0,01$ significatif par rapport au groupe de souris sauvage.

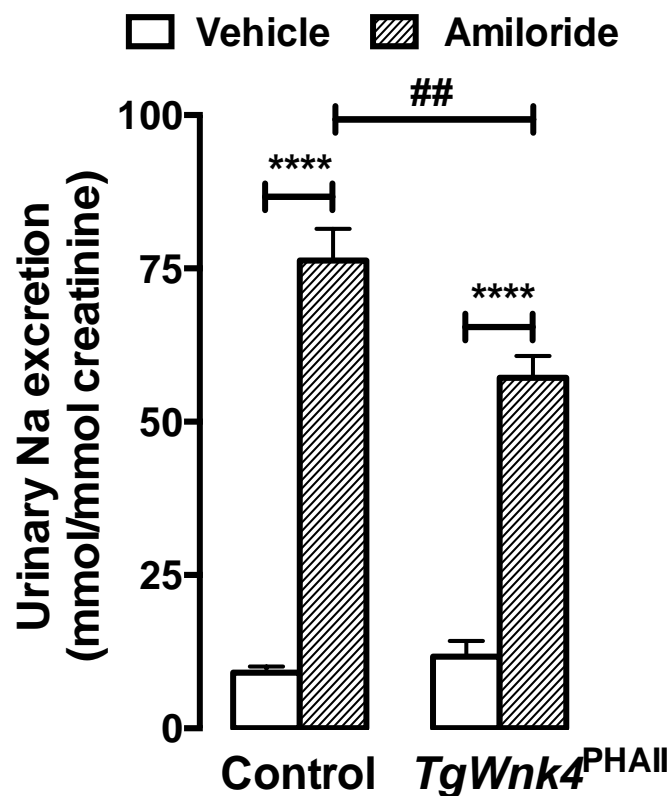


Figure 7 Effet de l'amiloride sur l'excrétion urinaire de Na⁺ chez les souris sauvages et TgWnk4^{PHAII}. Les recueils d'urines sont effectués pendant deux jours consécutifs sur une période de 6 heures. Le premier jour, les souris reçoivent le matin une injection sous-cutanée du véhicule. Le deuxième jour, les souris reçoivent le matin une injection sous-cutanée d'amiloride (1,45mg/kg de masse corporelle). Les urines des souris sont recueillies 6 heures après chaque injection. La quantité de sodium urinaire avant (barres blanches) et après l'injection (barres grisées) est normalisée par la concentration en créatinine urinaire (en mmol) afin de prévenir les erreurs dues au recueil. 14 souris WT et 13 souris TgWnk4^{PHAII} ont été étudiées. Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM. La comparaison des groupes a été effectuée par ANOVA suivie par le test de Bonferroni. ****p<0,0001 ; ***p<0,001 avant versus après injection du diurétique. ##p<0,001 souris WT vs. TgWnk4^{PHAII} après injection du diurétique.

Nous avons ensuite testé l'effet de l'amiloride sur l'excrétion de Na⁺ chez les souris sauvages et transgéniques (figure 7). Les résultats montrent que l'excrétion urinaire de Na⁺ est moins importante chez les souris transgéniques indiquant que l'activité de ENaC est diminuée chez ces souris. Ces observations suggèrent donc qu'il existe un facteur local capable d'inhiber spécifiquement l'activité de ENaC dans le canal collecteur.

L'excrétion d'ATP est beaucoup plus importante chez les souris

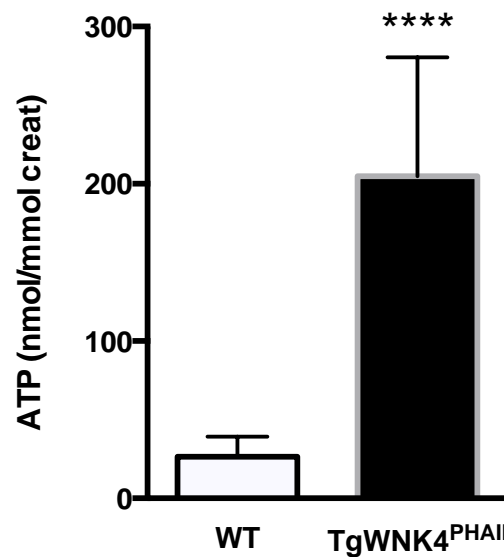


Figure 8 Excrétion urinaire d'ATP chez les souris sauvages (blanc) et les souris TgWnk4^{PHAI} (noir). Le recueil d'urine est effectué sur 10 heures et la mesure d'ATP est réalisée à l'aide d'un kit de dosage commercial et un luminomètre. Les valeurs sont ensuite normalisées par la créatinine urinaire (en mmol). La comparaison des groupes a été effectuée par le test t de Student non apparié. ****p<0,0001 significatif par rapport au groupe de souris sauvage.

L'ATP et la PGE2 étant des inhibiteurs connus de ENaC, nous avons voulu tester l'hypothèse selon laquelle l'absence d'augmentation de l'activité de ENaC chez les souris transgéniques malgré l'augmentation de son expression est due à un blocage de ENaC par l'ATP et/ou la PGE2 du fluide tubulaire. Nous avons donc mesuré l'excrétion urinaire d'ATP chez les souris sauvages et TgWnk4^{PHAI}. Les résultats montrent une excrétion d'ATP urinaire près de 9 fois plus importante chez les souris TgWnk4^{PHAI} par rapport aux souris sauvages. En revanche l'excrétion urinaire de PGE2 n'est pas augmentée (227.6 ± 54.9 ng/mmol créatinine vs. 207.2 ± 33.3 ng/mmol créatinine, n=7 dans chaque groupe, NS). Cette excrétion massive d'ATP pourrait donc être une explication à l'activité diminuée du canal ENaC observée chez les souris TgWnk4^{PHAI}.

Discussion

L'Hypertension hyperkaliémique familiale étant sensible aux diurétiques thiazidiques, la plupart des études se sont concentrées sur la régulation du cotransporteur NCC du tubule contourné distal, la cible reconnue des thiazidiques, par les kinases WNK. Nous avons récemment mis en évidence une nouvelle voie de réabsorption de NaCl dans les cellules intercalaires du canal collecteur cortical, impliquant le couplage de deux transporteurs apicaux, la pendrine et NDCBE, qui s'est avérée être une cible insoupçonnée des thiazidiques. Nous avons donc fait l'hypothèse que la FFHt pourrait être la conséquence de l'activation de NCC mais aussi de ce nouveau système de transport de NaCl sensible aux diurétiques thiazidiques. Notre étude montre que, chez la souris exprimant une forme mutée de WNK4 et présentant un phénotype FHt, NCC n'est pas le seul transporteur de NaCl affecté. En effet, la réabsorption de NaCl sensible aux diurétiques thiazidiques des cellules intercalaires β du canal collecteur est aussi augmentée alors que ENaC, malgré l'augmentation de son expression, ne semble pas actif. Nous proposons que l'hypertension dans la FFHt ne soit pas seulement due à une augmentation anormale de l'activité de transport de NaCl via NCC dans le tubule contourné distal mais aussi à l'activation du système pendrine/Ndcbe dans le canal collecteur et que WNK4 soit un régulateur du système pendrine/Ndcbe et plus particulièrement de la pendrine.

A ce jour, plusieurs équipes se sont intéressées à la régulation du canal ENaC par WNK4. Une augmentation de l'activité de ENaC a été observée dans le colon distal des souris TgWNK4^{PHAI} par le groupe de Lifton (Ring et al., 2007). Concernant les mesures d'activité de ENaC, les résultats de notre étude diffèrent radicalement de ceux obtenus par le groupe de Lifton. En effet, dans notre étude, le voltage transépithélial mesuré sur des CCDs isolés était identique chez les souris sauvages et les souris TgWNK4^{PHAI} (figure 1), indiquant que l'activité de ENaC n'est pas

augmentée dans les CCDS des souris TgWnk4^{PHAI} (figure 1). De même, nous avons montré que l'activité de ENaC évaluée par la natriurèse induite par l'injection d'amiloride n'est pas augmentée mais plutôt légèrement diminuée chez les souris TgWnk4^{PHAI} (figure 7). Des mesures de voltage transépithélial réalisées par le groupe de Uchida sur des CCDs isolés suggèrent que l'activité de ENaC est légèrement augmentée dans un autre modèle de souris FFHt généré par knock-in de la mutation D561A dans le gène de Wnk4 (Wnk4^{D561A/+}) (S. S. Yang et al., 2007). Toutefois, nous pensons que ces derniers résultats sont discutables compte tenu de la variabilité de la mesure du potentiel transépithélial au cours de ce type d'expériences et de la faible différence observée entre les deux groupes ($-1,7 \pm 0,7$ mV vs $-3,8 \pm 0,7$ mV ; $p < 0,05$). Dans cette même étude a été rapportée une augmentation de l'expression protéique de ENaC dans le canal collecteur des souris Wnk4^{D561A/+} (S. S. Yang et al., 2007). Nous avons obtenu des résultats similaires à savoir une augmentation de l'expression d'ENaC dans le rein des souris TgWnk4^{PHAI} à la fois par western blot et par immunohistochimie (figure 6).

L'ensemble de ces études suggère que Wnk4 muté active ENaC mais que, dans le néphron distal, il existerait un facteur local capable d'inhiber l'activité de transport de ENaC.

Une activation de ENaC chez les souris porteuses de mutations FFHt est en accord avec les études de co-expression réalisées dans l'oeuf de Xénope montrant que Wnk4 muté perd sa capacité à inhiber ENaC (Ring et al. 2007). Toutefois, des études récentes montrent que la mutation de Wnk4 empêche son interaction avec le complexe ubiquitine ligase CUL-3/KLHL3 diminuant ainsi sa dégradation et provoquant son accumulation (Wakabayashi et al., 2013), ce qui devrait conduire à une inhibition plus marquée de ENaC et pas à son activation comme observée par Ring et al.. L'aldostérone qui est plus élevée chez les souris TgWnk4^{PHAI} du fait de leur hyperkaliémie pourrait rendre compte de l'augmentation de l'expression de ENaC indépendamment de Wnk4. En effet, l'augmentation

de l'expression de ENaC est particulièrement visible sur sa sous-unité α dont l'expression est connue pour être fortement régulée par l'aldostérone. Néanmoins, Ring et al ont montré que, in vitro, SGK1, un médiateur de l'aldostérone, phosphoryle WNK4, l'empêchant ainsi d'inhiber ENaC (Ring et al., 2007).

Notre étude montre que, dans le canal collecteur cortical des souris $TgWNK4^{PHAI}$, ENaC n'est pas fonctionnel alors que son expression à la membrane plasmique est augmentée. Certains facteurs paracrines tels que la PGE2 et l'ATP sont connus pour inhiber le transport de Na^+ dans le canal collecteur notamment en bloquant ENaC. De plus, nous avons récemment mis en évidence une cascade de signalisation ATP/PGE2 émanant des cellules intercalaires b, capable d'inhiber les fonctions de transport de la cellule principale adjacente (Gueutin et al., 2013). Les souris $TgWNK4^{PHAI}$ présentant une excrétion urinaire d'ATP 10 fois supérieure à celle des souris sauvages (figure 8), nous proposons que ENaC ne soit pas actif chez la souris transgénique, malgré l'augmentation de son expression, car bloqué par l'ATP présent dans le fluide tubulaire. De plus, la diminution de l'activité de ENaC observée chez les souris $TgWNK4^{PHAI}$ pourrait être consécutive à l'augmentation de l'activité de NCC dans le segment d'amont, ce qui entrainerait une diminution de la sécrétion de K^+ via ROMK et donc une hyperkaliémie.

Nos expériences de microperfusion montrent qu'il existe un transport de NaCl dans le canal collecteur des souris $TgWNK4^{PHAI}$ absent chez les souris sauvages (figure 1). Les flux transépithéliaux de Na et de Cl étant complètement abolis en présence de HCTZ signifie que la réabsorption de NaCl par les CCD des souris $TgWNK4^{PHAI}$ s'effectue par le système de transport Ndcbe/pendrine et non par ENaC. En accord avec l'augmentation de l'activité de transport des CCDs, nous avons observé une augmentation du volume des CCDs des souris $TgWNK4^{PHAI}$. A titre de comparaison, le volume des CNTs dont la composition cellulaire et la fonction sont proches

des CCDs était diminué, ce qui suggère que l'augmentation de l'activité de transport de NaCl observée chez les souris $TgWnk4^{PHAI}$ serait restreinte aux CCDs. Des immunoblots semi-quantitatifs obtenus à partir de préparations enrichies en membranes plasmiques du cortex montrent que l'expression de la protéine NDCBE est augmentée alors que, de façon surprenante, l'expression de la pendrine apparaît plutôt diminuée. Nos expériences d'immunofluorescence montre néanmoins un marquage de la pendrine plus important dans les CCDs des souris $TgWnk4^{PHAI}$ que l'on a pu attribuer à une augmentation du nombre de cellules intercalaires b. La pendrine en sécrétant des ions bicarbonates dans la lumière tubulaire joue un rôle important dans la régulation de la balance acido-basique et son expression est connue pour être diminuée en réponse à une acidose métabolique (Frische et al., 2003). La diminution paradoxale de l'expression de la pendrine observée par immunoblots chez les souris $TgWnk4^{PHAI}$ pourrait donc être attribuée à l'acidose observée dans ce modèle de souris. Dans les préparations membranaires de cortex rénal, la majorité de la pendrine détectable provient des CNTs, ce qui suggère que la baisse de l'expression de la pendrine dans le cortex observée par immunoblots pourrait refléter une diminution de son expression plus particulièrement dans les CNTs.

Une étude récemment publiée par l'équipe de G Gamba a montré que chez les souris invalidées pour WNK4 chez lesquelles NCC est quasi absent, la réabsorption de Na^+ dans le CCD est complètement inhibée par l'amiloride, ce qui suggère que ENaC est activée mais pas le système pendrin/Ndcbe. Pour comparaison, chez les souris invalidées pour NCC, la réabsorption de Na^+ dans le CCD s'effectue seulement via le système pendrin/Ndcbe. L'ensemble de ces résultats suggèrent fortement que WNK4 puisse réguler la voie électroneutre de transport de NaCl dans les cellules intercalaires. Nous avons montré que l'activité de transport de la pendrine était augmentée dans le CCD des souris $TgWnk4^{PHAI}$, ce qui fait de la pendrine une cible possible pour la kinase WNK4. WNK4 qui est

majoritairement exprimé dans le tubule contourné distal est également exprimé dans les cellules principales et intercalaires du canal collecteur (Ohno et al. 2011) ((Shibata, Rinehart, et al., 2013). A ce jour, deux études montrent que la pendrine est régulée par phosphorylation. La phosphorylation du résidu T717, un site potentiel de la PKA, est nécessaire pour la translocation de la pendrine du cytosol à la membrane plasmique en réponse à la stimulation par la TSH dans des cellules thyroïdiennes en culture (Pesce et al., 2012). Dans les cellules OKP, il a été montré que la phosphorylation du résidu S49 de la pendrine par la PKA est nécessaire à sa translocation à la membrane plasmique et à son activation (Azroyan et al., 2012). L'analyse in silico de la pendrine révèle qu'il existe plusieurs autres sites potentiels de phosphorylation contenant une sérine. Néanmoins, l'activité kinase de WNK4 n'est pas toujours nécessaire et notamment il a été montré que ROMK est régulé par WNK4 indépendamment de son activité kinase (Ring et al.). Pour tester l'hypothèse selon laquelle WNK4 régule l'activité de la pendrine, nous réalisons actuellement en collaboration avec Gerardo Gamba (Mexico, Mexique) des expériences de transport dans des oocytes de xénope exprimant la pendrine avec ou sans WNK4 muté. Nous utiliserons cette même approche pour déterminer les effets de WNK4 sauvage sur l'activité de la pendrine.

Récemment, le groupe de Lifton a montré que la phosphorylation de la sérine S843 dans le domaine de liaison du récepteur MR empêche son activation par l'aldostérone. (Shibata, Rinehart, et al., 2013). Dans le rein, cette forme phosphorylée du MR n'est exprimée que dans les cellules intercalaires. De façon intéressante, cette étude montre que la régulation de l'expression de la pendrine par l'aldostérone dépend du niveau de phosphorylation du MR. Chez les souris TgWNK4^{PHAI} qui présentent un niveau de phosphorylation du MR plus bas que celui des souris sauvages, l'augmentation de l'expression de la pendrine en réponse à l'aldostérone est plus importante. L'augmentation de l'activité de la pendrine et donc du

transport de NaCl par le système pendrine/Ndcbe que nous avons observé dans les CCDs des souris TgWnk4^{PHAI} pourrait donc résulter de la sensibilité accrue de ces souris à l'aldostérone du fait de la baisse du niveau de phosphorylation du MR. Inversement, le transport de Na⁺ par le système pendrine/Ndcbe est inexistant dans les CCDs des souris knockout pour Wnk4 (Castaneda-bueno et al., PNAS 2012), qui présentent un niveau de phosphorylation du récepteur MR plus élevé (Shibata, Rinehart, et al., 2013). (Shibata, Rinehart, et al., 2013) ont montré que l'état de phosphorylation du MR dépend de l'angiotensine II et de la charge en K⁺, le niveau de phosphorylation du MR diminuant en réponse à l'angiotensine II et augmentant en réponse à une charge en K⁺. Malheureusement, les voies de signalisation impliquées dans la régulation de l'état de phosphorylation du MR dans les cellules intercalaires n'ont pas été élucidées. Il est proposé que la déphosphorylation du MR en réponse à l'angiotensine II implique Wnk4 et la protéine phosphatase PP1.

En conclusion, dans cette étude nous avons montré que chez les souris TgWnk4^{PHAI}, l'activité de transport de NaCl via le système pendrine/NDCBE des cellules intercalaires est augmentée. Cette activation est très probablement une conséquence directe de la mutation dans le gène Wnk4 et contribue à la mise en place de la FHHT. Notre étude révèle la pendrine comme une cible possible de Wnk4. Enfin, pour déterminer les conséquences de l'activation de la pendrine par Wnk4 dans le développement du phénotype FHHT, nous avons entrepris la génération de souris invalidées pour la pendrine, porteuses de la mutation Wnk4^{PHAI}. Il serait notamment intéressant de déterminer si les double-mutants développent ou non une acidose.

CONCLUSION GENERALE

Dans cette thèse, nous avons pu démontrer que les cellules β -intercalaires jouaient deux rôles importants: la réabsorption électroneutre de NaCl qui participe au maintien de la balance du sodium et la sécrétion de facteurs locaux permettant de moduler le transport de sodium par les cellules principales. Ces résultats soulèvent alors plusieurs questions.

Quelle est l'importance de ce transport de NaCl par rapport aux autres transports dans le néphron distal ?

Aujourd'hui, de nombreux systèmes de transport de NaCl dans le néphron ont été découverts. Ces systèmes sont déjà particulièrement décrits et étudiés par de nombreuses équipes. Nous nous intéressons ici à une voie de transport mise en évidence que très récemment et dont la caractérisation reste encore inédite.

Par rapport au transport dans les cellules principales, l'activation de cette voie permet la réabsorption à la fois de sodium et de chlore sans affecter la sécrétion de potassium et sans générer de voltage transépithélial.

Nous pensons que ce système de transport est complémentaire du transport de NaCl par NCC dans le DCT. Plusieurs indices nous indiquent que les transports par ces deux systèmes sont liés. D'une part, chez les souris TgWnk4^{PHAI}, l'expression de NDCBE et l'activité de la pendrine sont augmentées de la même manière que l'expression et l'activité de NCC (Laloti et al., 2006). D'autre part, NCC et le couple NDCBE/Pendrine sont tous les deux sensibles aux diurétiques thiazidiques (Leviel et al., 2010). De plus, nous avons montré que l'activité de NCC compense la perte de NDCBE chez les souris *Ndcbe*^{-/-}. On peut ainsi imaginer que la voie NDCBE/Pendrine et le transporteur NCC sont contrôlés par des mécanismes de régulation similaires et pouvant permettre d'expliquer la sensibilité aux diurétiques thiazidiques du couple NDCBE/Pendrine. Ce lien entre les deux systèmes renforce l'hypothèse que la réabsorption par les

cellules β -intercalaires participe, lorsqu'elle est suractivée, à la mise en place de l'hypertension hyperkaliémique familiale.

L'étude de la voie NDCBE/Pendrine chez les modèles de souris présentant une suractivation de NCC sans développer de phénotype PHAII telles que les souris transgéniques Tg-NCC, possédant plusieurs copies du gène *Ncc*, ou les souris knock-out pour *KS-WNK1* (McCormick et al., 2011) (Hadchouel et al., 2010), pourrait permettre de démontrer que le couple NDCBE/Pendrine n'est pas suractivé chez ces modèles.

A l'inverse, l'inactivation de la voie NDCBE/pendrine chez les souris TgWNK4^{PHAII} par croisement avec les souris knockout pour la pendrine, actuellement en cours de génération, permettrait, *in vivo*, d'évaluer le lien de causalité entre la réabsorption par les cellules β -intercalaires et l'hypertension hyperkaliémique familiale. Une normalisation du pH sanguin, de la concentration en potassium plasmatique et de la pression artérielle prouveraient que la suractivation de la voie est aussi responsable de la maladie.

Dans des conditions non pathologiques, nous émettons aussi l'hypothèse que la voie NDCBE/Pendrine sert à minimiser la perte de NaCl lorsque la concentration urinaire en NaCl est particulièrement basse, dans le cas par exemple d'une consommation d'eau sans apport alimentaire. Cette hypothèse émane des observations faites chez une race de raie (*Dasyatis sabina*) (Piermarini, Verlander, Royaux, & Evans, 2002). Cette espèce vit à la fois en eau douce et en eau salée et possède au niveau de ces branchies des cellules riches en H^+ -ATPase du côté basolatéral. Ces cellules expriment aussi la pendrine du côté apical et présentent une certaine analogie avec les cellules β -intercalaires. L'étude montre qu'en eau douce, soit dans un environnement pauvre en sels, l'expression de la pendrine est multipliée par 5. Nous pensons donc que les cellules β -intercalaires ont hérité de ce même type de régulation et que la voie NDCBE/Pendrine est activée lorsque la concentration en NaCl est faible. Cette hypothèse peut être vérifiée grâce à un régime riche en eau et

pauvre en sels induisant une augmentation sensible du volume urinaire et une osmolalité urinaire basse. L'étude par microperfusion de CCDs permettrait de mettre en évidence l'activation de la voie électroneutre dans ces conditions et la mesure par western blot, sur des canaux collecteurs microdisséqués, de rendre compte des niveaux d'expression des échangeurs et de les comparer à ceux des autres transporteurs. De plus, le niveau de phosphorylation du récepteur MR dans les cellules intercalaires pourrait apporter de nouvelles informations sur la régulation de la voie par l'aldostérone sous ce régime particulier.

Les échangeurs NDCBE et pendrine constituent-ils des cibles intéressantes pour le traitement de l'hypertension ?

Nous observons que l'inactivation de NDCBE ou de la pendrine n'ont pas les mêmes conséquences sur la physiologie du rein et la pression artérielle.

Notre étude chez les souris *Ndcbe*^{-/-} et plus particulièrement l'hypotension observée chez ces souris apportent un nouveau regard sur l'importance de NDCBE dans le maintien de la pression artérielle. Même si nous pensons que l'hypotension est d'origine rénale, en raison de l'expression de l'échangeur dans l'aorte (Leviel et al., 2010), on ne peut pas omettre qu'il joue aussi un rôle potentiel dans la vasoconstriction du système vasculaire. Le faible nombre de souris double knock-out pour NDCBE et NCC ne nous a pas encore permis de mesurer leur pression artérielle. Néanmoins, Schultheis et al. ont observé une tendance à l'hypotension chez les souris *NCC*^{-/-} (Schultheis et al., 1998). Ainsi, nous nous attendons chez les souris double knock-out à une aggravation de l'hypotension qui corrélait avec la déshydratation vasculaire sévère constatée.

Nos tentatives d'immunolocalisation de l'échangeur dans le rein n'ayant pas abouti, la présence et le niveau d'expression de NDCBE dans les autres segments du néphron reste aujourd'hui à être montrée. Nous ne connaissons ainsi pas complètement les effets de la délétion totale de

NDCBE sur la physiologie du rein. Il serait ainsi intéressant d'étudier les activités de transport dans les autres segments suite à la délétion de NDCBE afin de savoir si elles sont affectées.

L'inactivation de la pendrine n'a pas les mêmes effets sur l'activité et l'expression des autres transporteurs par rapport à l'inactivation de NDCBE. Nous n'avons ainsi pas observé de modification de l'expression ou de l'activité du canal ENaC chez la souris *Ndcbe*^{-/-} comme cela a été constaté chez la souris knockout pour la pendrine (Kim et al., 2007). Les souris double knock-out pour NCC et la pendrine présentent un phénotype fort d'hypotension et de déplétion volémique (Soleimani et al., 2012) et le canal ENaC n'est pas suractivé chez souris *Pds*^{-/-} ; *Ncc*^{-/-} contrairement au souris *Ndcbe*^{-/-} ; *Ncc*^{-/-}. Soleimani et al. proposent qu'il existe un système ENaC/Pendrine où la pendrine agit de concert avec le canal ENaC pour la réabsorption de NaCl dans le canal collecteur cortical. L'inhibition spécifique de la pendrine par un nouvel inhibiteur conduirait à un blocage de l'activité du canal ENaC et apporterait une alternative intéressante au traitement de l'hypertension par rapport aux diurétiques actuels mais favoriserait aussi la rétention de potassium.

Finalement, le phénotype de souris double knockout pour la pendrine et NDCBE est difficile à prédire tant les effets de l'inactivation de chacun des deux échangeurs sur l'activité des autres transporteurs sont différents. La caractérisation de ces souris permettrait d'étudier les mécanismes compensatoires mis en place suite à la perte totale de transport de sodium et de chlore par la cellule β -intercalaire.

La voie paracrine peut-elle être aussi une cible pour le traitement de l'hypertension ?

La mise en évidence de la voie paracrine de régulation du transport de NaCl et d'eau montre que le transport dans le canal collecteur cortical est particulièrement complexe. Notre étude prouve que les cellules β -intercalaires peuvent agir sur l'activité de transport de sodium et d'eau

des cellules principales par l'intermédiaire de l'ATP et de la PGE_2 . Dans le canal collecteur, les mécanismes régulant la sécrétion dans la lumière de l'ATP et de la production de PGE_2 restent encore peu compris. Sipos et al. ont montré par microdissection de CCDs et un biosenseur sensible à l'ATP, que les souris déficientes en connexine 30 n'étaient plus capables de sécréter de l'ATP dans la lumière du tubule (Sipos et al., 2009). Les canaux formés par la connexine 30 étant une voie essentielle à la libération apicale d'ATP, l'inactivation de cette voie de sécrétion chez les modèles de souris $ATP6v1b1^{-/-}$ et $TgWnk4^{PHAI}$ par croisement avec des souris knock-out pour la connexine 30 permettrait de comprendre l'importance de l'action de la voie paracrine et son implication dans la mise en place des pathologies. Autrement, l'utilisation de suramine, afin d'inhiber le récepteur de l'ATP, dans la lumière de CCDs isolés et microperfusés de souris $TgWnk4^{PHAI}$ serait intéressante afin de confirmer que la sécrétion importante d'ATP chez ces souris est réellement responsable de la baisse d'activité d'ENaC.

BIBLIOGRAPHIE

- Adshead SAM. (1992) *Salt and Civilization*. Macmillan Academic and Professional Ltd: London
- Abriel, H., Loffing, J., Rebhun, J. F., Pratt, J. H., Schild, L., Horisberger, J. D., . . . Staub, O. (1999). Defective regulation of the epithelial Na⁺ channel by Nedd4 in Liddle's syndrome. *J Clin Invest*, 103(5), 667-673. doi: 10.1172/JCI5713
- Ackermann, D., Gresko, N., Carrel, M., Loffing-Cueni, D., Habermehl, D., Gomez-Sanchez, C., . . . Loffing, J. (2010). In vivo nuclear translocation of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in rat kidney: differential effect of corticosteroids along the distal tubule. *Am J Physiol Renal Physiol*, 299(6), F1473-1485. doi: 10.1152/ajprenal.00437.2010
- Ando, Y., & Asano, Y. (1995). Luminal prostaglandin E2 modulates sodium and water transport in rabbit cortical collecting ducts. *Am J Physiol*, 268(6 Pt 2), F1093-1101.
- Anselmo, A. N., Earnest, S., Chen, W., Juang, Y. C., Kim, S. C., Zhao, Y., & Cobb, M. H. (2006). WNK1 and OSR1 regulate the Na⁺, K⁺, 2Cl⁻ cotransporter in HeLa cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(29), 10883-10888. doi: 10.1073/pnas.0604607103
- Aronson, P. S., & Giebisch, G. (1997). Mechanisms of chloride transport in the proximal tubule. *Am J Physiol*, 273(2 Pt 2), F179-192.
- Arroyo, J. P., Lagnaz, D., Ronzaud, C., Vazquez, N., Ko, B. S., Moddes, L., . . . Staub, O. (2011). Nedd4-2 modulates renal Na⁺-Cl⁻ cotransporter via the aldosterone-SGK1-Nedd4-2 pathway. *J Am Soc Nephrol*, 22(9), 1707-1719. doi: 10.1681/ASN.2011020132
- Azroyan, A., Morla, L., Crambert, G., Laghmani, K., Ramakrishnan, S., Edwards, A., & Doucet, A. (2012). Regulation of pendrin by cAMP: possible involvement in beta-adrenergic-dependent NaCl retention. *Am J Physiol Renal Physiol*, 302(9), F1180-1187. doi: 10.1152/ajprenal.00403.2011
- Bailey, M. A., Paterson, J. M., Hadoke, P. W., Wrobel, N., Bellamy, C. O., Brownstein, D. G., . . . Mullins, J. J. (2008). A switch in the mechanism of hypertension in the syndrome of apparent mineralocorticoid excess. *J Am Soc Nephrol*, 19(1), 47-58. doi: 10.1681/ASN.2007040401
- Balavoine, A. S., Bataille, P., Vanhille, P., Azar, R., Noel, C., Asseman, P., . . . Vantyghem, M. C. (2011). Phenotype-genotype correlation and follow-up in adult patients with hypokalaemia of renal origin suggesting Gitelman syndrome. *Eur J Endocrinol*, 165(4), 665-673. doi: 10.1530/EJE-11-0224
- Bartter, F. C., Pronove, P., Gill, J. R., Jr., & Maccardie, R. C. (1962). Hyperplasia of the juxtaglomerular complex with hyperaldosteronism and hypokalemic alkalosis. A new syndrome. *Am J Med*, 33, 811-828.
- Bastani, B., Purcell, H., Hemken, P., Trigg, D., & Gluck, S. (1991). Expression and distribution of renal vacuolar proton-translocating adenosine triphosphatase in response to chronic acid and alkali

- loads in the rat. *J Clin Invest*, 88(1), 126-136. doi: 10.1172/JCI115268
- Better, O. S., Rubinstein, I., Winaver, J. M., & Knochel, J. P. (1997). Mannitol therapy revisited (1940-1997). *Kidney Int*, 52(4), 886-894.
- Biemesderfer, D., Pizzonia, J., Abu-Alfa, A., Exner, M., Reilly, R., Igarashi, P., & Aronson, P. S. (1993). NHE3: a Na⁺/H⁺ exchanger isoform of renal brush border. *Am J Physiol*, 265(5 Pt 2), F736-742.
- Birkenhager, R., Otto, E., Schurmann, M. J., Vollmer, M., Ruf, E. M., Maier-Lutz, I., . . . Hildebrandt, F. (2001). Mutation of BSND causes Bartter syndrome with sensorineural deafness and kidney failure. *Nat Genet*, 29(3), 310-314. doi: 10.1038/ng752
- Blackburn, H., & Prineas, R. (1983). Diet and hypertension: anthropology, epidemiology, and public health implications. *Prog Biochem Pharmacol*, 19, 31-79.
- Bockenbauer, D., Feather, S., Stanescu, H. C., Bandulik, S., Zdebik, A. A., Reichold, M., . . . Kleta, R. (2009). Epilepsy, ataxia, sensorineural deafness, tubulopathy, and KCNJ10 mutations. *N Engl J Med*, 360(19), 1960-1970. doi: 10.1056/NEJMoa0810276
- Boer, W. H., Koomans, H. A., & Dorhout Mees, E. J. (1989). Acute effects of thiazides, with and without carbonic anhydrase inhibiting activity, on lithium and free water clearance in man. *Clin Sci (Lond)*, 76(5), 539-545.
- Boyden, L. M., Choi, M., Choate, K. A., Nelson-Williams, C. J., Farhi, A., Toka, H. R., . . . Lifton, R. P. (2012). Mutations in kelch-like 3 and cullin 3 cause hypertension and electrolyte abnormalities. *Nature*, 482(7383), 98-102. doi: 10.1038/nature10814
- Breyer, M. D., & Breyer, R. M. (2000). Prostaglandin E receptors and the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*, 279(1), F12-23.
- Brickley, D. R., Mikosz, C. A., Hagan, C. R., & Conzen, S. D. (2002). Ubiquitin modification of serum and glucocorticoid-induced protein kinase-1 (SGK-1). *J Biol Chem*, 277(45), 43064-43070. doi: 10.1074/jbc.M207604200
- Brown, D., Zhu, X. L., & Sly, W. S. (1990). Localization of membrane-associated carbonic anhydrase type IV in kidney epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(19), 7457-7461.
- Bruce, L. J., Cope, D. L., Jones, G. K., Schofield, A. E., Burley, M., Povey, S., . . . Tanner, M. J. (1997). Familial distal renal tubular acidosis is associated with mutations in the red cell anion exchanger (Band 3, AE1) gene. *J Clin Invest*, 100(7), 1693-1707. doi: 10.1172/JCI119694
- Canessa, C. M., Horisberger, J. D., & Rossier, B. C. (1993). Epithelial sodium channel related to proteins involved in neurodegeneration. *Nature*, 361(6411), 467-470. doi: 10.1038/361467a0
- Canessa, C. M., Schild, L., Buell, G., Thorens, B., Gautschi, I., Horisberger, J. D., & Rossier, B. C. (1994). Amiloride-sensitive epithelial Na⁺ channel is made of three homologous subunits. *Nature*, 367(6462), 463-467. doi: 10.1038/367463a0

- Castaneda-Bueno, M., Cervantes-Perez, L. G., Vazquez, N., Uribe, N., Kantesaria, S., Morla, L., . . . Gamba, G. (2012). Activation of the renal Na⁺:Cl⁻ cotransporter by angiotensin II is a WNK4-dependent process. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(20), 7929-7934. doi: 10.1073/pnas.1200947109
- Chambrey, R., Kurth, I., Peti-Peterdi, J., Houillier, P., Purkerson, J. M., Leviel, F., . . . Eladari, D. (2013). Renal intercalated cells are rather energized by a proton than a sodium pump. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(19), 7928-7933. doi: 10.1073/pnas.1221496110
- Chang, S. S., Grunder, S., Hanukoglu, A., Rosler, A., Mathew, P. M., Hanukoglu, I., . . . Lifton, R. P. (1996). Mutations in subunits of the epithelial sodium channel cause salt wasting with hyperkalaemic acidosis, pseudohypoaldosteronism type 1. *Nat Genet*, 12(3), 248-253. doi: 10.1038/ng0396-248
- Chavez-Canales, M., Zhang, C., Soukaseum, C., Moreno, E., Pacheco-Alvarez, D., Vidal-Petiot, E., . . . Hadchouel, J. (2014). WNK-SPAK-NCC Cascade Revisited: WNK1 Stimulates the Activity of the Na-Cl Cotransporter via SPAK, an Effect Antagonized by WNK4. *Hypertension*. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.04036
- Cheek, D. B., & Perry, J. W. (1958). A salt wasting syndrome in infancy. *Arch Dis Child*, 33(169), 252-256.
- Chen, J., Zhao, M., He, W., Milne, G. L., Howard, J. R., Morrow, J., . . . Hao, C. M. (2008). Increased dietary NaCl induces renal medullary PGE2 production and natriuresis via the EP2 receptor. *Am J Physiol Renal Physiol*, 295(3), F818-825. doi: 10.1152/ajprenal.90253.2008
- Christensen, B. M., Perrier, R., Wang, Q., Zuber, A. M., Maillard, M., Mordasini, D., . . . Hummler, E. (2010). Sodium and potassium balance depends on alphaENaC expression in connecting tubule. *J Am Soc Nephrol*, 21(11), 1942-1951. doi: 10.1681/ASN.2009101077
- Damkier, H. H., Aalkjaer, C., & Praetorius, J. (2010). Na⁺-dependent HCO₃⁻ import by the slc4a10 gene product involves Cl⁻ export. *J Biol Chem*, 285(35), 26998-27007. doi: 10.1074/jbc.M110.108712
- de Jong, J. C., Willems, P. H., Mooren, F. J., van den Heuvel, L. P., Knoers, N. V., & Bindels, R. J. (2003). The structural unit of the thiazide-sensitive NaCl cotransporter is a homodimer. *J Biol Chem*, 278(27), 24302-24307. doi: 10.1074/jbc.M303101200
- de Seigneux, S., Malte, H., Dimke, H., Frokiaer, J., Nielsen, S., & Frische, S. (2007). Renal compensation to chronic hypoxic hypercapnia: downregulation of pendrin and adaptation of the proximal tubule. *Am J Physiol Renal Physiol*, 292(4), F1256-1266. doi: 10.1152/ajprenal.00220.2006
- Denton, D., Weisinger, R., Mundy, N. I., Wickings, E. J., Dixon, A., Moisson, P., . . . et al. (1995). The effect of increased salt intake on blood pressure of chimpanzees. *Nat Med*, 1(10), 1009-1016.
- DiGiovanni, S. R., Nielsen, S., Christensen, E. I., & Knepper, M. A. (1994). Regulation of collecting duct water channel expression by

- vasopressin in Brattleboro rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(19), 8984-8988.
- Eaton, S. B., & Konner, M. (1985). Paleolithic nutrition. A consideration of its nature and current implications. *N Engl J Med*, 312(5), 283-289. doi: 10.1056/NEJM198501313120505
- Ebihara, L. (2003). New roles for connexons. *News Physiol Sci*, 18, 100-103.
- Ecelbarger, C. A., Terris, J., Frindt, G., Echevarria, M., Marples, D., Nielsen, S., & Knepper, M. A. (1995). Aquaporin-3 water channel localization and regulation in rat kidney. *Am J Physiol*, 269(5 Pt 2), F663-672.
- Ellison, D. H., Velazquez, H., & Wright, F. S. (1987). Thiazide-sensitive sodium chloride cotransport in early distal tubule. *Am J Physiol*, 253(3 Pt 2), F546-554.
- Ergonul, Z., Frindt, G., & Palmer, L. G. (2006). Regulation of maturation and processing of ENaC subunits in the rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*, 291(3), F683-693. doi: 10.1152/ajprenal.00422.2005
- Estevez, R., Boettger, T., Stein, V., Birkenhager, R., Otto, E., Hildebrandt, F., & Jentsch, T. J. (2001). Barttin is a Cl⁻ channel beta-subunit crucial for renal Cl⁻ reabsorption and inner ear K⁺ secretion. *Nature*, 414(6863), 558-561. doi: 10.1038/35107099
- Evans, W. H., De Vuyst, E., & Leybaert, L. (2006). The gap junction cellular internet: connexin hemichannels enter the signalling limelight. *Biochem J*, 397(1), 1-14. doi: 10.1042/BJ20060175
- Fahlke, C., & Fischer, M. (2010). Physiology and pathophysiology of ClC-K/barttin channels. *Front Physiol*, 1, 155. doi: 10.3389/fphys.2010.00155
- Figueroa, C. D., MacIver, A. G., Mackenzie, J. C., & Bhoola, K. D. (1988). Localisation of immunoreactive kininogen and tissue kallikrein in the human nephron. *Histochemistry*, 89(5), 437-442.
- Finberg, K. E., Wagner, C. A., Bailey, M. A., Paunescu, T. G., Breton, S., Brown, D., . . . Lifton, R. P. (2005). The B1-subunit of the H⁺ ATPase is required for maximal urinary acidification. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(38), 13616-13621. doi: 10.1073/pnas.0506769102
- Fischer, M., Janssen, A. G., & Fahlke, C. (2010). Barttin activates ClC-K channel function by modulating gating. *J Am Soc Nephrol*, 21(8), 1281-1289. doi: 10.1681/ASN.2009121274
- Flores, D., Liu, Y., Liu, W., Satlin, L. M., & Rohatgi, R. (2012). Flow-induced prostaglandin E2 release regulates Na and K transport in the collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol*, 303(5), F632-638. doi: 10.1152/ajprenal.00169.2012
- Frindt, G., & Palmer, L. G. (1989). Low-conductance K channels in apical membrane of rat cortical collecting tubule. *Am J Physiol*, 256(1 Pt 2), F143-151.
- Frische, S., Kwon, T. H., Frokiaer, J., Madsen, K. M., & Nielsen, S. (2003). Regulated expression of pendrin in rat kidney in response to chronic NH₄Cl or NaHCO₃ loading. *Am J Physiol Renal Physiol*, 284(3), F584-593. doi: 10.1152/ajprenal.00254.2002

- Fushimi, K., Uchida, S., Hara, Y., Hirata, Y., Marumo, F., & Sasaki, S. (1993). Cloning and expression of apical membrane water channel of rat kidney collecting tubule. *Nature*, 361(6412), 549-552. doi: 10.1038/361549a0
- Fuson, A. L., Komlosi, P., Unlap, T. M., Bell, P. D., & Peti-Peterdi, J. (2003). Immunolocalization of a microsomal prostaglandin E synthase in rabbit kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*, 285(3), F558-564. doi: 10.1152/ajprenal.00433.2002
- Gamba, G., Miyanoshita, A., Lombardi, M., Lytton, J., Lee, W. S., Hediger, M. A., & Hebert, S. C. (1994). Molecular cloning, primary structure, and characterization of two members of the mammalian electroneutral sodium-(potassium)-chloride cotransporter family expressed in kidney. *J Biol Chem*, 269(26), 17713-17722.
- Garcia-Perez, A., & Smith, W. L. (1984). Apical-basolateral membrane asymmetry in canine cortical collecting tubule cells. Bradykinin, arginine vasopressin, prostaglandin E2 interrelationships. *J Clin Invest*, 74(1), 63-74. doi: 10.1172/JCI111419
- Garty, H. (1994). Molecular properties of epithelial, amiloride-blockable Na⁺ channels. *FASEB J*, 8(8), 522-528.
- Geller, D. S., Rodriguez-Soriano, J., Vallo Boado, A., Schifter, S., Bayer, M., Chang, S. S., & Lifton, R. P. (1998). Mutations in the mineralocorticoid receptor gene cause autosomal dominant pseudohypoaldosteronism type I. *Nat Genet*, 19(3), 279-281. doi: 10.1038/966
- Giebisch, G. (1998). Renal potassium transport: mechanisms and regulation. *Am J Physiol*, 274(5 Pt 2), F817-833.
- Gitelman, H. J., Graham, J. B., & Welt, L. G. (1966). A new familial disorder characterized by hypokalemia and hypomagnesemia. *Trans Assoc Am Physicians*, 79, 221-235.
- Gordon, R. D. (1986). Syndrome of hypertension and hyperkalemia with normal glomerular filtration rate. *Hypertension*, 8(2), 93-102.
- Graziani, G., Fedeli, C., Moroni, L., Cosmai, L., Badalamenti, S., & Ponticelli, C. (2010). Gitelman syndrome: pathophysiological and clinical aspects. *QJM*, 103(10), 741-748. doi: 10.1093/qjmed/hcq123
- Grichtchenko, II, Choi, I., Zhong, X., Bray-Ward, P., Russell, J. M., & Boron, W. F. (2001). Cloning, characterization, and chromosomal mapping of a human electroneutral Na(+)-driven Cl-HCO₃ exchanger. *J Biol Chem*, 276(11), 8358-8363. doi: 10.1074/jbc.C000716200
- Guan, Y., Zhang, Y., Breyer, R. M., Fowler, B., Davis, L., Hebert, R. L., & Breyer, M. D. (1998). Prostaglandin E2 inhibits renal collecting duct Na⁺ absorption by activating the EP1 receptor. *J Clin Invest*, 102(1), 194-201. doi: 10.1172/JCI2872
- Gueutin, V., Vallet, M., Jayat, M., Peti-Peterdi, J., Corniere, N., Leviel, F., . . . Chambrey, R. (2013). Renal beta-intercalated cells maintain body fluid and electrolyte balance. *J Clin Invest*, 123(10), 4219-4231. doi: 10.1172/JCI63492

- Guyton, A. C. (1989). Dominant role of the kidneys and accessory role of whole-body autoregulation in the pathogenesis of hypertension. *Am J Hypertens*, 2(7), 575-585.
- Guyton, A. C. (1991). Blood pressure control--special role of the kidneys and body fluids. *Science*, 252(5014), 1813-1816.
- Guyton, A. C., & Coleman, T. G. (1968). Regulation on interstitial fluid volume and pressure. *Ann N Y Acad Sci*, 150(3), 537-547.
- Hadchouel, J., Soukaseum, C., Busst, C., Zhou, X. O., Baudrie, V., Zurrer, T., . . . Jeunemaitre, X. (2010). Decreased ENaC expression compensates the increased NCC activity following inactivation of the kidney-specific isoform of WNK1 and prevents hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(42), 18109-18114. doi: 10.1073/pnas.1006128107
- Hanng, R., Tait, S. A., & Tait, J. F. (1970). In vitro effects of ACTH, angiotensins, serotonin and potassium on steroid output and conversion of corticosterone to aldosterone by isolated adrenal cells. *Endocrinology*, 87(6), 1147-1167. doi: 10.1210/endo-87-6-1147
- Hao, C. M., & Breyer, M. D. (2008). Physiological regulation of prostaglandins in the kidney. *Annu Rev Physiol*, 70, 357-377. doi: 10.1146/annurev.physiol.70.113006.100614
- Hebert, R. L., Jacobson, H. R., Fredin, D., & Breyer, M. D. (1993). Evidence that separate PGE2 receptors modulate water and sodium transport in rabbit cortical collecting duct. *Am J Physiol*, 265(5 Pt 2), F643-650.
- Hentschke, M., Hentschke, S., Borgmeyer, U., Hubner, C. A., & Kurth, I. (2009). The murine AE4 promoter predominantly drives type B intercalated cell specific transcription. *Histochem Cell Biol*, 132(4), 405-412. doi: 10.1007/s00418-009-0614-0
- Hiltunen, T. P., Hannila-Handelberg, T., Petajaniemi, N., Kantola, I., Tikkanen, I., Virtamo, J., . . . Kontula, K. (2002). Liddle's syndrome associated with a point mutation in the extracellular domain of the epithelial sodium channel gamma subunit. *J Hypertens*, 20(12), 2383-2390. doi: 10.1097/01.hjh.0000042881.24999.fc
- Hughey, R. P., Mueller, G. M., Bruns, J. B., Kinlough, C. L., Poland, P. A., Harkleroad, K. L., . . . Kleyman, T. R. (2003). Maturation of the epithelial Na⁺ channel involves proteolytic processing of the alpha- and gamma-subunits. *J Biol Chem*, 278(39), 37073-37082. doi: 10.1074/jbc.M307003200
- Intersalt. (1988). Intersalt: an international study of electrolyte excretion and blood pressure. Results for 24 hour urinary sodium and potassium excretion. Intersalt Cooperative Research Group. *BMJ*, 297(6644), 319-328.
- Ito, M., Inanobe, A., Horio, Y., Hibino, H., Isomoto, S., Ito, H., . . . Kurachi, Y. (1996). Immunolocalization of an inwardly rectifying K⁺ channel, K(AB)-2 (Kir4.1), in the basolateral membrane of renal distal tubular epithelia. *FEBS Lett*, 388(1), 11-15.
- Jacques, T., Picard, N., Miller, R. L., Riemyndy, K. A., Houillier, P., Sohet, F., . . . Eladari, D. (2013). Overexpression of pendrin in intercalated

- cells produces chloride-sensitive hypertension. *J Am Soc Nephrol*, 24(7), 1104-1113. doi: 10.1681/ASN.2012080787
- Jensen, B. L., Stubbe, J., Hansen, P. B., Andreasen, D., & Skott, O. (2001). Localization of prostaglandin E(2) EP2 and EP4 receptors in the rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*, 280(6), F1001-1009.
- Kahle, K. T., Wilson, F. H., Lalioti, M., Toka, H., Qin, H., & Lifton, R. P. (2004). WNK kinases: molecular regulators of integrated epithelial ion transport. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 13(5), 557-562.
- Karet, F. E., Finberg, K. E., Nelson, R. D., Nayir, A., Mocan, H., Sanjad, S. A., . . . Lifton, R. P. (1999). Mutations in the gene encoding B1 subunit of H⁺-ATPase cause renal tubular acidosis with sensorineural deafness. *Nat Genet*, 21(1), 84-90. doi: 10.1038/5022
- Kim, G. H., Masilamani, S., Turner, R., Mitchell, C., Wade, J. B., & Knepper, M. A. (1998). The thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter is an aldosterone-induced protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(24), 14552-14557.
- Kim, Y. H., Pech, V., Spencer, K. B., Beierwaltes, W. H., Everett, L. A., Green, E. D., . . . Wall, S. M. (2007). Reduced ENaC protein abundance contributes to the lower blood pressure observed in pendrin-null mice. *Am J Physiol Renal Physiol*, 293(4), F1314-1324. doi: 10.1152/ajprenal.00155.2007
- Kitamura, K., Suzuki, H., & Kuriyama, H. (1976). Prostaglandin action on the main pulmonary artery and portal vein of the rabbit. *Jpn J Physiol*, 26(6), 681-692.
- Lalioti, M. D., Zhang, J., Volkman, H. M., Kahle, K. T., Hoffmann, K. E., Toka, H. R., . . . Lifton, R. P. (2006). Wnk4 controls blood pressure and potassium homeostasis via regulation of mass and activity of the distal convoluted tubule. *Nat Genet*, 38(10), 1124-1132. doi: 10.1038/ng1877
- Leviel, F., Hubner, C. A., Houillier, P., Morla, L., El Moghrabi, S., Brideau, G., . . . Eladari, D. (2010). The Na⁺-dependent chloride-bicarbonate exchanger SLC4A8 mediates an electroneutral Na⁺ reabsorption process in the renal cortical collecting ducts of mice. *J Clin Invest*, 120(5), 1627-1635. doi: 10.1172/JCI40145
- Lipovich, L., Lynch, E. D., Lee, M. K., & King, M. C. (2001). A novel sodium bicarbonate cotransporter-like gene in an ancient duplicated region: SLC4A9 at 5q31. *Genome Biol*, 2(4), RESEARCH0011.
- Loffing, J., Vallon, V., Loffing-Cueni, D., Aregger, F., Richter, K., Pietri, L., . . . Kaissling, B. (2004). Altered renal distal tubule structure and renal Na(+) and Ca(2+) handling in a mouse model for Gitelman's syndrome. *J Am Soc Nephrol*, 15(9), 2276-2288. doi: 10.1097/01.ASN.0000138234.18569.63
- Louis-Dit-Picard, H., Barc, J., Trujillano, D., Miserey-Lenkei, S., Bouatia-Naji, N., Pylypenko, O., . . . Jeunemaitre, X. (2012). KLHL3 mutations cause familial hyperkalemic hypertension by impairing ion transport in the distal nephron. *Nat Genet*, 44(4), 456-460, S451-453. doi: 10.1038/ng.2218

- Ludwig, M., Bidlingmaier, F., & Reissinger, A. (2004). Pseudohypoaldosteronism type 1 and the genes encoding prostasin, alpha-spectrin, and Nedd4. *Int J Mol Med*, 14(6), 1101-1104.
- Mahnensmith, R. L., & Aronson, P. S. (1985). The plasma membrane sodium-hydrogen exchanger and its role in physiological and pathophysiological processes. *Circ Res*, 56(6), 773-788.
- Masilamani, S., Kim, G. H., Mitchell, C., Wade, J. B., & Knepper, M. A. (1999). Aldosterone-mediated regulation of ENaC alpha, beta, and gamma subunit proteins in rat kidney. *J Clin Invest*, 104(7), R19-23. doi: 10.1172/JCI7840
- McCormick, J. A., Mutig, K., Nelson, J. H., Saritas, T., Hoorn, E. J., Yang, C. L., . . . Ellison, D. H. (2011). A SPAK isoform switch modulates renal salt transport and blood pressure. *Cell Metab*, 14(3), 352-364. doi: 10.1016/j.cmet.2011.07.009
- McCulloch, F., Chambrey, R., Eladari, D., & Peti-Peterdi, J. (2005). Localization of connexin 30 in the luminal membrane of cells in the distal nephron. *Am J Physiol Renal Physiol*, 289(6), F1304-1312. doi: 10.1152/ajprenal.00203.2005
- McNicholas, C. M., & Canessa, C. M. (1997). Diversity of channels generated by different combinations of epithelial sodium channel subunits. *J Gen Physiol*, 109(6), 681-692.
- Mehta, R. L., Pascual, M. T., Soroko, S., Chertow, G. M., & Group, Picard Study. (2002). Diuretics, mortality, and nonrecovery of renal function in acute renal failure. *JAMA*, 288(20), 2547-2553.
- Meneton, P., Bloch-Faure, M., Hagege, A. A., Ruetten, H., Huang, W., Bergaya, S., . . . Alhenc-Gelas, F. (2001). Cardiovascular abnormalities with normal blood pressure in tissue kallikrein-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(5), 2634-2639. doi: 10.1073/pnas.051619598
- Morgan, P. E., Supuran, C. T., & Casey, J. R. (2004). Carbonic anhydrase inhibitors that directly inhibit anion transport by the human Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger, AE1. *Mol Membr Biol*, 21(6), 423-433. doi: 10.1080/09687860400014872
- Moriguchi, T., Urushiyama, S., Hisamoto, N., Iemura, S., Uchida, S., Natsume, T., . . . Shibuya, H. (2005). WNK1 regulates phosphorylation of cation-chloride-coupled cotransporters via the STE20-related kinases, SPAK and OSR1. *J Biol Chem*, 280(52), 42685-42693. doi: 10.1074/jbc.M510042200
- Murakami, M., Nakashima, K., Kamei, D., Masuda, S., Ishikawa, Y., Ishii, T., . . . Kudo, I. (2003). Cellular prostaglandin E₂ production by membrane-bound prostaglandin E synthase-2 via both cyclooxygenases-1 and -2. *J Biol Chem*, 278(39), 37937-37947. doi: 10.1074/jbc.M305108200
- Murakami, M., Naraba, H., Tanioka, T., Semmyo, N., Nakatani, Y., Kojima, F., . . . Kudo, I. (2000). Regulation of prostaglandin E₂ biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E₂ synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2. *J Biol Chem*, 275(42), 32783-32792. doi: 10.1074/jbc.M003505200

- Na, T., Wu, G., & Peng, J. B. (2012). Disease-causing mutations in the acidic motif of WNK4 impair the sensitivity of WNK4 kinase to calcium ions. *Biochem Biophys Res Commun*, 419(2), 293-298. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.02.013
- Narikiyo, T., Kitamura, K., Adachi, M., Miyoshi, T., Iwashita, K., Shiraishi, N., . . . Tomita, K. (2002). Regulation of prostasin by aldosterone in the kidney. *J Clin Invest*, 109(3), 401-408. doi: 10.1172/JCI13229
- Nielsen, S., Chou, C. L., Marples, D., Christensen, E. I., Kishore, B. K., & Knepper, M. A. (1995). Vasopressin increases water permeability of kidney collecting duct by inducing translocation of aquaporin-CD water channels to plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(4), 1013-1017.
- Nielsen, S., Smith, B. L., Christensen, E. I., Knepper, M. A., & Agre, P. (1993). CHIP28 water channels are localized in constitutively water-permeable segments of the nephron. *J Cell Biol*, 120(2), 371-383.
- Nijenhuis, T., Hoenderop, J. G., Loffing, J., van der Kemp, A. W., van Os, C. H., & Bindels, R. J. (2003). Thiazide-induced hypocalciuria is accompanied by a decreased expression of Ca²⁺ transport proteins in kidney. *Kidney Int*, 64(2), 555-564. doi: 10.1046/j.1523-1755.2003.00128.x
- Ohno, M., Uchida, K., Ohashi, T., Nitta, K., Ohta, A., Chiga, M., . . . Uchida, S. (2011). Immunolocalization of WNK4 in mouse kidney. *Histochem Cell Biol*, 136(1), 25-35. doi: 10.1007/s00418-011-0827-x
- Ohta, A., Schumacher, F. R., Mehellou, Y., Johnson, C., Knebel, A., Macartney, T. J., . . . Kurz, T. (2013). The CUL3-KLHL3 E3 ligase complex mutated in Gordon's hypertension syndrome interacts with and ubiquitylates WNK isoforms: disease-causing mutations in KLHL3 and WNK4 disrupt interaction. *Biochem J*, 451(1), 111-122. doi: 10.1042/BJ20121903
- Pacheco-Alvarez, D., Cristobal, P. S., Meade, P., Moreno, E., Vazquez, N., Munoz, E., . . . Gamba, G. (2006). The Na⁺:Cl⁻ cotransporter is activated and phosphorylated at the amino-terminal domain upon intracellular chloride depletion. *J Biol Chem*, 281(39), 28755-28763. doi: 10.1074/jbc.M603773200
- Palmer, L. G., & Frindt, G. (1987). Effects of cell Ca and pH on Na channels from rat cortical collecting tubule. *Am J Physiol*, 253(2 Pt 2), F333-339.
- Parker, M. D., Musa-Aziz, R., Rojas, J. D., Choi, I., Daly, C. M., & Boron, W. F. (2008). Characterization of human SLC4A10 as an electroneutral Na/HCO₃ cotransporter (NBCn2) with Cl⁻ self-exchange activity. *J Biol Chem*, 283(19), 12777-12788. doi: 10.1074/jbc.M707829200
- Patel, A. B., Chao, J., & Palmer, L. G. (2012). Tissue kallikrein activation of the epithelial Na channel. *Am J Physiol Renal Physiol*, 303(4), F540-550. doi: 10.1152/ajprenal.00133.2012
- Pech, V., Pham, T. D., Hong, S., Weinstein, A. M., Spencer, K. B., Duke, B. J., . . . Wall, S. M. (2010). Pendrin modulates ENaC function by

- changing luminal HCO₃. *J Am Soc Nephrol*, 21(11), 1928-1941. doi: 10.1681/ASN.2009121257
- Pech, V., Zheng, W., Pham, T. D., Verlander, J. W., & Wall, S. M. (2008). Angiotensin II activates H⁺-ATPase in type A intercalated cells. *J Am Soc Nephrol*, 19(1), 84-91. doi: 10.1681/ASN.2007030277
- Pesce, L., Bizhanova, A., Caraballo, J. C., Westphal, W., Butti, M. L., Comellas, A., & Kopp, P. (2012). TSH regulates pendrin membrane abundance and enhances iodide efflux in thyroid cells. *Endocrinology*, 153(1), 512-521. doi: 10.1210/en.2011-1548
- Piala, A. T., Moon, T. M., Akella, R., He, H., Cobb, M. H., & Goldsmith, E. J. (2014). Chloride sensing by WNK1 involves inhibition of autophosphorylation. *Sci Signal*, 7(324), ra41. doi: 10.1126/scisignal.2005050
- Picard, N., Eladari, D., El Moghrabi, S., Planes, C., Bourgeois, S., Houillier, P., . . . Chambrey, R. (2008). Defective ENaC processing and function in tissue kallikrein-deficient mice. *J Biol Chem*, 283(8), 4602-4611. doi: 10.1074/jbc.M705664200
- Piermarini, P. M., Verlander, J. W., Royaux, I. E., & Evans, D. H. (2002). Pendrin immunoreactivity in the gill epithelium of a euryhaline elasmobranch. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 283(4), R983-992. doi: 10.1152/ajpregu.00178.2002
- Pintard, L., Willems, A., & Peter, M. (2004). Cullin-based ubiquitin ligases: Cul3-BTB complexes join the family. *EMBO J*, 23(8), 1681-1687. doi: 10.1038/sj.emboj.7600186
- Pochynyuk, O., Bugaj, V., Rieg, T., Insel, P. A., Mironova, E., Vallon, V., & Stockand, J. D. (2008). Paracrine regulation of the epithelial Na⁺ channel in the mammalian collecting duct by purinergic P2Y₂ receptor tone. *J Biol Chem*, 283(52), 36599-36607. doi: 10.1074/jbc.M807129200
- Pochynyuk, O., Rieg, T., Bugaj, V., Schroth, J., Fridman, A., Boss, G. R., . . . Vallon, V. (2010). Dietary Na⁺ inhibits the open probability of the epithelial sodium channel in the kidney by enhancing apical P2Y₂-receptor tone. *FASEB J*, 24(6), 2056-2065. doi: 10.1096/fj.09-151506
- Pujo, L., Fagart, J., Gary, F., Papadimitriou, D. T., Claes, A., Jeunemaitre, X., & Zennaro, M. C. (2007). Mineralocorticoid receptor mutations are the principal cause of renal type 1 pseudohypoaldosteronism. *Hum Mutat*, 28(1), 33-40. doi: 10.1002/humu.20371
- Purkerson, J. M., & Schwartz, G. J. (2007). The role of carbonic anhydrases in renal physiology. *Kidney Int*, 71(2), 103-115. doi: 10.1038/sj.ki.5002020
- Quamme, G. A. (1981). Effect of furosemide on calcium and magnesium transport in the rat nephron. *Am J Physiol*, 241(4), F340-347.
- Quamme, G. A. (1997). Renal magnesium handling: new insights in understanding old problems. *Kidney Int*, 52(5), 1180-1195.
- Quentin, F., Chambrey, R., Trinh-Trang-Tan, M. M., Fysekidis, M., Cambillau, M., Paillard, M., . . . Eladari, D. (2004). The Cl⁻/HCO₃⁻-exchanger pendrin in the rat kidney is regulated in response to

- chronic alterations in chloride balance. *Am J Physiol Renal Physiol*, 287(6), F1179-1188. doi: 10.1152/ajprenal.00211.2004
- Rafiqi, F. H., Zuber, A. M., Glover, M., Richardson, C., Fleming, S., Jovanovic, S., . . . Alessi, D. R. (2010). Role of the WNK-activated SPAK kinase in regulating blood pressure. *EMBO Mol Med*, 2(2), 63-75. doi: 10.1002/emmm.200900058
- Resnick, L. M., Oparil, S., Chait, A., Haynes, R. B., Kris-Etherton, P., Stern, J. S., . . . McCarron, D. A. (2000). Factors affecting blood pressure responses to diet: the Vanguard study. *Am J Hypertens*, 13(9), 956-965.
- Richardson, C., & Alessi, D. R. (2008). The regulation of salt transport and blood pressure by the WNK-SPAK/OSR1 signalling pathway. *J Cell Sci*, 121(Pt 20), 3293-3304. doi: 10.1242/jcs.029223
- Rieg, T., Bunday, R. A., Chen, Y., Deschenes, G., Junger, W., Insel, P. A., & Vallon, V. (2007). Mice lacking P2Y2 receptors have salt-resistant hypertension and facilitated renal Na⁺ and water reabsorption. *FASEB J*, 21(13), 3717-3726. doi: 10.1096/fj.07-8807com
- Ring, A. M., Cheng, S. X., Leng, Q., Kahle, K. T., Rinehart, J., Lalioti, M. D., . . . Lifton, R. P. (2007). WNK4 regulates activity of the epithelial Na⁺ channel in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(10), 4020-4024. doi: 10.1073/pnas.0611727104
- Romero, M. F., Fulton, C. M., & Boron, W. F. (2004). The SLC4 family of HCO₃⁻ transporters. *Pflugers Arch*, 447(5), 495-509. doi: 10.1007/s00424-003-1180-2
- Ronzaud, C., Loffing-Cueni, D., Hausel, P., Debonneville, A., Malsure, S. R., Fowler-Jaeger, N., . . . Staub, O. (2013). Renal tubular NEDD4-2 deficiency causes NCC-mediated salt-dependent hypertension. *J Clin Invest*, 123(2), 657-665. doi: 10.1172/JCI61110
- Rossier, B. C. (2003). The epithelial sodium channel (ENaC): new insights into ENaC gating. *Pflugers Arch*, 446(3), 314-316. doi: 10.1007/s00424-003-1056-5
- Royaux, I. E., Wall, S. M., Karniski, L. P., Everett, L. A., Suzuki, K., Knepper, M. A., & Green, E. D. (2001). Pendrin, encoded by the Pendred syndrome gene, resides in the apical region of renal intercalated cells and mediates bicarbonate secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(7), 4221-4226. doi: 10.1073/pnas.071516798
- Rozansky, D. J., Cornwall, T., Subramanya, A. R., Rogers, S., Yang, Y. F., David, L. L., . . . Ellison, D. H. (2009). Aldosterone mediates activation of the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter through an SGK1 and WNK4 signaling pathway. *J Clin Invest*, 119(9), 2601-2612. doi: 10.1172/JCI38323
- Sacks, F. M., Svetkey, L. P., Vollmer, W. M., Appel, L. J., Bray, G. A., Harsha, D., . . . Group, D. ASH-Sodium Collaborative Research. (2001). Effects on blood pressure of reduced dietary sodium and the Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) diet. DASH-Sodium Collaborative Research Group. *N Engl J Med*, 344(1), 3-10. doi: 10.1056/NEJM200101043440101

- Sakairi, Y., Jacobson, H. R., Noland, T. D., & Breyer, M. D. (1995). Luminal prostaglandin E receptors regulate salt and water transport in rabbit cortical collecting duct. *Am J Physiol*, 269(2 Pt 2), F257-265.
- San-Cristobal, P., Pacheco-Alvarez, D., Richardson, C., Ring, A. M., Vazquez, N., Rafiqi, F. H., . . . Gamba, G. (2009). Angiotensin II signaling increases activity of the renal Na-Cl cotransporter through a WNK4-SPAK-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(11), 4384-4389. doi: 10.1073/pnas.0813238106
- Sandberg, M. B., Riquier, A. D., Pihakaski-Maunsbach, K., McDonough, A. A., & Maunsbach, A. B. (2007). ANG II provokes acute trafficking of distal tubule Na⁺-Cl⁻ cotransporter to apical membrane. *Am J Physiol Renal Physiol*, 293(3), F662-669. doi: 10.1152/ajprenal.00064.2007
- Sansom, S. C., Weinman, E. J., & O'Neil, R. G. (1984). Microelectrode assessment of chloride-conductive properties of cortical collecting duct. *Am J Physiol*, 247(2 Pt 2), F291-302.
- Schaffer, J.A., Hawk, C.T. (1992). Regulation of Na⁺ channels in the cortical collecting duct by AVP and mineralocorticoids. *Kidney Int.*, 41(2):255-68.
- Scholl, U. I., Choi, M., Liu, T., Ramaekers, V. T., Hausler, M. G., Grimmer, J., . . . Lifton, R. P. (2009). Seizures, sensorineural deafness, ataxia, mental retardation, and electrolyte imbalance (SeSAME syndrome) caused by mutations in KCNJ10. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(14), 5842-5847. doi: 10.1073/pnas.0901749106
- Schultheis, P. J., Lorenz, J. N., Meneton, P., Nieman, M. L., Riddle, T. M., Flagella, M., . . . Shull, G. E. (1998). Phenotype resembling Gitelman's syndrome in mice lacking the apical Na⁺-Cl⁻ cotransporter of the distal convoluted tubule. *J Biol Chem*, 273(44), 29150-29155.
- Schwartz, G. J. (2002). Physiology and molecular biology of renal carbonic anhydrase. *J Nephrol*, 15 Suppl 5, S61-74.
- Sebastian, A., McSherry, E., & Morris, R. C., Jr. (1971). Renal potassium wasting in renal tubular acidosis (RTA): its occurrence in types 1 and 2 RTA despite sustained correction of systemic acidosis. *J Clin Invest*, 50(3), 667-678. doi: 10.1172/JCI106537
- Sebastian, A., McSherry, E., & Morris, R. C., Jr. (1976). Impaired renal conservation of sodium and chloride during sustained correction of systemic acidosis in patients with type 1, classic renal tubular acidosis. *J Clin Invest*, 58(2), 454-469. doi: 10.1172/JCI108490
- Shibata, S., Rinehart, J., Zhang, J., Moeckel, G., Castaneda-Bueno, M., Stiegler, A. L., . . . Lifton, R. P. (2013). Mineralocorticoid receptor phosphorylation regulates ligand binding and renal response to volume depletion and hyperkalemia. *Cell Metab*, 18(5), 660-671. doi: 10.1016/j.cmet.2013.10.005
- Shibata, S., Zhang, J., Puthumana, J., Stone, K. L., & Lifton, R. P. (2013). Kelch-like 3 and Cullin 3 regulate electrolyte homeostasis via

- ubiquitination and degradation of WNK4. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(19), 7838-7843. doi: 10.1073/pnas.1304592110
- Shimkets, R. A., Warnock, D. G., Bositis, C. M., Nelson-Williams, C., Hansson, J. H., Schambelan, M., . . . et al. (1994). Liddle's syndrome: heritable human hypertension caused by mutations in the beta subunit of the epithelial sodium channel. *Cell*, 79(3), 407-414.
- Simon, D. B., Bindra, R. S., Mansfield, T. A., Nelson-Williams, C., Mendonca, E., Stone, R., . . . Lifton, R. P. (1997). Mutations in the chloride channel gene, *CLCNKB*, cause Bartter's syndrome type III. *Nat Genet*, 17(2), 171-178. doi: 10.1038/ng1097-171
- Simon, D. B., Karet, F. E., Hamdan, J. M., DiPietro, A., Sanjad, S. A., & Lifton, R. P. (1996). Bartter's syndrome, hypokalaemic alkalosis with hypercalciuria, is caused by mutations in the Na-K-2Cl cotransporter NKCC2. *Nat Genet*, 13(2), 183-188. doi: 10.1038/ng0696-183
- Simon, D. B., Karet, F. E., Rodriguez-Soriano, J., Hamdan, J. H., DiPietro, A., Trachtman, H., . . . Lifton, R. P. (1996). Genetic heterogeneity of Bartter's syndrome revealed by mutations in the K⁺ channel, ROMK. *Nat Genet*, 14(2), 152-156. doi: 10.1038/ng1096-152
- Simon, D. B., Nelson-Williams, C., Bia, M. J., Ellison, D., Karet, F. E., Molina, A. M., . . . Lifton, R. P. (1996). Gitelman's variant of Bartter's syndrome, inherited hypokalaemic alkalosis, is caused by mutations in the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter. *Nat Genet*, 12(1), 24-30. doi: 10.1038/ng0196-24
- Sinning, A., Liebmann, L., Kougioumtzes, A., Westermann, M., Bruehl, C., & Hubner, C. A. (2011). Synaptic glutamate release is modulated by the Na⁺-driven Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger Slc4a8. *J Neurosci*, 31(20), 7300-7311. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0269-11.2011
- Sipos, A., Vargas, S. L., Toma, I., Hanner, F., Willecke, K., & Peti-Peterdi, J. (2009). Connexin 30 deficiency impairs renal tubular ATP release and pressure natriuresis. *J Am Soc Nephrol*, 20(8), 1724-1732. doi: 10.1681/ASN.2008101099
- Smith, A. N., Skaug, J., Choate, K. A., Nayir, A., Bakkaloglu, A., Ozen, S., . . . Karet, F. E. (2000). Mutations in ATP6N1B, encoding a new kidney vacuolar proton pump 116-kD subunit, cause recessive distal renal tubular acidosis with preserved hearing. *Nat Genet*, 26(1), 71-75. doi: 10.1038/79208
- Soleimani, M., Barone, S., Xu, J., Shull, G. E., Siddiqui, F., Zahedi, K., & Amlal, H. (2012). Double knockout of pendrin and Na-Cl cotransporter (NCC) causes severe salt wasting, volume depletion, and renal failure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(33), 13368-13373. doi: 10.1073/pnas.1202671109
- Subramanya, A. R., & Ellison, D. H. (2010). Sorting out lysosomal trafficking of the thiazide-sensitive Na-Cl Co-transporter. *J Am Soc Nephrol*, 21(1), 7-9. doi: 10.1681/ASN.2009111138
- Subramanya, A. R., Yang, C. L., Zhu, X., & Ellison, D. H. (2006). Dominant-negative regulation of WNK1 by its kidney-specific kinase-

- defective isoform. *Am J Physiol Renal Physiol*, 290(3), F619-624. doi: 10.1152/ajprenal.00280.2005
- Susa, K., Sohara, E., Rai, T., Zeniya, M., Mori, Y., Mori, T., . . . Uchida, S. (2014). Impaired degradation of WNK1 and WNK4 kinases causes PHAII in mutant KLHL3 knock-in mice. *Hum Mol Genet*. doi: 10.1093/hmg/ddu217
- Takahashi, D., Mori, T., Nomura, N., Khan, M. Z., Araki, Y., Zeniya, M., . . . Uchida, S. (2014). WNK4 is the major WNK positively regulating NCC in the mouse kidney. *Biosci Rep*, 34(3). doi: 10.1042/BSR20140047
- Teng-umnuay, P., Verlander, J. W., Yuan, W., Tisher, C. C., & Madsen, K. M. (1996). Identification of distinct subpopulations of intercalated cells in the mouse collecting duct. *J Am Soc Nephrol*, 7(2), 260-274.
- Terada, Y., & Knepper, M. A. (1990). Thiazide-sensitive NaCl absorption in rat cortical collecting duct. *Am J Physiol*, 259(3 Pt 2), F519-528.
- Terris, J., Ecelbarger, C. A., Marples, D., Knepper, M. A., & Nielsen, S. (1995). Distribution of aquaporin-4 water channel expression within rat kidney. *Am J Physiol*, 269(6 Pt 2), F775-785.
- Tomita, K., Pisano, J. J., Burg, M. B., & Knepper, M. A. (1986). Effects of vasopressin and bradykinin on anion transport by the rat cortical collecting duct. Evidence for an electroneutral sodium chloride transport pathway. *J Clin Invest*, 77(1), 136-141. doi: 10.1172/JCI112268
- Tomita, K., Pisano, J. J., & Knepper, M. A. (1985). Control of sodium and potassium transport in the cortical collecting duct of the rat. Effects of bradykinin, vasopressin, and deoxycorticosterone. *J Clin Invest*, 76(1), 132-136. doi: 10.1172/JCI111935
- Tuomilehto, J., Jousilahti, P., Rastenyte, D., Moltchanov, V., Tanskanen, A., Pietinen, P., & Nissinen, A. (2001). Urinary sodium excretion and cardiovascular mortality in Finland: a prospective study. *Lancet*, 357(9259), 848-851. doi: 10.1016/S0140-6736(00)04199-4
- Vallet, M., Picard, N., Loffing-Cueni, D., Fysekidis, M., Bloch-Faure, M., Deschenes, G., . . . Eladari, D. (2006). Pendrin regulation in mouse kidney primarily is chloride-dependent. *J Am Soc Nephrol*, 17(8), 2153-2163. doi: 10.1681/ASN.2005101054
- Vallet, V., Chraïbi, A., Gaeggeler, H. P., Horisberger, J. D., & Rossier, B. C. (1997). An epithelial serine protease activates the amiloride-sensitive sodium channel. *Nature*, 389(6651), 607-610. doi: 10.1038/39329
- van der Lubbe, N., Lim, C. H., Meima, M. E., van Veghel, R., Rosenbaek, L. L., Mutig, K., . . . Hoorn, E. J. (2012). Aldosterone does not require angiotensin II to activate NCC through a WNK4-SPAK-dependent pathway. *Pflugers Arch*, 463(6), 853-863. doi: 10.1007/s00424-012-1104-0
- Velazquez, H., Bartiss, A., Bernstein, P., & Ellison, D. H. (1996). Adrenal steroids stimulate thiazide-sensitive NaCl transport by rat renal distal tubules. *Am J Physiol*, 270(1 Pt 2), F211-219.

- Velazquez, H., & Wright, F. S. (1986). Effects of diuretic drugs on Na, Cl, and K transport by rat renal distal tubule. *Am J Physiol*, 250(6 Pt 2), F1013-1023.
- Verlander, J. W., Hassell, K. A., Royaux, I. E., Glapion, D. M., Wang, M. E., Everett, L. A., . . . Wall, S. M. (2003). Deoxycorticosterone upregulates PDS (Slc26a4) in mouse kidney: role of pendrin in mineralocorticoid-induced hypertension. *Hypertension*, 42(3), 356-362. doi: 10.1161/01.HYP.0000088321.67254.B7
- Vidal-Petiot, E., Cheval, L., Faugeron, J., Malard, T., Doucet, A., Jeunemaitre, X., & Hadchouel, J. (2012). A new methodology for quantification of alternatively spliced exons reveals a highly tissue-specific expression pattern of WNK1 isoforms. *PLoS One*, 7(5), e37751. doi: 10.1371/journal.pone.0037751
- Vidal-Petiot, E., Elvira-Matelot, E., Mutig, K., Soukaseum, C., Baudrie, V., Wu, S., . . . Hadchouel, J. (2013). WNK1-related Familial Hyperkalemic Hypertension results from an increased expression of L-WNK1 specifically in the distal nephron. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(35), 14366-14371. doi: 10.1073/pnas.1304230110
- Virkki, L. V., Choi, I., Davis, B. A., & Boron, W. F. (2003). Cloning of a Na⁺-driven Cl/HCO₃ exchanger from squid giant fiber lobe. *Am J Physiol Cell Physiol*, 285(4), C771-780. doi: 10.1152/ajpcell.00439.2002
- Wagner, C. A., Finberg, K. E., Stehberger, P. A., Lifton, R. P., Giebisch, G. H., Aronson, P. S., & Geibel, J. P. (2002). Regulation of the expression of the Cl-/anion exchanger pendrin in mouse kidney by acid-base status. *Kidney Int*, 62(6), 2109-2117. doi: 10.1046/j.1523-1755.2002.00671.x
- Wakabayashi, M., Mori, T., Isobe, K., Sohara, E., Susa, K., Araki, Y., . . . Uchida, S. (2013). Impaired KLHL3-mediated ubiquitination of WNK4 causes human hypertension. *Cell Rep*, 3(3), 858-868. doi: 10.1016/j.celrep.2013.02.024
- Wall, S. M., Kim, Y. H., Stanley, L., Glapion, D. M., Everett, L. A., Green, E. D., & Verlander, J. W. (2004). NaCl restriction upregulates renal Slc26a4 through subcellular redistribution: role in Cl- conservation. *Hypertension*, 44(6), 982-987. doi: 10.1161/01.HYP.0000145863.96091.89
- Wang, W. H., White, S., Geibel, J., & Giebisch, G. (1990). A potassium channel in the apical membrane of rabbit thick ascending limb of Henle's loop. *Am J Physiol*, 258(2 Pt 2), F244-253.
- Warnock, D. G. (2001). Liddle syndrome: genetics and mechanisms of Na⁺ channel defects. *Am J Med Sci*, 322(6), 302-307.
- Welch, B. D., Carlson, N. G., Shi, H., Myatt, L., & Kishore, B. K. (2003). P2Y2 receptor-stimulated release of prostaglandin E2 by rat inner medullary collecting duct preparations. *Am J Physiol Renal Physiol*, 285(4), F711-721. doi: 10.1152/ajprenal.00096.2003
- Welling, P. A., Caplan, M., Sutters, M., & Giebisch, G. (1993). Aldosterone-mediated Na/K-ATPase expression is alpha 1 isoform

- specific in the renal cortical collecting duct. *J Biol Chem*, 268(31), 23469-23476.
- Wildman, S. S., Boone, M., Peppiatt-Wildman, C. M., Contreras-Sanz, A., King, B. F., Shirley, D. G., . . . Unwin, R. J. (2009). Nucleotides downregulate aquaporin 2 via activation of apical P2 receptors. *J Am Soc Nephrol*, 20(7), 1480-1490. doi: 10.1681/ASN.2008070686
- Wilson, F. H., Disse-Nicodeme, S., Choate, K. A., Ishikawa, K., Nelson-Williams, C., Desitter, I., . . . Lifton, R. P. (2001). Human hypertension caused by mutations in WNK kinases. *Science*, 293(5532), 1107-1112. doi: 10.1126/science.1062844
- Wilson, F. H., Kahle, K. T., Sabath, E., Lalioti, M. D., Rapson, A. K., Hoover, R. S., . . . Lifton, R. P. (2003). Molecular pathogenesis of inherited hypertension with hyperkalemia: the Na-Cl cotransporter is inhibited by wild-type but not mutant WNK4. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(2), 680-684. doi: 10.1073/pnas.242735399
- Wu, G., & Peng, J. B. (2013). Disease-causing mutations in KLHL3 impair its effect on WNK4 degradation. *FEBS Lett*, 587(12), 1717-1722. doi: 10.1016/j.febslet.2013.04.032
- Xie, J., Wu, T., Xu, K., Huang, I. K., Cleaver, O., & Huang, C. L. (2009). Endothelial-specific expression of WNK1 kinase is essential for angiogenesis and heart development in mice. *Am J Pathol*, 175(3), 1315-1327. doi: 10.2353/ajpath.2009.090094
- Xu, B., English, J. M., Wilsbacher, J. L., Stippec, S., Goldsmith, E. J., & Cobb, M. H. (2000). WNK1, a novel mammalian serine/threonine protein kinase lacking the catalytic lysine in subdomain II. *J Biol Chem*, 275(22), 16795-16801.
- Xu, Q., Modrek, B., & Lee, C. (2002). Genome-wide detection of tissue-specific alternative splicing in the human transcriptome. *Nucleic Acids Res*, 30(17), 3754-3766.
- Yang, C. L., Angell, J., Mitchell, R., & Ellison, D. H. (2003). WNK kinases regulate thiazide-sensitive Na-Cl cotransport. *J Clin Invest*, 111(7), 1039-1045. doi: 10.1172/JCI17443
- Yang, G., Chen, L., Zhang, Y., Zhang, X., Wu, J., Li, S., . . . Guan, Y. (2006). Expression of mouse membrane-associated prostaglandin E2 synthase-2 (mPGES-2) along the urogenital tract. *Biochim Biophys Acta*, 1761(12), 1459-1468. doi: 10.1016/j.bbalip.2006.06.018
- Yang, K. Q., Xiao, Y., Tian, T., Gao, L. G., & Zhou, X. L. (2014). Molecular genetics of Liddle's syndrome. *Clin Chim Acta*, 436C, 202-206. doi: 10.1016/j.cca.2014.05.015
- Yang, S. S., Lo, Y. F., Wu, C. C., Lin, S. W., Yeh, C. J., Chu, P., . . . Lin, S. H. (2010). SPAK-knockout mice manifest Gitelman syndrome and impaired vasoconstriction. *J Am Soc Nephrol*, 21(11), 1868-1877. doi: 10.1681/ASN.2009121295
- Yang, S. S., Morimoto, T., Rai, T., Chiga, M., Sohara, E., Ohno, M., . . . Uchida, S. (2007). Molecular pathogenesis of pseudohypoaldosteronism type II: generation and analysis of a

- Wnk4(D561A/+) knockin mouse model. *Cell Metab*, 5(5), 331-344. doi: 10.1016/j.cmet.2007.03.009
- Yang, T., Zhang, A., Honeggar, M., Kohan, D. E., Mizel, D., Sanders, K., . . . Schnermann, J. B. (2005). Hypertonic induction of COX-2 in collecting duct cells by reactive oxygen species of mitochondrial origin. *J Biol Chem*, 280(41), 34966-34973. doi: 10.1074/jbc.M502430200
- Zusman, R. M., & Keiser, H. R. (1977). Prostaglandin biosynthesis by rabbit renomedullary interstitial cells in tissue culture. Stimulation by angiotensin II, bradykinin, and arginine vasopressin. *J Clin Invest*, 60(1), 215-223. doi: 10.1172/JCI108758

L'hypertension est l'une des maladies humaines les plus courantes. Aujourd'hui, de nombreuses études confirment l'hypothèse selon laquelle l'hypertension implique nécessairement un transport anormal de sel (NaCl) par les reins.

Le néphron, l'unité fonctionnelle du rein, est composé de plusieurs segments présentant différents systèmes de transport de NaCl. Notre équipe a récemment démontré que les cellules β -intercalaires (β -IC) du canal collecteur (CD) étaient capables de réabsorber du NaCl. Ce transport est possible grâce au couplage fonctionnel de deux échangeurs apicaux, pendrine et NDCBE, énergisé par la pompe à proton basolatérale. L'objectif de cette thèse est de caractériser ce transport et de montrer que les β -IC jouent un rôle important dans le maintien de la balance en sodium et de la pression artérielle. Nous avons montré que la délétion de NDCBE provoque une hypotension malgré la mise en place d'une compensation par le cotransporteur de NaCl NCC du néphron distal. Les souris double knock-out pour NDCBE et NCC présentent une déplétion volumique plus prononcée et une hypokaliémie démontrant l'importance de NDCBE dans le maintien de la pression artérielle, de la balance de sodium et de la prévention de l'hypokaliémie. Nous avons également montré que l'invalidation génique de la sous unité B1 de la pompe à proton, spécifiquement exprimée dans les cellules intercalaires, entraîne une perte rénale de sodium et une hypotension. La perte de NaCl est originaire du CD où le système pendrine/NDCBE des β -IC et le canal sodique ENaC des cellules principales sont inhibés. Nous avons identifié une voie de signalisation paracrine ATP /PGE2 émanant des β -IC, intervenant dans le contrôle de la fonction des cellules principales. Enfin, chez des souris possédant une mutation de la kinase WNK4, responsable du syndrome de Gordon, une maladie caractérisée notamment par une hypertension artérielle et une hyperkaliémie, le transport de NaCl par les β -IC est augmentée et cette activation contribue probablement à la mise en place de la maladie. En conclusion, nous avons démontré que 1) le système pendrine/NDCBE des β -IC joue un rôle important dans le maintien d'une volémie et d'une pression artérielle constantes et dans la prévention de l'hypokaliémie, 2) les β -ICs contrôlent la fonction des cellules principales voisines.

Hypertension is one of the most common human diseases. Many studies support the hypothesis that hypertension necessarily involve abnormal transport of salt (NaCl) by the kidneys. The nephron, the functional unit of the kidney, is composed of several segments with different NaCl transport systems. Our team has recently demonstrated that β -intercalated cells (β -IC) of the collecting duct (CD) were able to reabsorb NaCl. This transport is possible through functional coupling of two apical exchangers, pendrin and NDCBE, energized by the basolateral proton pump. The objective of this thesis is to characterize the transport and show that β -IC play an important role in maintaining sodium balance and blood pressure. First, we showed that deletion of NDCBE causes hypotension despite compensatory increase in expression of the NaCl cotransporter NCC, another sodium transporter of the distal nephron. Double knockout mice for NDCBE and NCC have a more pronounced volume depletion and hypokalemia demonstrating the importance of NDCBE in maintaining normal blood pressure and sodium balance and, in preventing hypokalemia. Second, deletion of the B1 subunit of the proton pump specifically expressed by the intercalated cells leads to renal NaCl loss and hypotension. We showed that NaCl loss originates from the CD, where both the NDCBE/pendrin system and the sodium channel ENaC of the principal cells were inhibited. We also showed that β -IC controls ENaC through an ATP-triggered PGE2 paracrine signalling pathway. Finally, in mice bearing a mutated form of the WNK4 kinase, known to cause the Gordon syndrome, a disease characterized by hypertension and hyperkalemia, the NaCl transport by β -IC is activated and this activation likely contributes to the establishment of the disease.

In conclusion, we demonstrated that 1) the NDCBE/pendrin system plays a key role in maintaining normal vascular volume and blood pressure, and in the prevention of hypokalemia, 2) β -ICs control the function of the adjacent principal cells.