

Université de Montréal

**Analyse fonctionnelle de nouvelles mutations
de l'aquaporine-2 responsables du
diabète insipide néphrogénique**

par Cécile Guyon
Département de Biochimie
Faculté de Médecine
Université de Montréal

11618377



Mémoire présenté à la Faculté des Etudes Supérieures
en vue de l'obtention du grade de
M.Sc. en Biochimie

Décembre 2004
Université de Montréal
Faculté des Etudes Supérieures



W

4

U58

2005

v. 111

AVIS

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

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

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

NOTICE

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

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

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

Ce mémoire intitulé :

**Analyse fonctionnelle de nouvelles mutations
de l'aquaporine-2 responsables du
diabète insipide néphrogénique**

présenté par :
Cécile Guyon

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Luc Desgroseillers, président-rapporteur
John Chan, membre du jury
Daniel Bichet, directeur de recherche.

Résumé

Les mutations dans le gène de l'*AQP2*, qui code pour le canal à l'eau dépendant de la vasopressine au niveau des tubules collecteurs rénaux, sont responsables du diabète insipide néphrogénique autosomique. Plus de 33 mutations responsables de la maladie ont été rapportées à ce jour. Nous avons récemment identifié un patient masculin avec un diabète insipide congénital qui est un hétérozygote composé de deux mutations de l'*AQP2* non recensées : D150E et G196D. Des analyses d'immunobuvardage des protéines sauvages et mutantes de l'*AQP2* exprimées dans des ovocytes révèlent la présence possible d'une forme glycosylée riche en résidus mannose des AQP2-D150 et de AQP2-G196D (21 kD), en plus d'une forme à 19 kD détectée pour l'*AQP2*-wt. Les expériences d'immunofluorescence montrent un faible marquage à la membrane plasmique des ovocytes pour les AQP2-D150 par contre le marquage pour les AQP2-G196D est cytoplasmique. Les expériences de perméabilité membranaire dans des ovocytes démontrent une absence de transport de l'eau pour l'*AQP2*-G196D ($Pf = 0.41 \pm 0.15 \text{ cm/s} \cdot 10^{-3}$ pour 10ng d'ARNm injecté, n=20) et une diminution de 30 fois pour l'*AQP2*-D150E ($Pf = 1,36 \pm 0.7$, 10ng, n=9) comparé à l'*AQP2*-wt ($Pf = 3,01 \pm 0,55$, 1ng, n=16). Ces résultats sont inconsistants avec le phénotype sévère de perte de fonction chez le patient, car l'*AQP2*-D150E va à la membrane plasmique et est partiellement fonctionnelle. Le phénotype sévère pourrait être dû à une interaction entre AQP2-D150E et AQP2-G196D. Nous avons aussi réétudié les symptômes polyuro-polyurique dit être présents chez la mère et la grand-mère, ce qui pourrait indiquer que l'*AQP2*-G196D est une mutation partiellement dominante. Nous proposons que l'analyse de toutes les mutations connues d'*AQP2* pourrait entraîner une meilleure compréhension de la structure et de la fonction des AQP2 ainsi que de la variabilité phénotypique observé chez les patients de diabète insipide néphrogénique.

Mots clés : diabète insipide néphrogénique autosomique récessif, DIN, AQP2, trafic des protéines, mutants d'aquaporin-2

Abstract

Mutations in the *AQP2* gene, which encodes the vasopressin-dependant collecting duct luminal water channel, have been shown to cause autosomal nephrogenic diabetes insipidus. More than 33 putative disease causing mutations have been reported to date. We recently identified a male patient with severe congenital nephrogenic diabetes insipidus who is compound heterozygote for two previously unreported aquaporine-2 (AQP2) mutations : D150E and G196D. Immunoblot analysis of wild-type and mutant AQP2 proteins expressed in oocytes revealed possibly high-mannose glycosylated AQP2 forms for AQP2-D150E and AQP2-G196D (21kD), in addition to the 19 kD band detected for wt-AQP2. Immunofluorescence microscopy showed faint plasma membrane staining for D150E but only cytoplasmic staining for G196D. Osmotic water permeability assays in oocytes demonstrated an absence of water transport for the AQP2-G196D ($Pf=0.41\pm 0.15$ cm/s. 10^{-3} for 10ng of cRNA injected, n=20) and a 30-fold decrease for AQP2-D150E ($Pf=1,36\pm 0.7$, 10ng, n=9) compared to the wt-AQP2 ($Pf=3,01\pm 0,55$, 1ng, n=16). These results are inconsistent with the severe loss-of-function phenotype observed in the patient, since the AQP2-D150E reaches the plasma membrane and is partially functional. The severe phenotype could be due to a heterodimeric interaction between AQP2-D150E and AQP2-G196D. We are also re-investigating polyuro-polyuric symptoms said to be present in the mother and grandmother, which may indicate that G196D is a partially dominant mutation. We are proposing that analysis of all known *AQP2* mutations may lead to a better understanding of the structure and function of AQP2 and the phenotypic variability seen in nephrogenic diabetes insipidus patients.

Keywords : autosomal recessive nephrogenic diabetes insipidus, NDI, AQP2, protein trafficking, aquaporin-2 mutants

Table des matières

Résumé	i
Abstract	iii
Tables des matières	iv
Abréviations	ix
Liste des figures	xiii
Liste des tableaux	xiv
Remerciements	xv
Dédicaces	xvi
Chapitre 1 : Le rein	
1) Anatomie fonctionnelle du rein	1
1.1) Structure macroscopique du rein	1
1.2) Le néphron	2
1.2.1) Le glomérule	4
1.2.2) Le tubule	4
1.2.3) L'appareil juxtaglomérulaire	5
1.3) Les vaisseaux rénaux	6
1.3.1) Description	6
1.3.2) Filtration et réabsorption	8
1.4) Voies urinaires	8
2) La physiologie rénale : les fonction du rein	9
2.1) Rôle de filtration : homéostasie hydrique	10
2.2) Régulation du milieu intérieur	11
2.2.1) Le tubule proximal	12
2.2.2) L'anse de Henle	13
2.2.3) Le tubule distal	13
2.2.4) Le canal collecteur	14
2.3) Système de drainage de l'urine	14
2.3.1) Système de contre courant	15

2.3.2) Les vasa recta	17
2.3.3) Le recyclage de l'urée	17
2.4) Rôle dans l'élimination des déchets	18
2.5) Fabrication d'hormones	19
3) L'hormone antidiurétique	21
3.1) Synthèse	21
3.2) Sécrétion	23
3.3) Régulation de la sécrétion	24
3.3.1) Hyperosmolarité	24
3.3.2) Volume sanguin	24
3.4) Catabolisme	24
3.5) Les fonctions de l'hormones antidiurétiques	24
4) Les récepteurs à l'arginine vasopressine	25
4.1) Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG)	25
4.1.1) Description	26
4.1.2) Les protéines G	27
4.1.2.1) Description	27
4.1.2.2) Activation des protéines G : le cycle GTP-ase	28
4.1.2.3) La sous-unité $\beta\gamma$	29
4.1.3) L'adénylate cyclase	30
4.2) Les récepteurs de l'hormone antidiurétique	30
4.2.1) Les types de récepteurs	31
4.2.2) L'AVPR2	32
4.2.2.1) Topologie	32
4.2.2.2) La dimérisation des récepteurs AVPR2	33
4.2.2.3) Cascades intracellulaires	33

4.2.2.4) La désensibilisation du récepteur AVPR2	34
4.2.2.4.a) La régulation de la concentration en agoniste	35
4.2.2.4.b) Le découplage fonctionnel par phosphorylation	35
4.2.2.4.c) L'internalisation du complexe ligand-récepteur	35
4.2.2.4.d) La régulation négative du nombre total de récepteurs à la surface cellulaire, ou down regulation.	35
5) Les maladies génétiques rénales	36
5.1) Désordre génétique du transport tubulaire	37
5.1.1) Mutation affectant les protéines de transport du sodium (Na) sensibles aux diurétiques	38
5.1.1.1) Syndrome de Gitelman	38
5.1.1.2) Syndrome de Bartter	39
5.1.1.3) Le mécanisme de l'hypokaliémie	40
5.1.2) Mutation affectant le canal sodium épithélial	41
5.1.2.1) Syndrome de Liddle	41
5.1.2.2) Pseudohypoaldostéronisme de type 1	42
5.1.3) Mutation affectant le canal au chlore : syndrome de Fanconi	43
5.2) Le diabète insipide	43
5.2.1) Les types de diabète insipide	44
5.2.2) Le diabète insipide néphrogénique	44
5.2.2.1) Le DIN héréditaire lié au chromosome X	45
5.2.2.2) Le DIN héréditaire autosomique	46
Chapitre 2 : L'aquaporine 2	
1) Les canaux à eau : aquaporine	48
1.1) Découverte et historique	48
1.2) Les différentes aquaporines	49
1.2.1) Fonctions des différentes AQP	49
1.2.2) Localisation des différentes AQP	50
1.3) Structure générale	51
2) Les AQP du rein	55
2.1) AQP1	55

2.2) AQP 3 et 4	56
2.3) AQP6	56
2.4) AQP7 et AQP8	56
2.5) AQP2	56
2.5.1) Découvertes	56
2.5.2) Structure	57
2.5.3) Trafic intracellulaire de l'AQP2	57
2.5.4) Régulation des AQP2	58
2.5.5) Trafic des agrégophores d'AQP2 vers la membrane apicale	59
2.5.6) Régulation à long terme des AQP2 : régulation transcriptionnelle	62
Chapitre 3 : Analyse fonctionnelle de nouvelles mutations de l'aquaporine-2 responsables du diabète insipide néphrogénique	
1) Introduction	64
2) Matériels et méthodes	66
1) Les patients	66
2) Analyse haplotypique	66
3) Construction de l'ADN complémentaire (ADNc) et synthèse de l'ARN complémentaire (ARNc)	67
4) Préparation des ovocytes de <i>Xenopus laevis</i>	67
5) Isolation des membranes totales et des membranes plasmiques	68
6) Mesures de la perméabilité membranaire	68
7) Analyse des données	69
8) Expériences d'immunobuvardage	69
9) Expériences d'immunofluorescence	70
3) Résultats	71
1) Analyse des patients	71
2) Analyse fonctionnelle des AQP2 mutantes	73
3) Localisation cellulaire des mutants d'AQP2 dans les ovocytes	79
4) Expérience de co-expression : interaction entre les mutants et l'AQP2-wt ?	81
4) Discussion	82
Trafic intracellulaire des AQP2	82
Phénotype des mutants d'AQP2-D150E et G196D entraînant le DIN	83

Hétérotétramérisation entre les mutants et l'AQP2-wt ?	84
5) Conclusions et perspectives	85
Bibliographie	87

Abréviations

Δ	déletion
°C	degré Celsius
3D	trois dimensions
AA	acide aminé
AC	adénylate cyclase
acides aminés	A, Ala, Alanine ; C, Cys, Cystéine ; D, Asp, Acide aspartique ; E, Glu, Acide glutamique ; F, Phe, Phénylalanine ; G, Gly, Glycine ; H, His, Histidine ; I, Ile, Isoleucine ; K, Lys, Lysine ; L, Leu, Leucine ; M, Met, Méthionine ; N, Asn, Asparagine ; P, Pro, Proline ; Q, Gln, Glutamine ; R, Arg, Arginine ; S, Ser, Sérine ; T, Thr, Thréonine ; V, Val, Valine ; W, Trp, Tryptophane ; Y, Tyr, Tyrosine
ACTH	hormone corticotrope (adrenal cortico tropin hormone)
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
AQP	aquaporine
ARN	acide ribonucléique
ARNc	acide ribonucléique complémentaire
ARNm	acide ribonucléique messenger
ATP	adénosine triphosphate
AVP	L-arginine vasopressine
AVPR1a	récepteur 1a de l'arginine vasopressine
AVPR1b	récepteur 1b de l'arginine vasopressine
AVPR2	récepteur 2 de l'arginine vasopressine
AVPR3	récepteur 3 de l'arginine vasopressine
Ca	calcium
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CHIP28	channel-like integral protein of 28kD
Cl	chlore
cm	centimètre
COOH-	carboxy-

CRE	cAMP-responsive element
CREB	cAMP response element binding protein
DAG	di-acyl glycérol
dDAVP	1-désamino-8-D-arginine vasopressine, desmopressine
DI	diabète insipide
DIC	diabète insipide central
DIN / NDI	diabète insipide néphrogénique / nephrogenic diabetes insipidus
EGF	epidermal growth factor
ENAC	canal sodique de l'épithélium (epithelial sodium channel)
EPO	érythropoïétine
FG	filtration glomérulaire
FITC	fluorescein isothiocyanate
G	gramme
GAP	GTPase-activating protein
GDP	guanosine diphosphate
GFP	glycerol facilitator- like proteins
GMPc	guanosine monophosphate cyclique
GRK	kinase des récepteurs couplés aux protéines G (G-protein coupled receptor kinase)
GTP	guanosine triphosphate
HAD	hormone anti-diurétique
IGF1	somatomédine hépatique C (insulin-like growth factor)
IP3	inositol triphosphate
K	potassium
kD	kiloDalton
kg	kilogramme
L	litre
MAP kinase	kinase des protéines activées par les mitogènes (mitogen activated protein kinase)
Mg	magnésium
mg/ml	milligramme
min	minute
MIP	major intrinsic protein

ml	millilitre
mM	millimolaire
mmHg	millimètre de mercure
mOsm	milliosmole
Na	Sodium
NaCl	chlorure de sodium
ng	nanogramme
NH ₂ -	amino-
NPA	asparagine-proline-alanine
NPII	neurophysine II
PBS	potassium buffered saline
PCR	réaction de polymérisation en chaîne
PDE	phosphodiesterase
PDZ	PSD-95, discs-large et ZO-1, domaines reconnaissant un motif de type (A/S)-T-X-(L/V) situé dans la région C-terminale des protéines cibles (Snow et al., 1998)
Pf	perméabilité membranaire
pH	potentiel d'Hydrogène
PI ₃ -kinase	phosphoinositide-3-kinase
PIP ₂	phosphatidyl inositol diphosphate
PKA	protéine kinase A
PKC	protéine kinase C
PP2B	phosphatase 2B
protéine G	protéine à guanine
PY	proline-tyrosine
RCPG	récepteur couplé aux protéines
RE	réticulum endoplasmique
S	seconde
SDS	sodium dodecyl sulfate
SPA-1	signal-induced proliferation-associated gene-1
TBS	tris buffered saline
TBS-T	tris buffered saline – tween
UTA1	transporteur à l'urée A1

VAMP2	vesicle-associated membrane protein (synaptobrévine)
wt	forme sauvage
μ l	microlitre
μ m	micromètre

Liste des figures :

Figure 1 : Schéma d'un rein gauche

Figure 2 : Schéma d'un néphron à longue anse de Henle (à gauche) et d'un néphron à courte anse de Henle (à droite)

Figure 3 : Schéma d'un glomérule

Figure 4 : Schéma de l'appareil juxtaglomérulaire

Figure 5 : Circulation sanguine au niveau d'un néphron

Figure 6 : Les voies urinaires

Figure 7 : Représentation schématique d'un seul néphron et du mécanisme de concentration urinaire

Figure 8 : Structure 3D et secondaire de l'AVP

Figure 9 : Synthèse de l'AVP

Figure 10 : Sécrétion d'AVP dans les cellules sécrétrices

Figure 11 : Schéma de la cascade intracellulaire déclenchée lors de la fixation d'un substrat sur un RCPG

Figure 12 : Les différentes protéines G et leurs différents effecteurs

Figure 13 : Schéma d'activation et d'inactivation des RCPG

Figure 14 : Les sous-unités $\beta\gamma$ et leurs effecteurs

Figure 15 : Organisation de l'adénylate cyclase : topologie générale et organisation de l'enzyme

Figure 16 : Interaction de l'AVP avec les récepteurs V1a et V1b

Figure 17 : Représentation schématique de l'AVPR2

Figure 18 : Schéma récapitulatif de la désensibilisation du récepteur AVPR2

Figure 19 : Localisation des différentes maladies génétiques ou désordres au niveau du néphron

Figure 20 : Les différents syndromes de Bartter

Figure 21 : Le pseudohypoaldostéronisme autosomique : récessif ou dominant

Figure 22 : Classification des AQP : aquaporines pures et aquaglycéroporines

Figure 23 : Modèle du sablier de l'AQP1

Figure 24 : Modèle du sablier : passage de l'eau au niveau moléculaire

Figure 25 : Tétramérisation des AQPs dans les membranes biologiques

Figure 26 : Les différents types de glycosylation

- Figure 27 : Localisation des différentes AQP2 présentes au niveau du néphron
- Figure 28 : Cascade de signalisation du trafic de l'AQP2 lors de la régulation par l'AVP
- Figure 29 : Régulation à court et long terme de l'AQP2 dans une cellule principale du tubule collecteur
- Figure 30 : Arbre généalogique de la famille pour le gène de l'AQP2
- Figure 31 : Représentation schématique de l'AQP2
- Figure 32 : Linéarité d'expression pour l'AQP2-wt entre 0 et 1 ng
- Figure 33 : Linéarité entre la quantité d'ARNc d'AQP2-wt injecté et les protéines synthétisées dans les ovocytes
- Figure 34 : Étude de la fonctionnalité des mutants AQP2-D150E et -G196D exprimés dans des ovocytes de *Xenopus laevis*
- Figure 35 : Relation entre la perméabilité membranaire des mutants AQP2-D150E et -G196D et la concentration d'ARNc injecté dans les ovocytes de *Xenopus laevis*
- Figure 36 : Relation entre la quantité d'ARNc injecté d'AQP2-G196D et les protéines synthétisées dans les ovocytes de *Xenopus laevis*
- Figure 37 : Analyse d'immunobuvardage des protéines d'AQP2 exprimées dans les ovocytes.
- Figure 38 : Fonctionnalité des AQP2-wt, -D150E et -G196D : réponse à un choc hypotonique de 20 mOsm
- Figure 39 : Perméabilité membranaire déterminée dans le système d'ovocyte pour AQP2-wt, -D150E et -G196D
- Figure 40 : Localisation des AQP2-wt, -D150E et -G196D dans des ovocytes
- Figure 41 : Expériences de co-expression entre AQP2-wt, -D150E et -G196D

Liste des tableaux :

Tableau 1 : Distribution des aquaporines selon leur type et selon leur tissu

Tableau 2 : Distribution des aquaporines selon leur type et selon le tissu

Remerciements

Je souhaite remercier tout d'abord le Docteur Daniel Bichet pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, pour les discussions scientifiques ainsi que pour l'aide durant ma maîtrise. Merci à Pierre Bissonnette, Marie-Françoise Arthus et Michelle Lonergan pour leur soutien technique et scientifique. Merci spécial à Nicolas Debrand. Je tiens aussi à remercier Nicole Ruel ainsi que tous les membres du GEPROM. Merci aussi à Danielle Binette.

Ce mémoire de maîtrise est dédié à mes parents.

Merci pour tout.

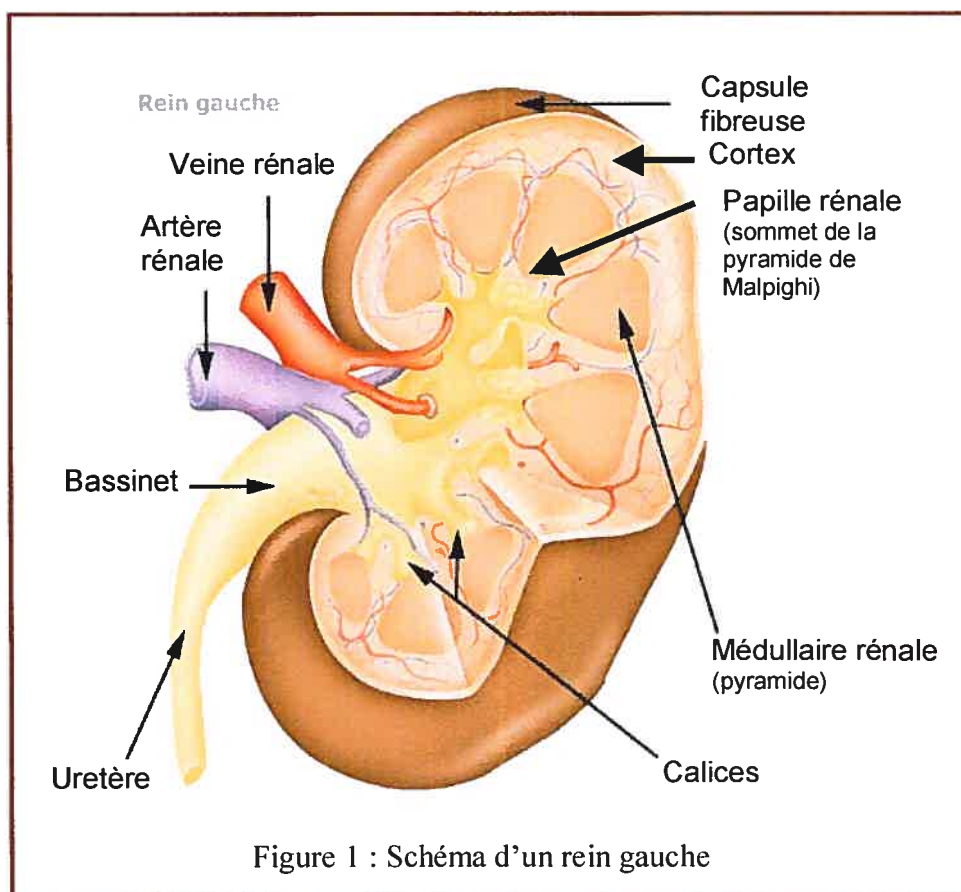
Chapitre 1 :

Le rein

1) Anatomie fonctionnelle du rein

1.1) Structure macroscopique du rein

Le système rénal se compose de deux reins. Ils se situent de part et d'autre de la colonne vertébrale et sont généralement localisés entre la 12^{ème} vertèbre thoracique et la 3^{ème} vertèbre lombaire. La structure du rein droit lui confère une forme plus caudale que celle du rein gauche et il est positionné plus bas que le rein gauche. Le poids de chaque rein est d'environ 150 g pour les hommes et de 130 g pour les femmes.



Chaque rein est entouré par une capsule fibreuse rigide servant de protection contre les traumatismes. Une coupe sagittale d'un rein permet de distinguer deux zones distinctes : une

zone externe pâle, le cortex, et une zone interne plus foncée, la médullaire. Le cortex a une épaisseur de 1 cm et est le siège des glomérules (lieu de la filtration). La médullaire peut être elle-même divisée en une zone externe (médullaire externe) et une zone interne (médullaire interne) prolongée par la papille. La médullaire est divisée en masses coniques striées constituant les pyramides de Malpighi dont la base s'appuie sur le cortex et le sommet pénètre dans la médullaire interne pour faire saillie dans les voies urinaires (petits calices) (fig.1).

1.2) Néphron

Environ 1 200 000 néphrons composent chaque rein pour l'espèce humaine. Le néphron est l'unité fonctionnelle du rein car les néphrons ont un rôle dans la filtration, la régulation et la concentration de l'urine. Les néphrons sont séparés les uns des autres par le tissu interstitiel.

Chaque néphron est constitué de :

- un corpuscule de Malpighi (glomérule et capsule de Bowman),
- un tubule comprenant :
 - un tubule proximal,
 - une anse de Henle,
 - un tubule distal (fig. 2).

Le filtrat urinaire est alors recueilli dans un tubule collecteur où différents néphrons se déversent.

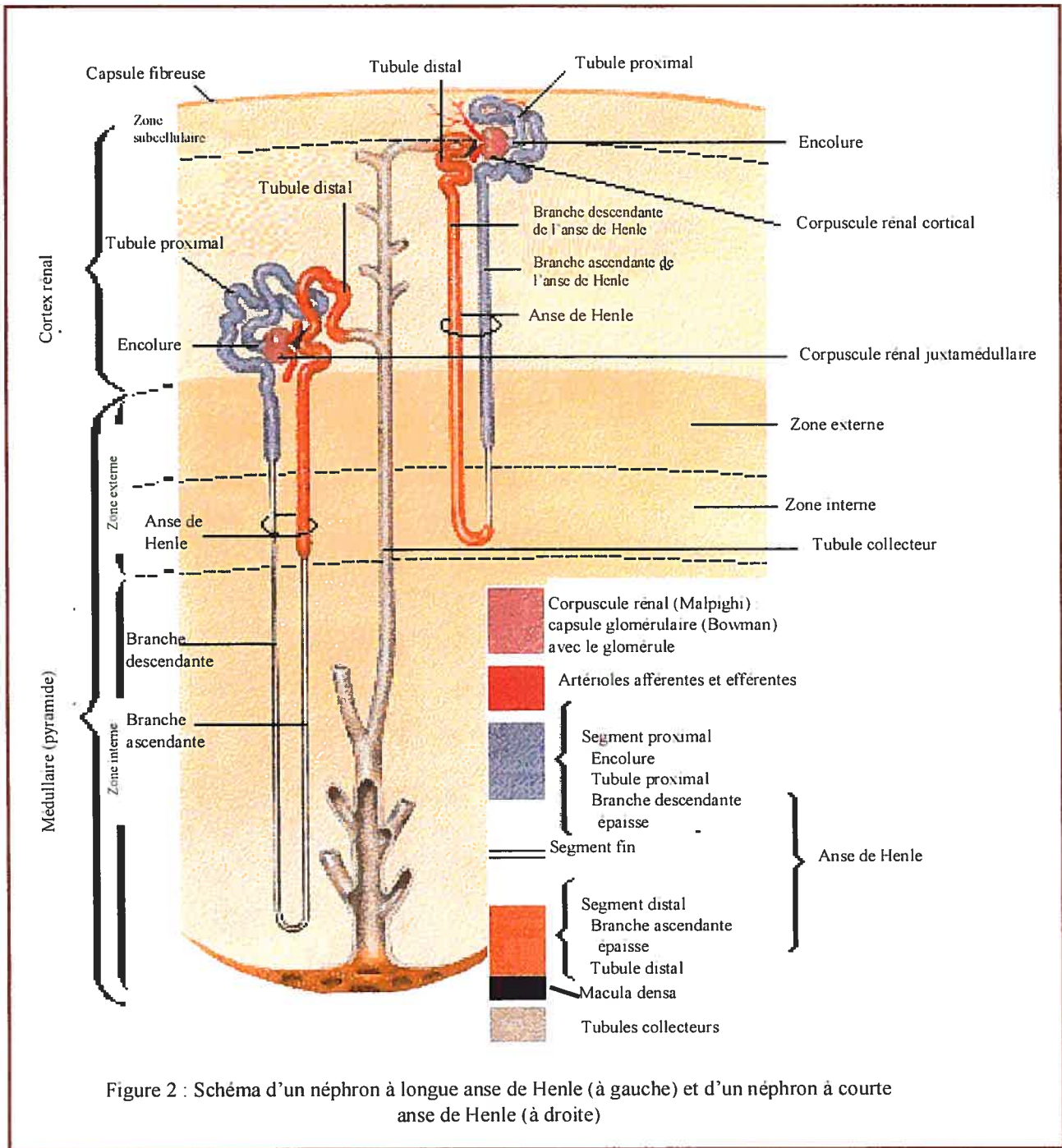
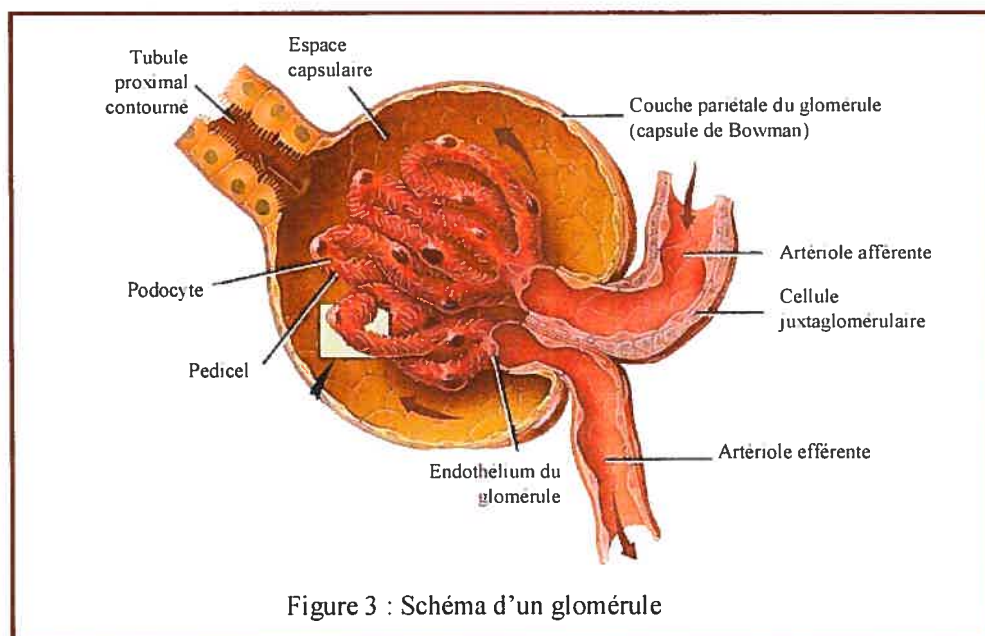


Figure 2 : Schéma d'un néphron à longue anse de Henle (à gauche) et d'un néphron à courte anse de Henle (à droite)

Le tubule collecteur ne provient pas de la même structure embryonnaire que le néphron mais l'origine mise à part, ces structures sont interreliées et interdépendantes du point de vue anatomique et physiologique (Guyton, 2000).

1.2.1) Glomérule

Le glomérule constitue la patrie initiale du néphron. Tous les glomérules sont situés dans le cortex du rein. Le sang pénètre dans le glomérule grâce à un réseau complexe de capillaires contenu dans la capsule de Bowman qui s'ouvre dans la lumière du tubule proximal. Le glomérule est le siège de la formation de l'urine primitive qui est un filtrat du plasma (fig. 3).



1.2.2) Tubule

Le tubule est le lieu d'élaboration progressive de l'urine définitive. Il fait suite au glomérule et est composé d'une seule couche de cellules épithéliales. Le filtrat urinaire provenant du glomérule se retrouve alors dans le tubule proximal. Il est ensuite acheminé dans l'anse de

Henle puis dans le tubule distal. Le tubule distal déverse le filtrat dans un tubule collecteur formé de huit tubules distaux fusionnés. Plusieurs tubules collecteurs fusionnent afin de former des tubes collecteurs de plus en plus larges. Ces tubes collecteurs s'enfoncent au centre de la médullaire pour se déverser dans le pelvis rénal.

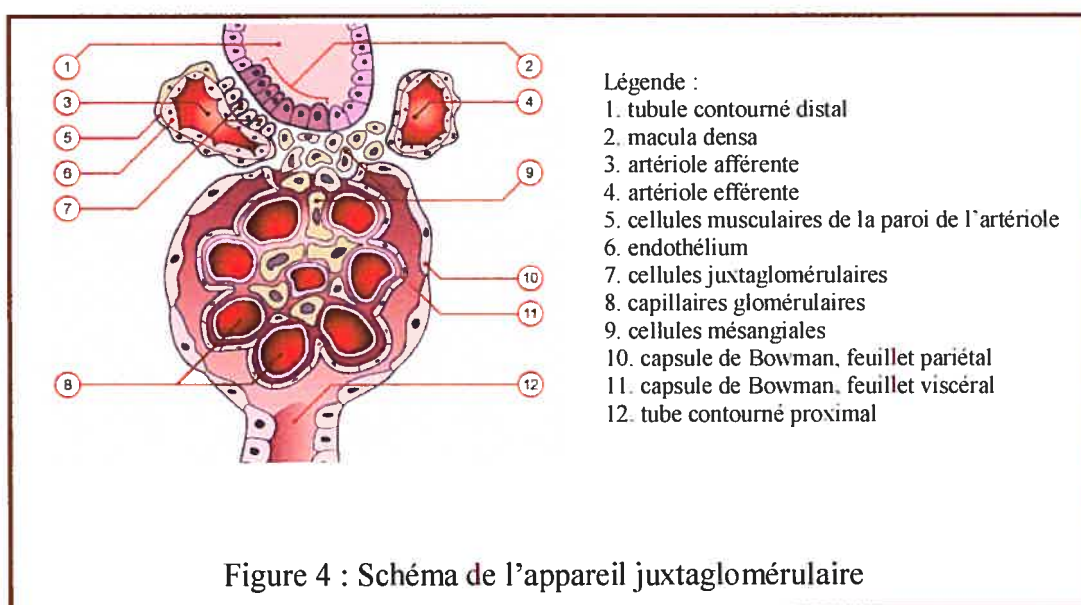
Deux populations de néphrons sont présentes dans le rein, ceux possédant une anse de Henle courte et ceux avec une anse de Henle longue. Chez les humains, on retrouve 7 fois plus de néphrons à petite anse de Henle que de néphrons à longue anse car ils sont responsables de l'hyperconcentration des urines.

1.2.3) L'appareil juxtaglomérulaire

L'appareil juxtaglomérulaire est une petite structure endocrine située au pôle vasculaire du corpuscule rénal. C'est une région spécialisée de l'artériole afférente et du tube contourné distal, constituée de trois composantes:

- la macula densa de la portion initiale du tube contourné distal. Il s'agit d'une région cellulaire (15 à 40 cellules), face à l'artériole afférente, qui se différencie du reste de la paroi du tube contourné distal. Ces cellules sont prismatiques (plus hautes et plus étroites) et ont un noyau arrondi ou ovale situé au pôle apical. L'appareil de Golgi se trouve en position basale sous le noyau et l'espace intercellulaire est très large. Il n'y a pas d'interdigitation sur les faces latérales,
- les cellules mésangiales extraglomérulaires dites « cellules du lacis ». Elles remplissent l'apex entre l'artériole afférente et l'artériole efférente et forment une masse conique dont la base repose sur la macula densa,

- les cellules juxtaglomérulaires ou «cellules granuleuses». Elles remplacent les cellules musculaires lisses dans la partie terminale de l'artériole afférente. Ces cellules, plus ou moins cubiques, ont des propriétés contractiles. Elles ont aussi une fonction sécrétrice endocrine. Elles contiennent des granulations (grain de rénine). Ces cellules jouent un rôle de barorécepteur, c'est à dire qu'elles sont sensibles à la pression sanguine. La sécrétion de rénine augmente lors de libération par les fibres adrénérgiques de norépinéphrine et dopamine induisant une vasoconstriction des artérioles afférentes (fig. 4).

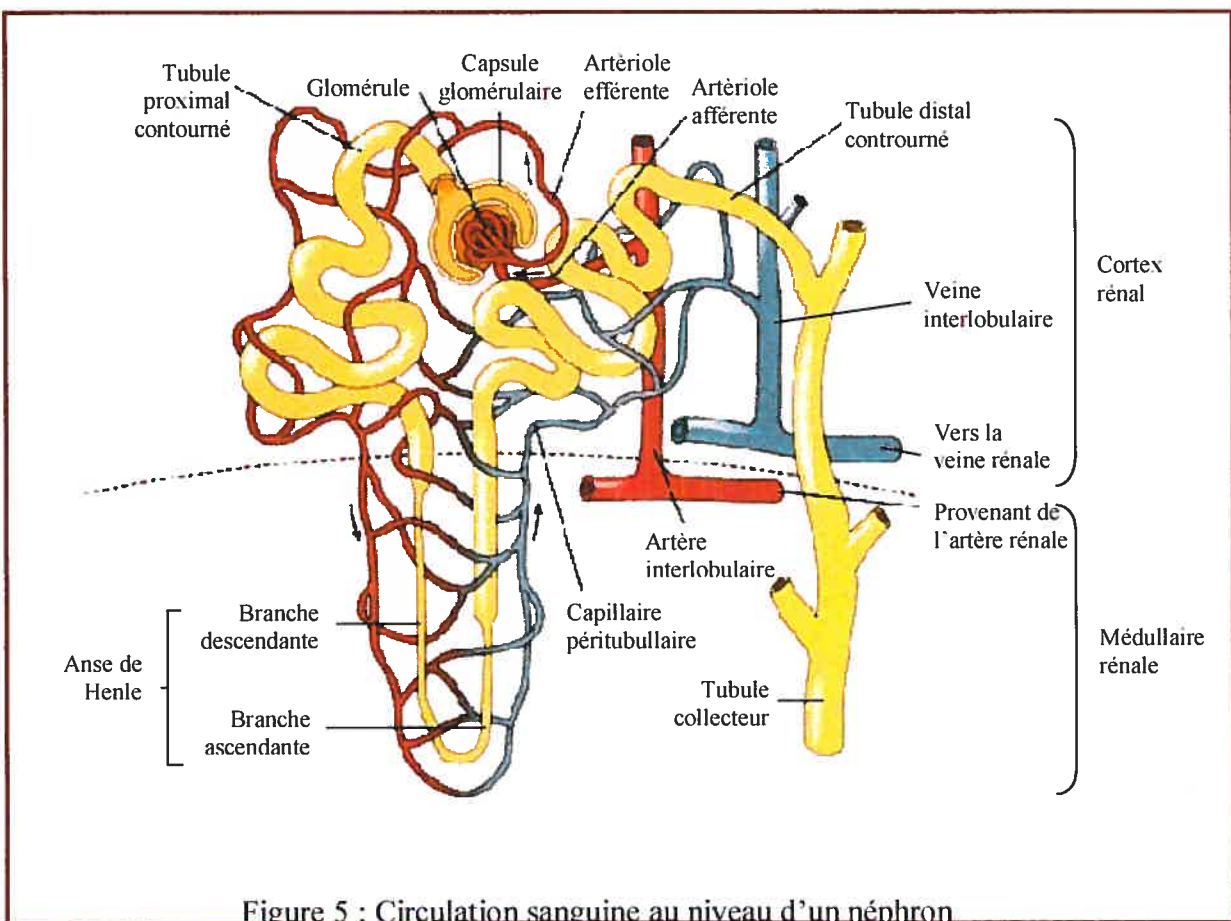


1.3) Vaisseaux rénaux

1.3.1) Description

Le rein est l'un des organes les mieux vascularisés en raison de son rôle dans la régulation hydrique. Chaque minute, le rein reçoit 1,1 litre de sang (l'équivalent de 20% du débit cardiaque) permettant une régulation hydrique constante. L'artère rénale principale et ses branches pénètrent dans le rein par le hile. Ces branches se divisent en artères segmentaires

puis en artères interlobaires qui rentrent dans la médulla entre les pyramides Malpighi jusqu'à la jonction corticomédullaire. A ce niveau, les artères arquées naissent et cheminent entre le cortex et la médulla. Ces artères arquées se divisent alors en artères interlobulaires qui parcourent le cortex vers la surface du rein et forment à leur tour, perpendiculairement, les artérioles afférentes qui vont pénétrer dans le glomérule acheminant ainsi le sang aux corpuscules de Malpighi. Le retour veineux suit approximativement le trajet inverse de celui des artères (fig. 5).

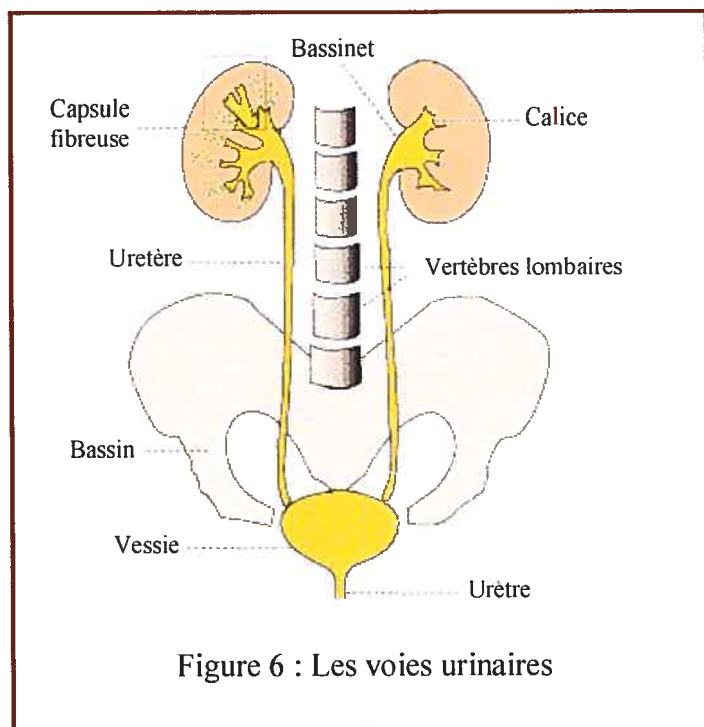


1.3.2) Filtration et réabsorption

La circulation rénale est constituée par deux réseaux de capillaires en série comme la circulation hépatique. Les réseaux de capillaires glomérulaires et péri-tubulaires composent la microcirculation rénale. Cette disposition de ces deux circulations capillaires permet les contrôles des pressions hydrostatiques ce qui facilite la filtration et la réabsorption hydrique par l'intermédiaire du déséquilibre entre les pressions tubulaires et interstitielles. Les capillaires glomérulaires ont une pression hydrostatique de 60 mmHg ce qui entraîne une filtration rapide du plasma sanguin alors que la pression hydrostatique des capillaires péri-tubulaires de 13 mmHg engendre une réabsorption rapide de l'eau et des solutés. Ce système de capillaires joue un rôle important dans le mécanisme de contre-courant qui aide à la réabsorption hydrique par différence de gradient osmotique.

1.4) Voies urinaires

Les voies urinaires recueillent l'urine définitive préalablement formée dans les néphrons. La partie terminale des néphrons ou canaux collecteurs débouche dans les calices qui constituent la première partie des voies urinaires. Il y a autant de calices qu'il y a de pyramides de Malpighi : 3 petits calices supérieurs, 2 petits calices moyens et 4 à 5 calices inférieurs. Chaque petit calice se jette dans un grand calice. Ces calices se déversent dans le bassinnet qui occupe une place à la fois intra- et extra-rénal. Ce bassinnet devient progressivement l'uretère. Ces voies urinaires sortent du rein par le hile. Les uretères descendent des deux cotés pour se terminer dans la vessie (fig. 6).



Une fois dans la vessie, l'urine est excrétée vers l'extérieur du corps via l'urètre. Les voies urinaires représentent des conduits permettant l'évacuation et l'excrétion de l'urine, et ne servent pas à modifier l'urine formée au niveau des néphrons.

2) La physiologie rénale : les fonctions du rein

Les fonctions du rein sont diverses. En plus d'être responsable de l'homéostasie hydrique, le rein joue un rôle dans l'élimination des déchets métaboliques (urée, acide urique, créatine, acide oxalique) ainsi que des produits exogènes (toxines, médicaments). Le rein catabolise des protéines à faible poids moléculaires et des hormones polypeptidiques (insuline, parathormone). Le rein est aussi impliqué dans la régulation du milieu intérieur en filtrant et réabsorbant certains ions au niveau des tubules. Il est le site de synthèse de plusieurs hormones (rénine, nombreuses prostaglandines rénales), de l'érythropoïétine (responsable de l'hématocrite), du calcitriol (responsable de la régulation du calcium et du phosphate) ainsi que de certains facteurs de croissance (comme IGF1) (tab. 1).

Tableau 1 : Principales fonctions du rein

- ◆ Maintien du volume et de la composition ionique des liquides de l'organisme (homéostasie),
- ◆ Excrétion des déchets métaboliques terminaux (urée, créatinine, acide urique, oxalate),
- ◆ Détoxification et élimination des toxines, médicaments et de leur métabolites,
- ◆ Régulation endocrine des volumes extracellulaires et de la pression artérielle (système rénine-angiotensine ; prostaglandines rénales ; système kinine-kallikréine),
- ◆ Contrôle endocrine de la masse érythrocytaire (érythropoïétine),
- ◆ Contrôle endocrine du métabolisme minéral (calcitriol),
- ◆ Catabolisme des protéines de petit poids moléculaire (β 2-microglobuline, chaînes légères d'immunoglobuline) et des hormones polypeptidiques (insuline, glucagon, parathormone, calcitonine, hormone de croissance),
- ◆ Interconversion métabolique (néoglucogenèse, métabolisme lipidique),
- ◆ Synthèse de facteurs de croissance (IGF1 ; EGF).

2.1) Rôle de filtration : homéostasie hydrique

L'homéostasie hydrique est permise par la filtration glomérulaire (FG) et les modifications tubulaires. Chez l'humain, 20% du plasma est filtré ce qui représente 120 ml par minute soit 180 l par jour. Les 20% du débit plasmatique rénal traversent la membrane du capillaire glomérulaire pour former le filtrat glomérulaire (appelé aussi urine primitive). Le filtrat glomérulaire est un ultrafiltrat du plasma, très pauvre en protéines (entre 10 et 20 mg/l contre 60 à 70 g/l dans le plasma). Les substances dissoutes non ionisées comme par exemple l'urée et le glucose traversent librement le filtre glomérulaire et sont donc en concentrations identiques dans l'urine primitive et dans le plasma. Les substances ionisées, cations et anions, traversent librement le filtre glomérulaire et leur différence de concentration n'est due qu'à l'équilibre de Gibbs-Donnan. La filtration glomérulaire sépare l'eau plasmatique et ses constituants non protéiques des cellules sanguines et des protéines à haut poids moléculaires.

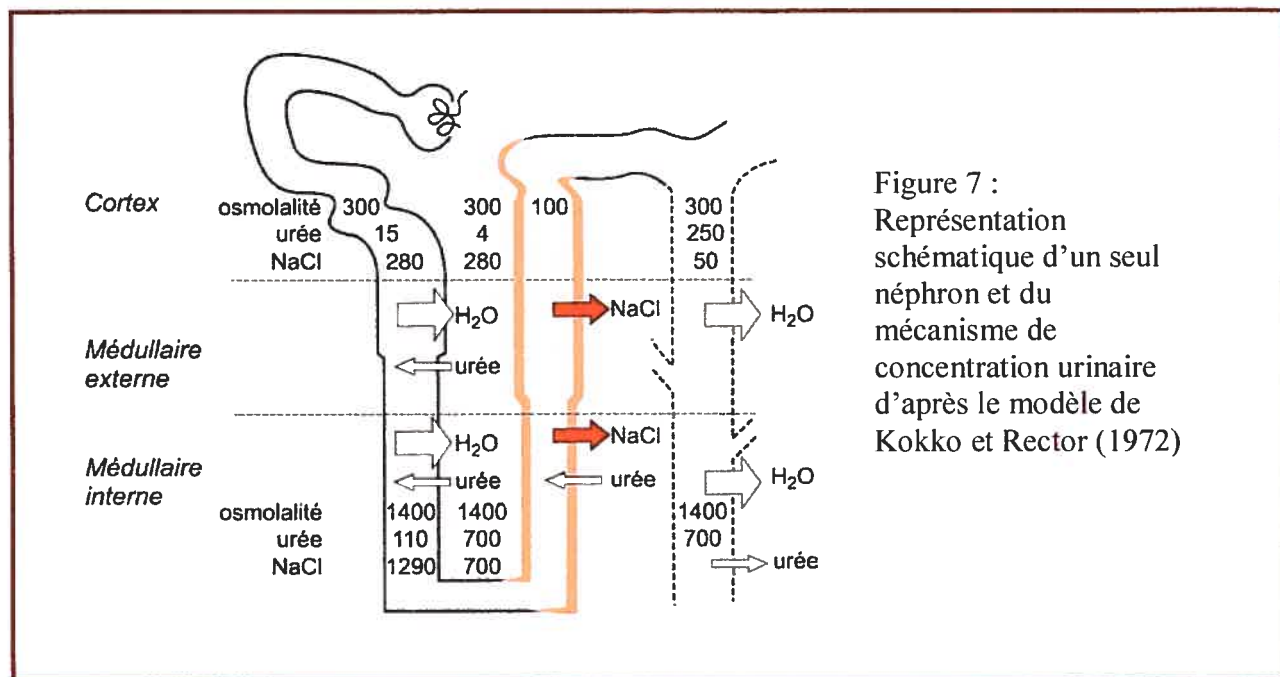
La nature de la barrière glomérulaire aux macromolécules est bien connue. Deux facteurs interviennent : la taille et la charge électrique de la macromolécule.

Ensuite, cet ultrafiltrat est acheminé dans le conduit rénal où l'eau et les solutés sont réabsorbés depuis la lumière tubulaire. Les modifications tubulaires sont de deux types : la réabsorption et la sécrétion.

2.2) Régulation du milieu intérieur

Chez un sujet normal, le milieu intérieur dans lequel baignent les cellules, a une composition constante. Les électrolytes et l'eau apportés par l'alimentation sont absorbés par le tractus digestif et tendent à modifier ce milieu intérieur.

Les reins vont éliminer les surplus (en eau et électrolytes), de façon à maintenir un volume et une composition constante. Les reins maintiennent donc un bilan nul pour l'eau et les substances dissoutes.



L'ultrafiltration du plasma sanguin *via* la membrane glomérulaire délivre au tubule rénal un liquide dont la composition est voisine de celle du plasma. Le rôle du tubule est de séparer les substances nécessaires à l'organisme pour maintenir constante la composition du milieu intérieur des substances qui doivent être éliminées dans les urines (fig. 7).

2.2.1) Le tubule proximal

Les principales fonctions de transport du tubule proximal sont au nombre de cinq.

La première fonction est la réabsorption d'eau et des électrolytes filtrés par le glomérule comme le sodium, le potassium, le chlore, le bicarbonate, le phosphate, le calcium, le magnésium mais aussi des substances organiques telles que les acides aminés, le glucose, les anions organiques du cycle de Krebs, etc.

Le tubule proximal permet aussi l'endocytose de la petite quantité de protéines qui a traversé la membrane glomérulaire.

Le tubule proximal a également pour rôle de favoriser l'élimination finale de produits de dégradation du métabolisme comme l'urée et l'acide urique ou en les sécrétant (anions et cations organiques endogènes).

Une autre fonction est de synthétiser et de sécréter de l'ammonium qui est la principale forme d'excrétion des acides produits par le métabolisme.

Le tubule proximal sécrète des substances exogènes comme les toxines et les médicaments introduits dans l'organisme.

Le tubule proximal est directement suivi de l'anse de Henle qui à son tour assure des rôles dans la régulation du milieu intérieur.

2.2.2) L'anse de Henle

L'anse de Henle est comme nous l'avons vu précédemment, composée d'une branche descendante et une branche ascendante. En réabsorption nette, les anses de Henle sont le siège d'une forte réabsorption (exprimée en pourcentage de la quantité filtrée) : eau 15%, sodium 30%, potassium 25%, calcium 30%, magnésium 70%, chlore 30%, bicarbonate 15% et NH_4^+ plus de 50%.

Les branches descendantes sont très perméables à l'eau (due à la présence des aquaporines 1, canaux membranaires perméables à l'eau), modérément perméable à l'urée et très peu perméables aux autres solutés.

Les branches ascendantes fines et larges sont imperméables à l'eau. C'est à ce niveau que se fait la réabsorption des solutés comme le chlore, sodium, etc., soit par transport actif (grâce au co-transporteur $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ dans les branches ascendantes larges par exemple) soit par réabsorption passive (entre autres pour le chlorure de potassium dans les branches ascendantes fines).

L'urine primitive sort de l'anse de Henle pour aller vers le tubule distal qui permet aussi la régulation du milieu intérieur.

2.2.3) Le tubule distal

Le tubule distal est un segment hétérogène, il est composé par le tubule contourné distal (qui permet la réabsorption active du sodium et du calcium) et par le tubule connecteur et le collecteur initial. Ces deux dernières parties comprennent des cellules principales permettant la

réabsorption du sodium, de cellules intercalaires spécialisées dans la sécrétion soit d'ions H^+ soit d' HCO_3^- .

2.2.4) Le canal collecteur

Le canal collecteur est un segment aussi hétérogène. Dans sa partie corticale, sa fonction est identique à celle du tubule collecteur initial. Au niveau de la partie médullaire externe, il y a sécrétion active de protons mais les échanges actifs de sodium et potassium diminuent pour faire place à des échanges passifs. Dans la partie initiale médullaire interne, l'hormone antidiurétique (HAD) a une action maximale permettant ainsi une réabsorption d'eau et une concentration de l'urée. Les cellules du collecteur de la médullaire interne terminent le processus de réabsorption de Na^+ et d'acidification de l'urine dont le pH peut baisser jusqu'à une valeur de 5.

2.3) Système de drainage de l'urine

La réabsorption hydrique tubulaire est un processus passif car l'eau provenant de l'ultrafiltrat suit le gradient de concentration osmolaire existant entre la lumière du conduit rénal et le milieu interstitiel. Ce gradient est permis par un mécanisme de contre courant qui est généré par : l'anse de Henle et les vasa recta. L'anse de Henle est impliquée dans la réabsorption passive de l'eau. L'urine primaire acheminée dans le système tubulaire est hypertonique lorsqu'elle atteint la branche ascendante de l'anse de Henle. Comme on l'a vu précédemment, la branche descendante est perméable à l'eau et la partie ascendante mince de l'anse de Henle est imperméable à l'eau mais elle est perméable aux ions ; ce qui rend l'urine isotonique puis

hypotonique. Au niveau des tubules distaux, l'urine a une composition hypotonique qui sera modifiée au niveau des tubules collecteurs par une réabsorption hydrique *via* les aquaporines 2 grâce à l'action de l'hormone antidiurétique, l'HAD. (Voir Chap. 2)

2.3.1) Système de contre courant

L'urine n'est pas concentrée par un mécanisme de transport actif de l'eau de la lumière tubulaire jusqu'au sang. Un tel système représenterait une dépense énergétique très importante. L'urine est alors concentrée grâce à des interactions complexes entre l'anse de Henle, le milieu interstitiel médullaire, la vascularisation médullaire (vasa recta) et les tubules collecteurs (Morello, 2001). Afin d'augmenter l'osmolarité urinaire, le mécanisme employé est celui du contre courant. Il repose sur l'existence d'un gradient de concentration entre la lumière tubulaire et le milieu interstitiel médullaire (fig. 7).

L'osmolarité du milieu interstitiel augmente progressivement du tubule proximal jusqu'à la région médullaire du système tubulaire rénal où sont disposés l'anse de Henle et les tubules collecteurs. L'osmolarité du liquide interstitiel passe de 280 à 1200-1400 mOsm/l. Ce gradient est conservé par un échange réglé d'eau et de solutés. Trois phénomènes sont responsables de l'instauration de ce gradient de concentration. Le premier est le transport secondairement actif du sodium, du potassium et du chlore *via* un co-transporteur au niveau de l'anse de Henle. Le deuxième facteur est le transport secondairement actif d'ions de la lumière du tubule collecteur vers le milieu interstitiel non relié à l'anse de Henle, et enfin, la réabsorption de l'urée au niveau des tubules collecteurs.

L'anse de Henle est le segment principal impliqué dans le gradient de concentration. Comme nous l'avons vu précédemment, la partie descendante est responsable de la réabsorption d'eau alors que la partie ascendante mince est impliquée dans la réabsorption du chlorure de sodium mais aussi dans le mécanisme de recyclage de l'urée. Le tubule ascendant large permet la réabsorption active de sodium, de potassium, de chlore mais aussi d'autres ions. Le processus de contre courant est alors possible. La figure 7 permet alors de suivre ce processus. Le filtrat urinaire à sa sortie du tubule proximal a une osmolarité avoisinant les 300 mOsm/l. Ce filtrat isotonique transite alors dans le segment descendant de l'anse de Henle perméable à l'eau. L'urine primaire est alors concentrée à 1200-1400 mOsm/L. Le segment ascendant fin est très légèrement impliqué dans la concentration urinaire alors que le segment ascendant épais est principalement responsable de la dilution observée grâce à son imperméabilité hydrique et au transporteur $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$. L'urine primaire est alors diluée pour atteindre une osmolarité de 100 mOsm/l. La concentration du milieu interstitiel est le facteur principal permettant la réabsorption d'eau par appel osmotique bien que la perméabilité tubulaire détienne un rôle dans la réabsorption d'eau et d'ions.

Le tubule collecteur permet la régulation fine de la réabsorption de l'eau dans l'organisme. Lors d'une élévation de la pression osmotique du milieu intérieur ou d'une réduction du volume du sang circulant, l'HAD, hormone peptidique, est sécrétée et elle peut alors se lier à son récepteur V2 situé sur les cellules principales des tubules collecteurs de la médullaire interne. Cette interaction entraîne une cascade de réactions intracellulaires qui aboutit à l'expression de canaux perméables à l'eau, l'AQP2, à la membrane apicale des cellules principales du tubule collecteur. En plus de réguler les canaux à eau, l'HAD intervient dans le

transport de l'urée *via* son action indirecte sur les transporteurs de l'urée (UTA1) ainsi que sur la perméabilité sodique des cellules principales du tubule collecteur.

En absence de l'hormone antidiurétique (HAD), les perméabilités membranaires à l'eau, à l'urée et au sodium seraient très faibles. Une diurèse importante et des urines hypotoniques résultent de ces faibles valeurs de perméabilité. En présence d'HAD, la diurèse diminue et l'urine est plus concentrée.

2.3.2) Les vasa recta

Le système vasculaire périrubulaire est hautement perméable à l'eau et aux solutés non protéiques. Lors de l'acheminement du sang vers la médulla interne, il devient progressivement plus concentré. Cette hypertonicité est due à la perte d'eau mais aussi à l'entrée de soluté dans le milieu interstitiel par diffusion passive. La concentration retrouvée dans les vasa recta est donc similaire à la concentration du milieu interstitiel médullaire (120 mOsm/L). Il n'y a pas alors de gradient de concentration car les concentrations osmotiques des capillaires et du milieu interstitiel sont identiques. L'équilibre osmotique entre la lumière tubulaire et le milieu interstitiel permet aux vasa recta de réabsorber les mêmes quantités de solutés et d'eau que les tubules médullaires rénaux et ainsi maintenir l'hypertonicité du milieu interstitiel médullaire.

2.3.3) Le recyclage de l'urée

Le mécanisme de recyclage de l'urée est impliqué dans l'établissement du gradient de concentration entre la lumière tubulaire et le milieu interstitiel médullaire. L'urée est un des

déchets métaboliques les plus abondants provenant du catabolisme des protéines. Suite à la filtration glomérulaire, 30 à 40 % de l'urée est réabsorbée dans le tubule proximal (fig. 7).

Le mécanisme de recyclage de l'urée est basé sur le fait que l'urée est réabsorbée par diffusion simple et par l'intermédiaire d'un transporteur de la lumière des tubules collecteurs vers le milieu interstitiel médullaire. Lors de l'activation par l'hormone antidiurétique des récepteurs AVPR2 au niveau des cellules du tubule collecteur rénales, la perméabilité à l'urée est augmentée. Cette augmentation est provoquée par l'expression des transporteurs UTA1 à la membrane apicale des cellules principales qui engendrent une augmentation de la réabsorption d'urée. La présence d'urée dans le milieu interstitiel est un des facteurs de maintien d'un gradient de concentration entre la lumière tubulaire rénale (hypotonique) et le milieu interstitiel (hypertonique). Pour compléter la boucle de recyclage, l'urée diffuse aussi passivement du milieu interstitiel vers la lumière de la branche ascendante fine de l'anse de Henle. Ce mécanisme de recyclage permet l'élimination constante de l'urée tout en conservant un milieu interstitiel hyperosmotique (Guyton, 2000).

2.4) Rôle dans l'élimination des déchets

Par la formation de l'urine, les reins débarrassent l'organisme d'une grande partie de ses déchets. Les plus nombreux proviennent du catabolisme des protéines, constituants de base de toutes les cellules. Grâce à des réactions chimiques complexes, dont beaucoup sont effectuées au niveau du foie, ces protéines seront transformées en urée : les reins débarrasseront le sang de l'urée par sa filtration à travers le glomérule et son élimination dans l'urine.

Le rein permet aussi la détoxification et l'élimination des toxines, médicaments et de leurs métabolites.

2.5) Fabrication d'hormones

Le rein représente un véritable organe endocrine capable de synthèse et de sécrétion d'un grand nombre d'hormones et de médiateurs autacoïdes (médiateurs d'action locale).

Le rein produit plusieurs hormones à action spécifique :

- la rénine qui intervient dans la régulation de la tension artérielle,
- l'érythropoïétine (EPO) qui stimule la formation des globules rouges par la moelle osseuse,
- les prostaglandines qui régulent les circulations locales,
- les enzymes qui agissent sur la vitamine D, donc le calcium et les os.

Le rein assure un rôle important dans la régulation endocrine du volume extracellulaire et de la pression artérielle.

La rénine est une hormone exclusivement synthétisée dans le rein. La rénine joue un rôle important dans la régulation de la pression sanguine systémique. Elle est sécrétée par les cellules granuleuses de l'appareil juxtaglomérulaire (la macula densa est sensible à la concentration de NaCl, si cette concentration ou si la pression sanguine diminue il y aura libération de rénine).

Une fois sécrétée par l'appareil juxtaglomérulaire, la rénine diffuse dans le courant sanguin et catalyse l'angiotensinogène (α_2 globuline) sécrétée par le foie en angiotensine I (un décapeptide).

Dans les poumons, une enzyme de conversion supprime deux acides aminés de l'angiotensine I

pour former l'angiotensine II, un puissant vasoconstricteur. L'angiotensine II est responsable de l'augmentation de la pression sanguine via trois mécanismes dont l'ensemble constitue le système rénine-angiotensine-aldostérone:

- action directe sur le tube contourné distal où elle favorise la reprise d'ions sodium et donc d'eau,
- vasoconstriction au niveau des vaisseaux périphériques,
- augmentation de la sécrétion d'aldostérone qui, par la réabsorption de Na^+ (suivie d'eau) au niveau du tube contourné distal, augmente le volume plasmatique donc la pression sanguine (Brewster, 2004).

L'érythropoïétine est une glycoprotéine jouant un rôle important dans la différenciation et la prolifération des globules rouges (érythrocytes) par la moelle osseuse hématogène. Elle est à 85% d'origine rénale et à 15% d'origine hépatique. L'érythropoïétine serait produite par certaines cellules péri-tubulaires spécialisées (fibroblastes interstitiels) en réponse à la baisse de tension en oxygène dans le rein. Les données de la biologie moléculaire indiquent en effet la présence de l'ARNm de l'érythropoïétine dans certaines cellules des tubes corticaux et dans des cellules interstitielles. Le rein assure la synthèse et la libération de l'érythropoïétine. Le rein assure également la régulation hormonale du métabolisme minéral en assurant la formation de calcitriol (1 α -25 dihydroxycholécalférol). Les prostaglandines rénales, notamment PGI₂ et PGE₂ jouent un rôle important dans l'adaptation de la microcirculation rénale en cas d'hypovolémie et dans l'excrétion rénale du sodium. Le système kinine-kallikréine rénal intervient dans l'excrétion du sodium. Le rein assure également la régulation hormonale du métabolisme phosphocalcique en assurant la formation de 1,25 dihydroxycholécalférol. En effet, la transformation de la vitamine D₃ inactive, en 25-OH cholécalférol dans le foie, puis en 1,25 di-hydroxycholécalférol actif

dans le rein, nécessite la présence d'une hydrolase présente exclusivement au niveau des cellules tubulaires proximales.

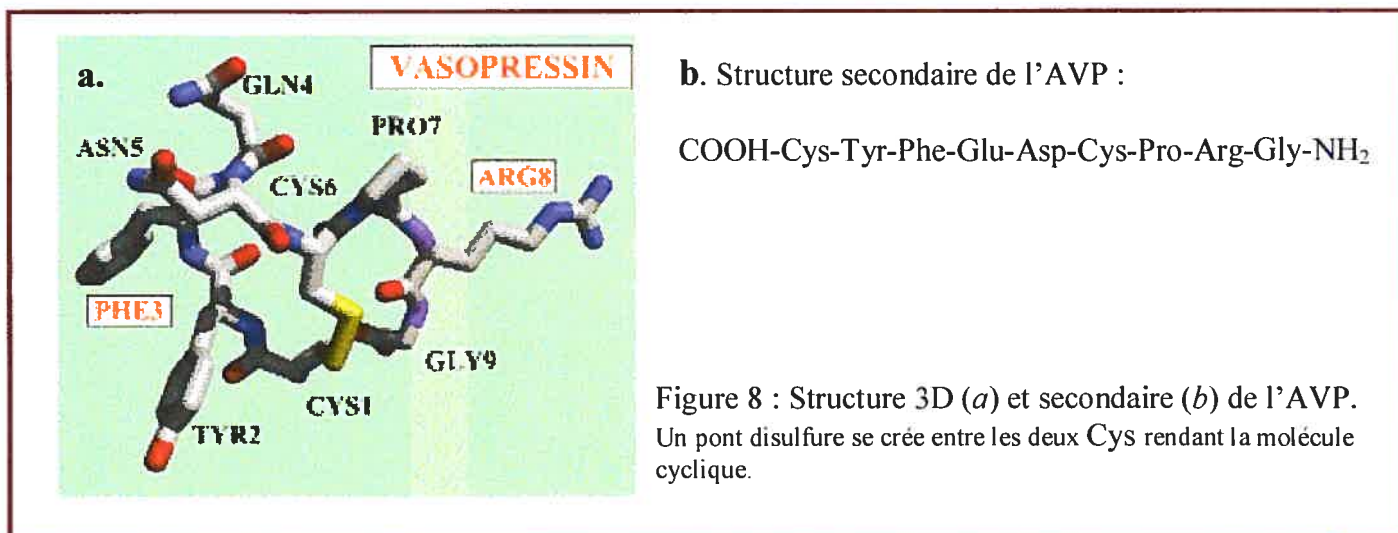
Enfin, le rein intervient dans un certain nombre d'interconversions métaboliques, comme la néoglucogenèse, le métabolisme lipidique ou de l'homocystéine.

3) L'hormone antidiurétique

L'hormone antidiurétique, HAD, appelée aussi L-arginine vasopressine (AVP), ou vasopressine, est un polypeptide synthétisé au niveau de l'hypothalamus, transporté puis stocké dans la post-hypophyse qui le libère dans la circulation sanguine. Elle a une action antidiurétique et une action vasopressive.

3.1) Synthèse

Le gène de AVP-NPII est localisé dans la région chromosomique 20p13 (Rao, 1992), et est composé de trois exons. L'exon 1 code pour le peptide signal, l'AVP et la région amino terminale de la neurophysine II (NPII), l'exon 2 code pour la région centrale de la NPII alors que l'exon 3 code pour la région carboxy terminale de la NPII et le glycopeptide (fig. 9). Après synthèse de la prépro-vasopressine de 164 acides aminés, l'excision du peptide signal et l'addition d'une chaîne d'hydrates de carbone au glycopeptide forment alors la pro-vasopressine. La vasopressine est un polypeptide cyclique formé de neuf acides aminés dont deux molécules de cystéine liées par un pont disulfure. Sa structure ressemble à celle de l'ocytocine.



Ce précurseur est synthétisé au niveau des neurones magnocellulaires de noyaux supra-optique (pour 5/6^{ème}) et para-ventriculaire (pour 1/6^{ème}) de l'hypothalamus. (Richter, 1988 ; Guyton, 2000 ; Mohr, 1995).

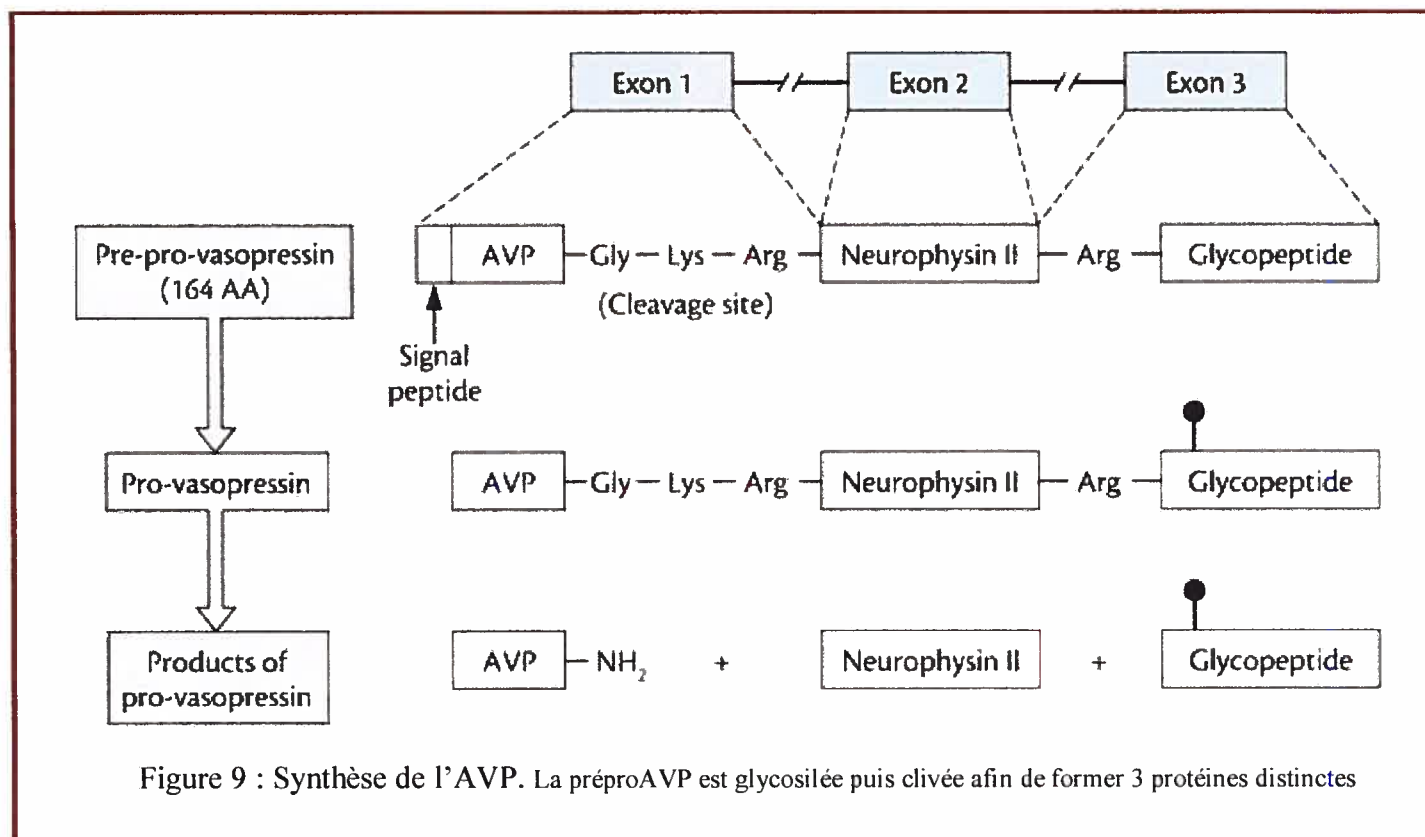


Figure 9 : Synthèse de l'AVP. La préproAVP est glycosylée puis clivée afin de former 3 protéines distinctes

3.2) Sécrétion

Ces noyaux ont des terminaisons axonales s'étendant jusqu'à la neurohypophyse. La prépro-vasopressine est localisée dans des granules neurosécrétrices et transportée le long de ces axones jusqu'aux bourgeons terminaux dans l'hypophyse postérieure. Des modifications post-transcriptionnelles sur la pro-vasopressine se produisent tout au long du transport dans ces granules. Au final, on obtient trois produits : l'AVP, la NPII et le glycopeptide (fig. 10). Le glycopeptide est également connu sous le nom de copeptine dont le rôle n'est pas bien défini, il se pourrait qu'il intervienne dans le repliement de la prohormone (Barat, 2004).

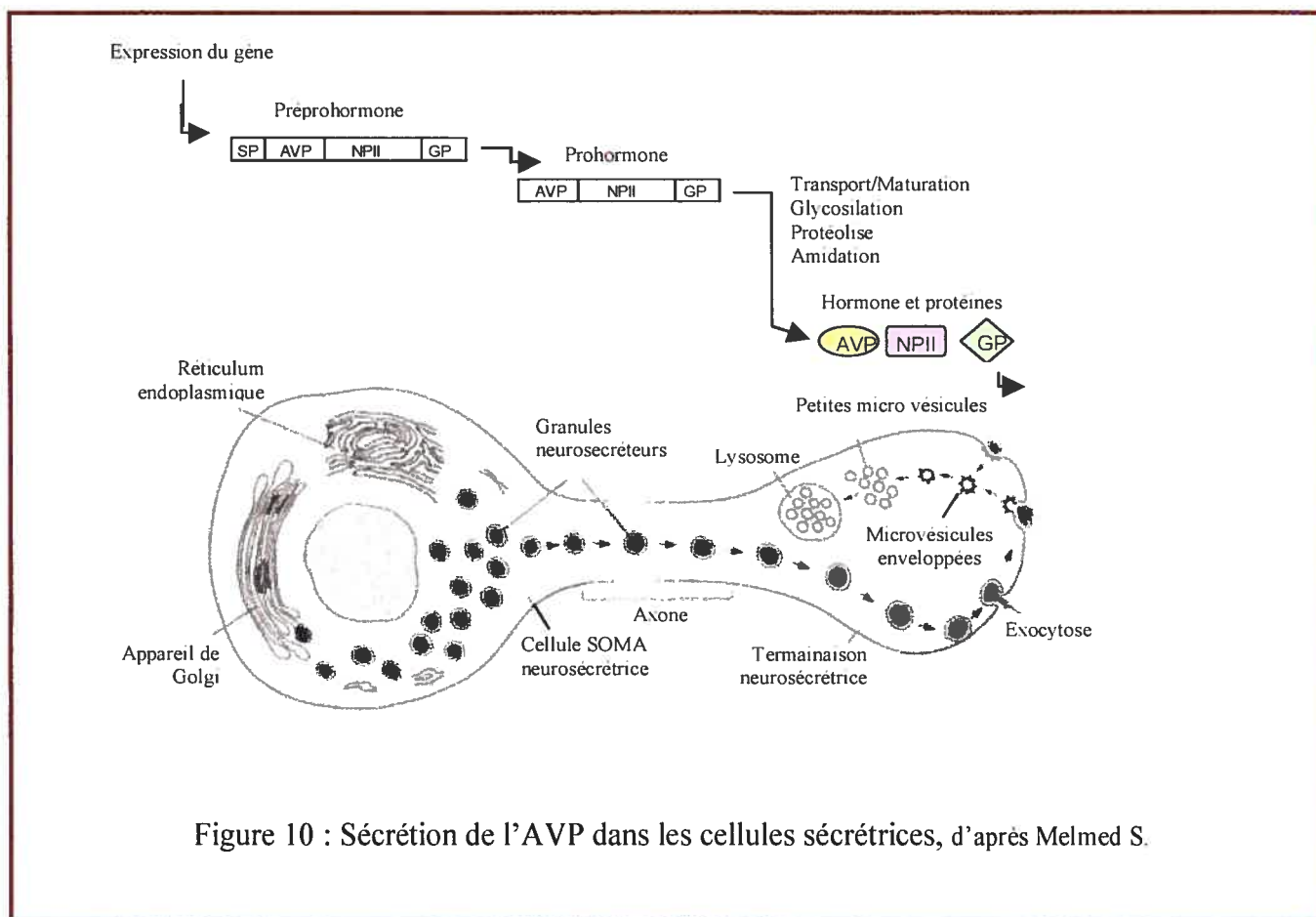


Figure 10 : Sécrétion de l'AVP dans les cellules sécrétrices, d'après Melmed S.

3.3) Régulation de la sécrétion

La libération de l'AVP dépend essentiellement de deux facteurs : l'hyperosmolarité et le volume sanguin (mais aussi de la prise de certains médicaments).

3.3.1) Hyperosmolarité

L'augmentation de l'osmolarité du sang qui irrigue le complexe hypothalamo-hypophysaire déclenche la sécrétion de vasopressine.

3.3.2) Volume sanguin

La diminution du volume des liquides extracellulaires et de la pression artérielle diminue la stimulation des barorécepteurs situés au niveau des oreillettes, des veines pulmonaires, du sinus carotidien, et augmente la sécrétion de vasopressine et inversement. Par ailleurs, l'angiotensine favorise la sécrétion de HAD.

3.4) Catabolisme

La demi-vie plasmatique de l'HAD est de 15 à 30 minutes. Elle est inactivée par des endopeptidases plasmatiques et tissulaires, notamment celles du rein et du foie.

3.5) Les fonctions de l'hormone antidiurétique

L'AVP possède un nombre important de cibles différentes impliquées dans la régulation de l'osmolarité des liquides biologiques, de la concentration cellulaire, du volume sanguin, de l'agrégation plaquettaire, de la prolifération cellulaire et de la sécrétion d'hormone corticotrope (ACTH). Le nom AVP provient du pouvoir vasoconstricteur de l'hormone. Comme nous le verrons ultérieurement (voir Chap.1 4.2), la fixation de l'hormone sur son récepteur à la

vasopressine V1 entraîne un couplage via la protéine G à la phospholipase C. Son activation provoque l'hydrolyse du PIP2 en IP3 et en DAG entraînant l'augmentation de la concentration cellulaire en calcium, ce qui est responsable de la vasoconstriction.

Le nom HAD est dû à son effet antidiurétique au niveau des cellules du tubule collecteur (voir Chap.2) en se fixant sur le récepteur à la vasopressine V2.

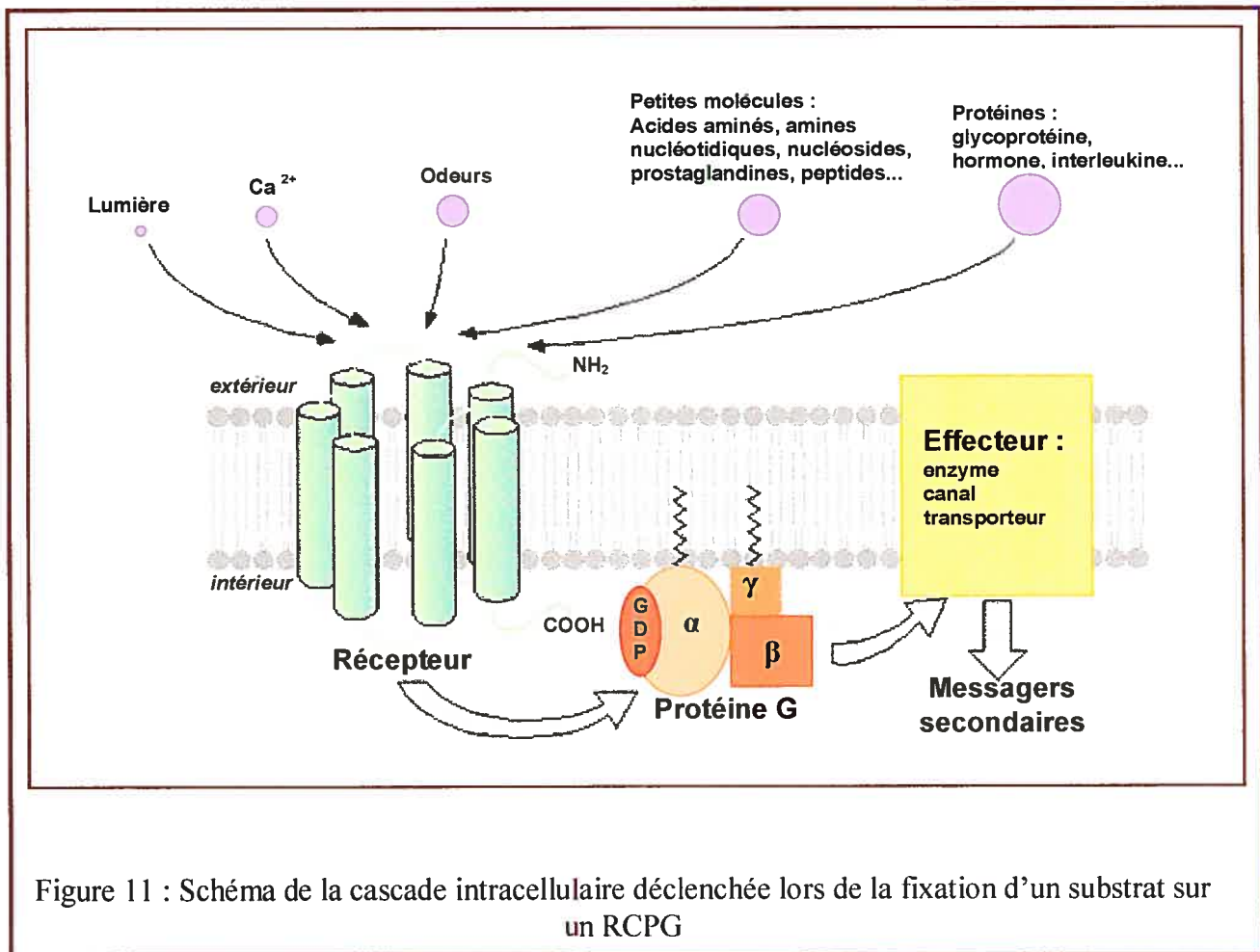
4) Les récepteurs à l'arginine vasopressine

Ces récepteurs font partis de la grande famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) qui réunit à ce jour plus de 2000 récepteurs. La découverte de cette famille à 7 segments transmembranaires est due au clonage de l'opsine bovine en 1983 puis à celui du récepteur β_2 -adrénergique en 1986. L'analyse par comparaison de séquence a pu confirmer l'existence de cette super famille mais a permis de découvrir une multitude de RCPG.

4.1) Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG)

Les RCPG forment la plus grande famille de récepteurs chez l'humain. Il y a plus de 1000 RCPG qui ont été identifiés chez l'humain et près de 800 gènes codant pour des RCPG (Pierce, 2002).

Ces récepteurs appartiennent à un système de transduction complexe qui implique plusieurs partenaires : un récepteur, un transmetteur (les protéines G) et un effecteur (fig. 11).



4.1.1) Description

Tous les RCPG ont une extrémité amino terminale (NH_2) extracellulaire, 7 segments transmembranaires, 3 boucles cytosoliques et une extrémité carboxy terminale intracellulaire. Généralement, le domaine extracellulaire est impliqué dans la liaison avec le ligand alors que le domaine cytoplasmique intervient dans la signalisation intracellulaire.

En comparant leurs séquences d'ADN, les RCPGs furent classifiés en six familles (A-F), trois de ces familles sont présentes chez l'humain (A-C).

La famille A est la plus vaste, elle inclut la rhodopsine, les récepteurs adrénérgiques, les récepteurs à la vasopressine ainsi que beaucoup d'autres. Dans cette famille, on retrouve 20 acides aminés hautement conservés qui sont principalement localisés dans les domaines transmembranaires.

La famille B comprend 25 membres approximativement. Leur caractéristique est la présence d'une longue queue N-terminale (100 résidus) qui contient six résidus cystéines impliqués dans la formation de ponts disulfures. C'est le cas de certains récepteurs d'hormones peptidiques et neuropeptidiques.

En ce qui concerne les membres de la famille C, ces RCPGs possèdent une très longue extrémité N-terminale (500-600 résidus) qui contient 20 résidus cystéines permettant la formation d'un réseau complexe de ponts disulfure. Ils ont aussi une troisième boucle intracellulaire très courte et conservée ainsi qu'une queue C-terminale très longue. On retrouve dans cette famille les récepteurs du glutamate, ceux des phéromones humaines notamment.

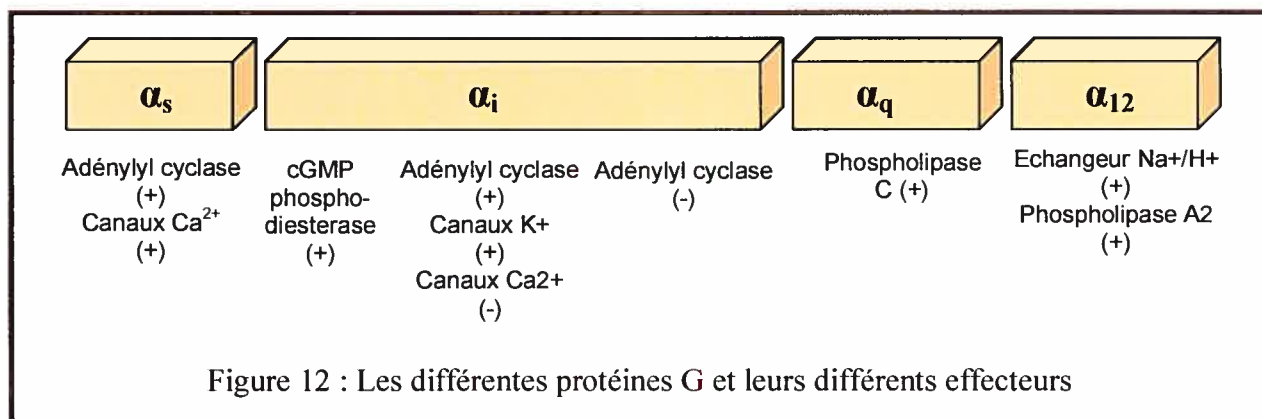
Les familles D et E sont propres aux levures, et la famille F est constituée de 4 récepteurs retrouvés dans le *Dictyostelium discoideum* (Gether, 2000).

4.1.2) Les protéines G

4.1.2.1) Description

Les protéines G sont des membres de la super famille des hydrolases régulatrices de nucléotide guanosine triphosphate (GTP). Elles sont composées de trois sous-unités : α , β et γ . Les protéines G répondent au récepteur activé afin de transmettre le signal aux effecteurs intracellulaires. Les protéines G sont divisées en quatre classes majeures par rapport à la sous-

unité α : G_s qui active l'adénylate cyclase et les canaux Ca^{2+} , G_i pouvant, entre autre, inhiber l'adénylate cyclase, G_q active la phospholipase C et G_{12} qui active la phospholipase A2 et l'échangeur Na^+/H^+ .(fig. 12)



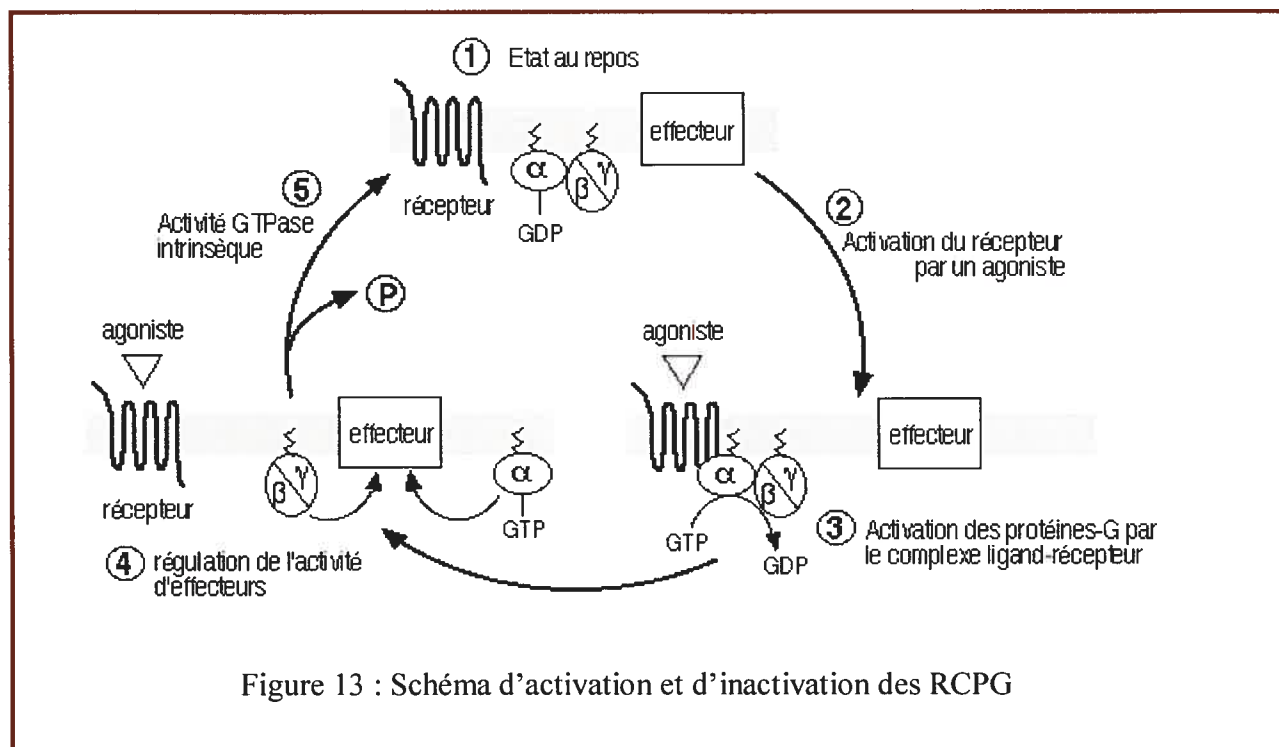
4.1.2.2) Activation des protéines G : le cycle GTP-ase

Les protéines G trimériques jouent un rôle majeur dans la transmission du signal *via* le RCPG.

La protéine G peut être sous une forme active ou inactive.

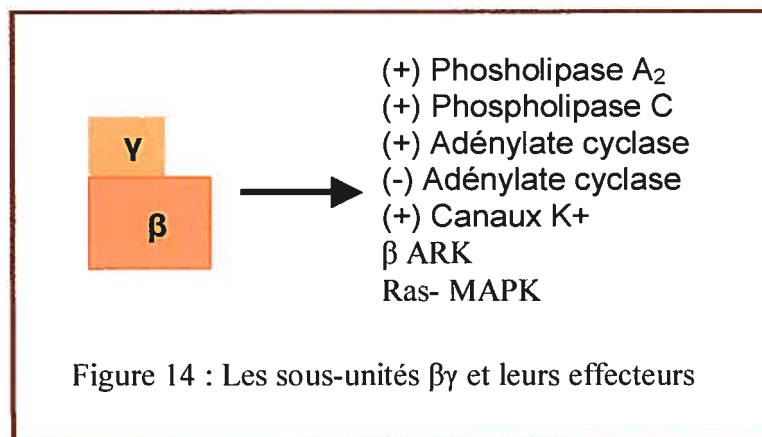
Un RCPG au repos (fig. 13.1) est activé par la liaison d'un agoniste spécifique (fig. 13.2). Le changement de conformation du complexe agoniste-récepteur, induit par cette liaison, permet l'activation de l'échange du GDP par du GTP et donc l'activation de la protéine G hétérotrimérique (sous-unités G_α et $G_{\beta/\gamma}$) intracellulaire, permettant la dissociation de la sous-unité α de la sous-unité $\beta\gamma$ (fig. 13.3), qui vont aller réguler l'activité de divers effecteurs (fig. 13.4) membranaires ou cytosoliques. Le déclenchement de l'activité phosphatase, intrinsèque à la sous-unité G_α entraîne la réassociation des sous-unités G_α et $G_{\beta/\gamma}$ (5) et le retour à l'état initial (fig. 13.1).

Tant que le récepteur est activé par son ligand, et tant que le système ne subit pas une désensibilisation, le cycle d'échange du GDP par du GTP continue.



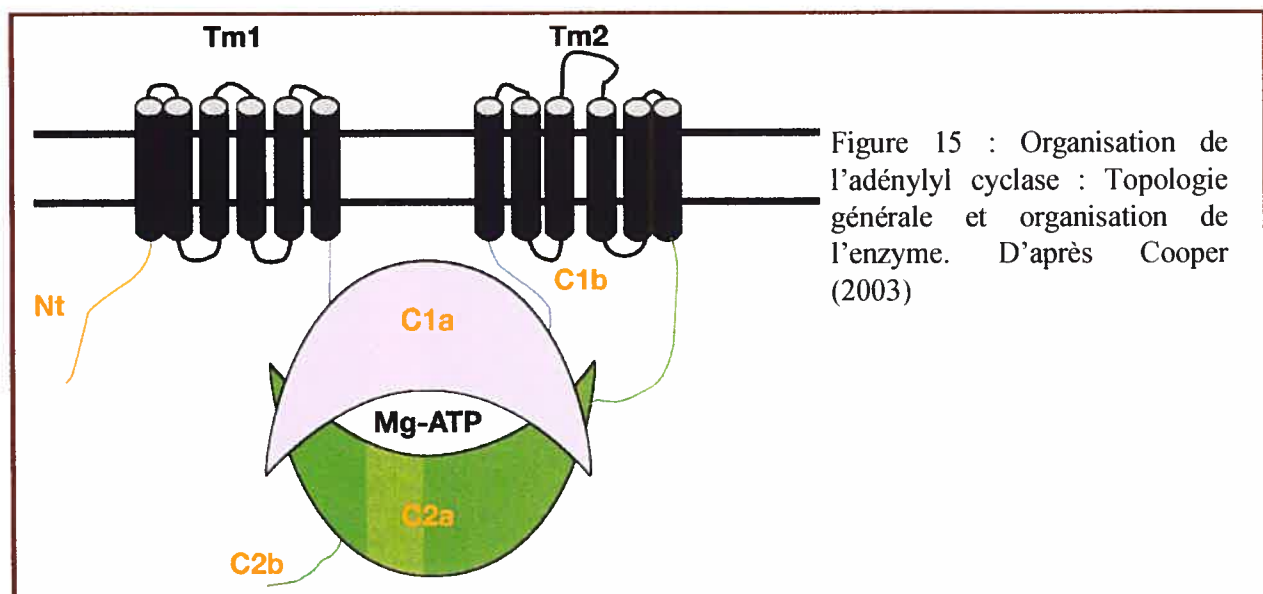
4.1.2.3) La sous-unité $\beta\gamma$

Il a pu être mis en évidence que le dimère $\beta\gamma$ peut lui aussi activer ou inhiber l'activité de certains effecteurs comme certaines adénylates cyclases, des canaux ioniques, ou encore la voie Ras-MAP kinases.



4.1.3) L'adénylate cyclase

Il existe à ce jour neuf isoformes connues de l'adénylate cyclase (AC). Ils partagent tous la même topologie c'est-à-dire 12 hélices α transmembranaires et deux domaines catalytiques cytoplasmiques (fig. 15). C'est une enzyme membranaire qui est activée par les sous-unités de type $G_s\alpha$ et inhibée par celles de type $G_i\alpha$. L'adénylate cyclase catalyse la réaction de formation de l'AMPc, qui est le second messenger produit, à partir d'ATP. Cet AMPc est l'activateur de la protéine kinase A (PKA) qui est capable de phosphoryler, et ainsi de moduler l'activité de nombreux substrats protéiques.



4.2) Les récepteurs de l'hormone antidiurétique

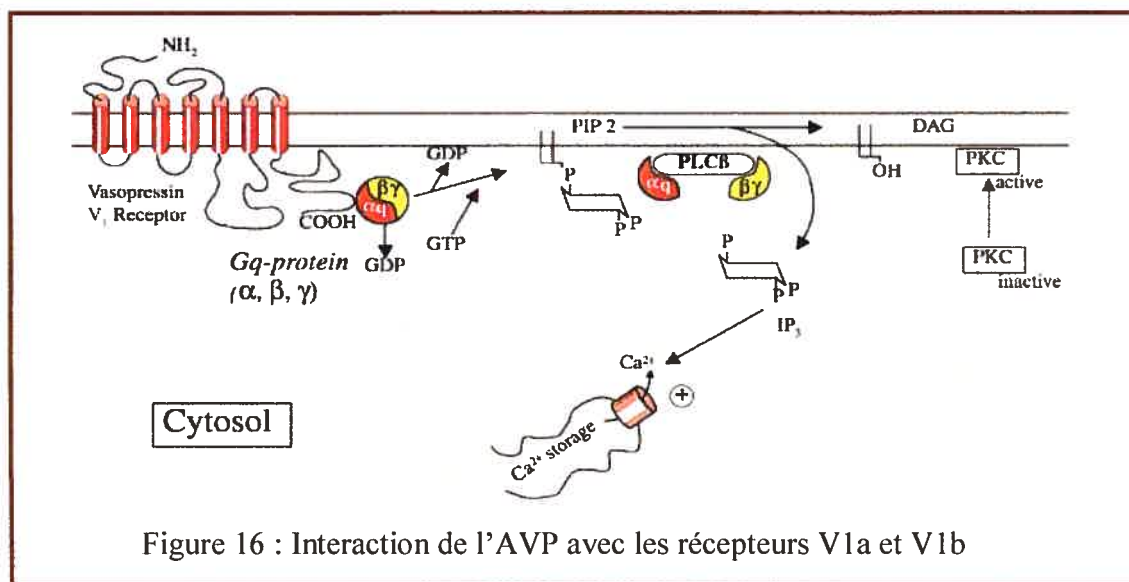
L'AVP intervient au niveau des cellules cibles par l'intermédiaire de récepteurs. Ces récepteurs sont au nombre de trois : V1a (AVPR1a), V1b/V3 (AVPR1b/AVPR3) et V2 (AVPR2). Ces trois

récepteurs sont des RCPG. Les AVPR2 sont couplés aux protéines G_s tandis que les AVPR1a et AVPR1b/AVPR3 sont couplés aux protéines G_i ou G_q .

4.2.1) Les types de récepteurs

Les AVPR1a sont exprimés principalement dans le foie, les cellules musculaires lisses vasculaires et les thrombocytes mais aussi à la surface cellulaire de différents organes tel que les gonades, le cortex surrénalien, le rein, la rate, ... Ce récepteur possède des sites de N-glycosylation sur l'extrémité N-terminale et la deuxième boucle intracellulaire. La liaison de l'AVP au récepteur AVPR1a permet l'activation des phospholipases C, D et A_2 entraînant la production d'inositol 1, d'IP₃ (4,5-triphosphate) et de diacylglycérol (DAG) (fig. 16). La fixation du ligand sur le récepteur active aussi la protéine kinase C, la PI₃-kinase, la P42/p44 MAP kinase...

Les AVPR1b sont retrouvés dans les cellules corticotropes, le rein, le cerveau, le pancréas et la glande surrénale. Ce récepteur possède des sites de N-glycosylation sur l'extrémité N-terminale et la deuxième boucle intracellulaire. La fixation du ligand sur le récepteur entraîne l'activation de la phospholipase C, de la protéine kinase C, et la mobilisation du calcium intracellulaire par l'intermédiaire soit de la protéine G_i ou G_q (fig. 16).

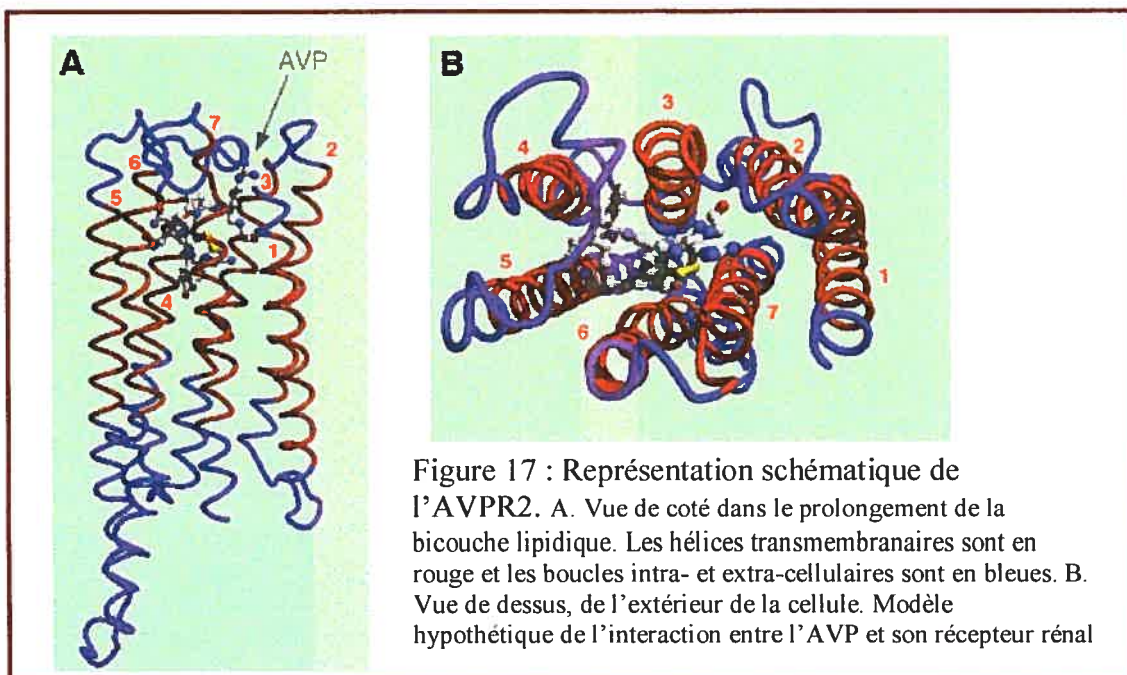


Les récepteurs AVPR2 sont principalement exprimés sur la membrane basolatérale des cellules principales des tubes collecteurs de la médullaire interne du rein. Ils possèdent des sites de N-glycosylation uniquement sur l'extrémité N-terminale. Les AVPR2 sont responsables de l'effet antidiurétique dû à la fixation de l'AVP. La cascade intracellulaire qui découle de l'interaction AVP-AVPR2 entraîne l'expression des AQP2 à la surface luminale des cellules principales du tubule collecteur. Le principal effecteur dans cette cascade intracellulaire est l'adénylate cyclase qui permet la formation d'AMPc.

4.2.2) L'AVPR2

4.2.2.1) Topologie

Comme nous l'avons vu précédemment, l'AVPR2, protéine de 371 acides aminés, contient un site de glycosylation dans le domaine N-terminal, mais aussi un pont disulfure entre deux cystéines très conservées dans la deuxième et troisième boucles extracellulaires et deux sites de palmitoylation dans la queue C-terminale (fig. 17).



4.2.2.2) La dimérisation des récepteurs AVPR2

Certains RCPGs ont besoin d'être sous la forme de dimères pour être fonctionnels. D'autres, comme les récepteurs opioïdes forment des hétérodimères afin d'augmenter leur fonctionnalité. Cela s'appelle la dimérisation fonctionnelle et la dimérisation modulateur, respectivement. L'homodimérisation des AVPR2 a été rapportée par Hébert (1996) suite à des études d'électrophorèse.

4.2.2.3) Cascades intracellulaires

La fixation de l'AVP sur son récepteur AVPR2 entraîne une modification conformationnelle de ce dernier et permet l'activation des protéines G. La protéine G qui est couplée à l'AVPR2 est la protéine G stimulatrice (G_s) de la sous-unité α . Ce changement de conformation de l'AVPR2 permet son interaction avec la protéine G hétérotrimérique. L'interaction déclenche l'échange du GDP par le GTP ce qui provoque la dissociation de la protéine G en deux sous-unités actives : α et $\beta\gamma$. La libération de la sous-unité α permet l'activation des sous-unités catalytiques de l'adénylate cyclase. Dans le reins de mammifères, quatre isoformes de l'adénylate cyclase sont présentes (AC4, AC5, AC6 et AC9) qui sont rattachées fonctionnellement à l'AVPR2. L'AC peut alors débiter l'hydrolyse de l'ATP en AMPc. L'AMPc génère alors deux types de régulation *via* la cascade intracellulaire. La régulation à court terme permet la cascade intracellulaire qui permet la fusion des AQP2 vésiculaires à la membrane apicale des cellules du tubule collecteur. La régulation à long terme consiste en la diffusion intranucléaire passive des sous-unités catalytiques de la protéine kinase A (PKA). Dans le noyau, ces sous-unités de la PKA phosphorylent les protéines CREB (cAMP response

element binding protein) et c-Jun/c-Fos (Nielsen, 1999). Ces deux éléments, se liant au gène *AQP2*, entraînent la transcription de ce gène (Marples, 1999). Les protéines sont alors traduites et entreposées dans des agrégophores jusqu'à la prochaine stimulation.

La cascade intracellulaire *via* l'AVPR2 régule aussi les canaux UT1. Ils possèdent aussi une régulation en deux temps. A court terme, les UT1 sont phosphorylés par la PKA et sont ainsi exprimés à la membrane apicale des cellules principales du tubule collecteur (Tsukaguchi, 1998 ; Star 1988). La régulation à long terme n'est pas entièrement connue mais nous pouvons nous appuyer sur les concepts de phosphorylation d'éléments nucléaires par la PKA. Il se pourrait que la régulation transcriptionnelle des UT1 soit gouvernée par des protéines CREB et des éléments régulateurs de transcription, comme pour les AQP2. (Shayakul, 2000).

Les canaux apicaux perméables au sodium (ENAC) des cellules principales de la médullaire rénale sont comme les canaux UT1 et les AQP2 localisés dans des vésicules intracellulaires. L'étude de l'expression membranaire des ENAC a démontré que ces canaux sont régulés par la cascade intracellulaire générée par l'AVP et par les glucocorticoïdes (Schild, 2004).

4.2.2.4) La désensibilisation du récepteur AVPR2

Il existe quatre grands mécanismes permettant l'arrêt du signal apporté par le stimulus extracellulaire qui sont :

4.2.2.4.a) La régulation de la concentration en agoniste

Lorsque le ligand est relargué dans une fente synaptique, deux mécanismes entraînent une diminution de la concentration synaptique en agoniste : il s'agit de la re-capture présynaptique et

de la dégradation de l'agoniste par des enzymes spécifiques (exemple : acétylcholine et acétylcholinestérase) (fig. 18, a)

4.2.2.4.b) Le découplage fonctionnel par phosphorylation

L'activation d'un RCPG active les protéines G intracellulaires. Ce couplage est peu à peu inhibé, car on assiste à une phosphorylation de la région intracellulaire du récepteur qui est responsable de l'activation des protéines G. Les enzymes responsables de cette phosphorylation sont des GRK (G-protein coupled receptor kinases). Le récepteur phosphorylé est reconnu par des protéines de type arrestine qui se lient au récepteur et le rendent incapable d'activer l'échange GDP-GTP au niveau des protéines G (fig. 18, b).

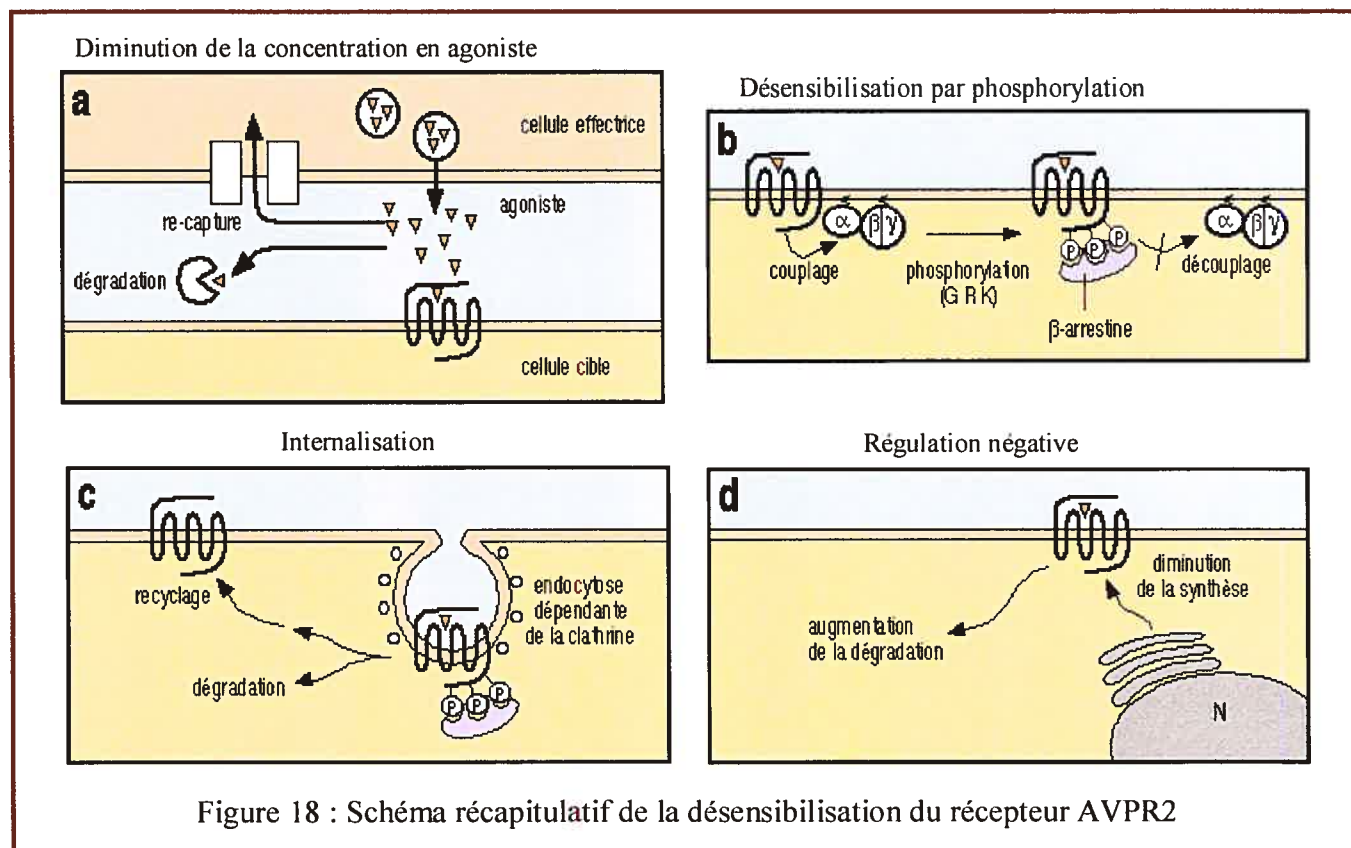
4.2.2.4.c) L'internalisation du complexe ligand-récepteur

Les mécanismes de phosphorylation des RCPGs et de liaison de l'arrestine sont suivis par une internalisation du complexe ligand-récepteur phosphorylé, à l'intérieur de vésicules recouvertes de clathrine. Les récepteurs ainsi endocytés peuvent alors soit subir un recyclage à la membrane plasmique (ce qui nécessite une déphosphorylation du récepteur et une élimination du ligand), soit subir une dégradation, avec la fusion des vésicules d'endocytose avec les lysosomes (fig. 18, c).

4.2.2.4.d) La régulation négative du nombre total de récepteurs à la surface cellulaire

Lors d'une exposition longue, chronique ou encore à un ligand agoniste, on peut observer une diminution du nombre total de récepteurs à la surface cellulaire. Deux phénomènes sont

impliqués dans la régulation négative : une diminution de la synthèse de récepteurs et une augmentation de sa dégradation (fig. 18, d).



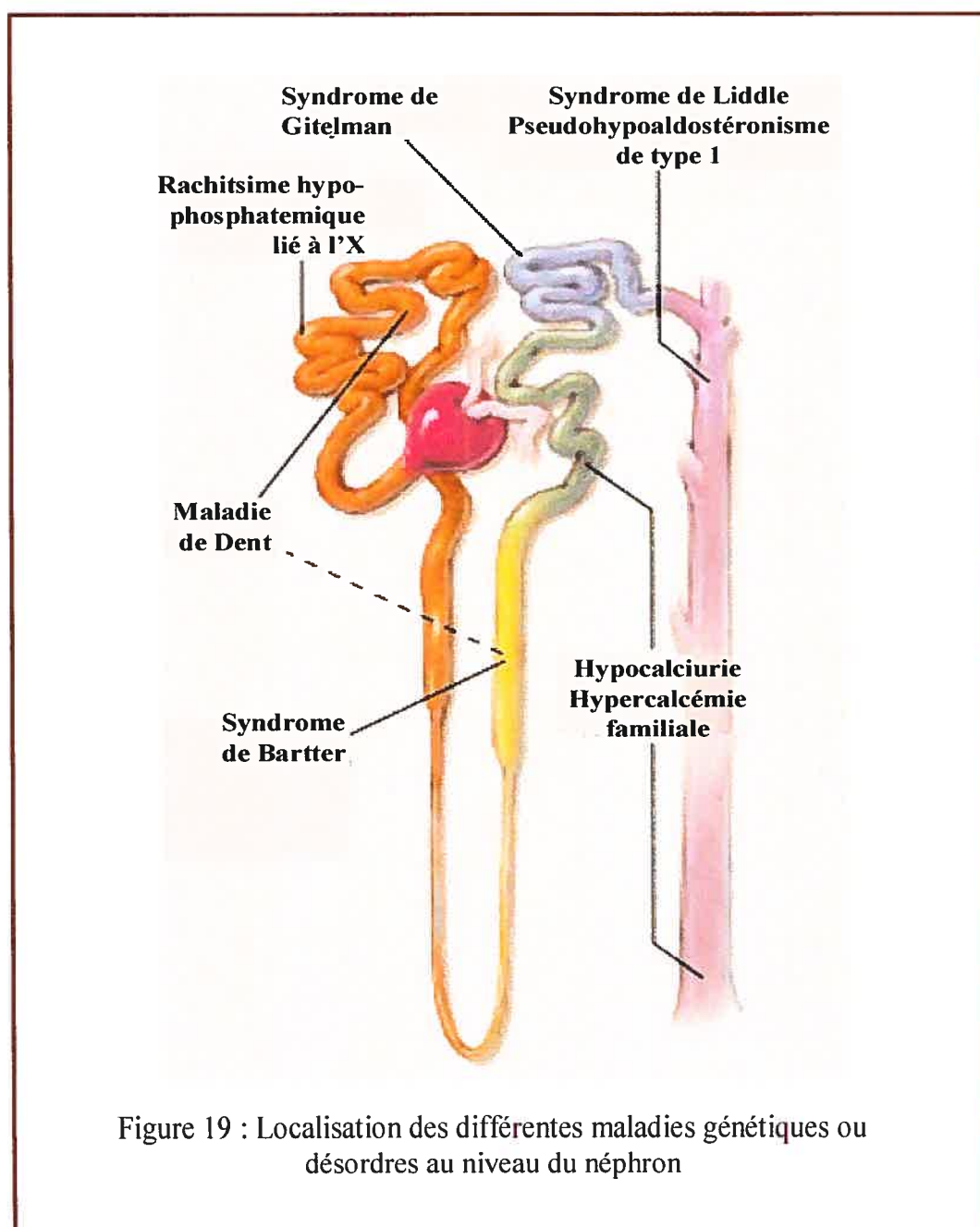
5) Les maladies génétiques rénales

De nombreuses anomalies tubulaires rénales d'origine génétique ont été décrites ces dernières décennies mais c'est seulement depuis quelques années que, grâce aux progrès de la biologie moléculaire, ces maladies rénales ont pu être rattachées à des mutations survenant sur des protéines intervenant spécifiquement dans le transport tubulaire (fig. 19).

Dans un premier temps, nous nous limiterons aux anomalies tubulaires d'origine génétique affectant le transport des cations : sodium et calcium. Il faut savoir qu'il existe des anomalies dans le transport du bicarbonate, des protons, du potassium, du chlore et du phosphate.

Puis nous parlerons des anomalies dans le transport de l'eau qui entraînent des diabètes insipides.

5.1) Désordre génétique du transport tubulaire



5.1.1) Mutation affectant les protéines de transport du sodium (Na) sensibles aux diurétiques

5.1.1.1) Syndrome de Gitelman

Le syndrome de Gitelman est une pathologie de transmission autosomique récessive et les individus atteints sont des homozygotes composites (double hétérozygote). Cette maladie est caractérisée par une alcalose hypokaliémique associée à une importante hypomagnésémie et à une hypocalciurie. Ce syndrome se déclare, en général, après l'âge de 6 ans. Des mutations du gène *SLC12A3*, (membre 3 de la famille 12 des transports de solutés) sont à l'origine du syndrome de Gitelman. Le gène *SLC12A3* code pour une protéine NCCT dont la fonction est de co-transporter le NaCl dans le tubule contourné distal. Actuellement, plus de 100 mutations différentes réparties sur l'ensemble de la protéine ont été rapportées. Ces mutations entraînent une inactivation de la protéine. Une mutation sur NCCT est responsable de la perte du transport vectoriel de sodium dans le tube contourné distal.

Ainsi, le fonctionnement défectueux du co-transporteur inhibe la réabsorption du chlorure de sodium à travers la membrane apicale dans le tube contourné distal, provoquant une augmentation du débit délivré de chlorure de sodium au canal collecteur, et une hypovolémie modérée avec activation du système rénine-angiotensine et alcalose hypokaliémique. (Knoers, 2003)

5.1.1.2) Syndrome de Bartter

Le syndrome de Bartter proprement dit est cliniquement différent du syndrome de Gitelman. Le syndrome de Bartter est une pathologie héréditaire de transmission autosomique récessive. Sur le plan génétique, les individus affectés par le syndrome de Bartter classique sont presque toujours des homozygotes vrais avec la même mutation sur les deux gènes, traduisant le plus souvent une consanguinité. Les patients présentent habituellement des symptômes tôt dans l'enfance (certains patients adultes atteints du syndrome de Bartter type 3 peuvent même vivre avec très peu, voire aucune des manifestations) ; ils présentent, en général, un retard de croissance et une taille définitive inférieure à la norme. La prévalence du gène muté dans la population générale semble beaucoup plus rare que celle du gène responsable du Gitelman.

Le syndrome de Bartter associe alcalose hypokaliémique et hypercalciurie, résultant du dysfonctionnement des reins. Ces derniers sont alors dans l'incapacité de réguler de manière satisfaisante le volume et la composition des liquides corporels, suite à une anomalie de la réabsorption de NaCl au niveau de l'anse de Henle.

Actuellement, au moins quatre gènes ont été reliés à la maladie et sont à l'origine de quatre types de syndrome de Bartter.

Le syndrome de Bartter néonatal provient de mutations sur le gène codant pour NKCC2, protéine dont la fonction est le co-transport NaK₂Cl assurant le transport vectoriel du sodium dans la branche ascendante large de l'anse de Henle (fig. 20).

Par contre, des mutations inactivatrices ont été retrouvées sur au moins deux gènes codant pour deux autres transporteurs intervenant dans la réabsorption du sodium au niveau de l'anse de Henle (fig. 20). Il s'agit du gène codant pour ROMK, le canal potassique apical intervenant dans le recyclage du potassium et du gène codant pour CICNKB un canal chlore basolatéral de la cellule tubulaire de la branche ascendante large de l'anse de Henle.

Les mutations inactivatrices sur ces trois transporteurs sont responsables de phénotypes à peu près similaires avec un syndrome de Bartter classique sévère et d'expression néonatale.

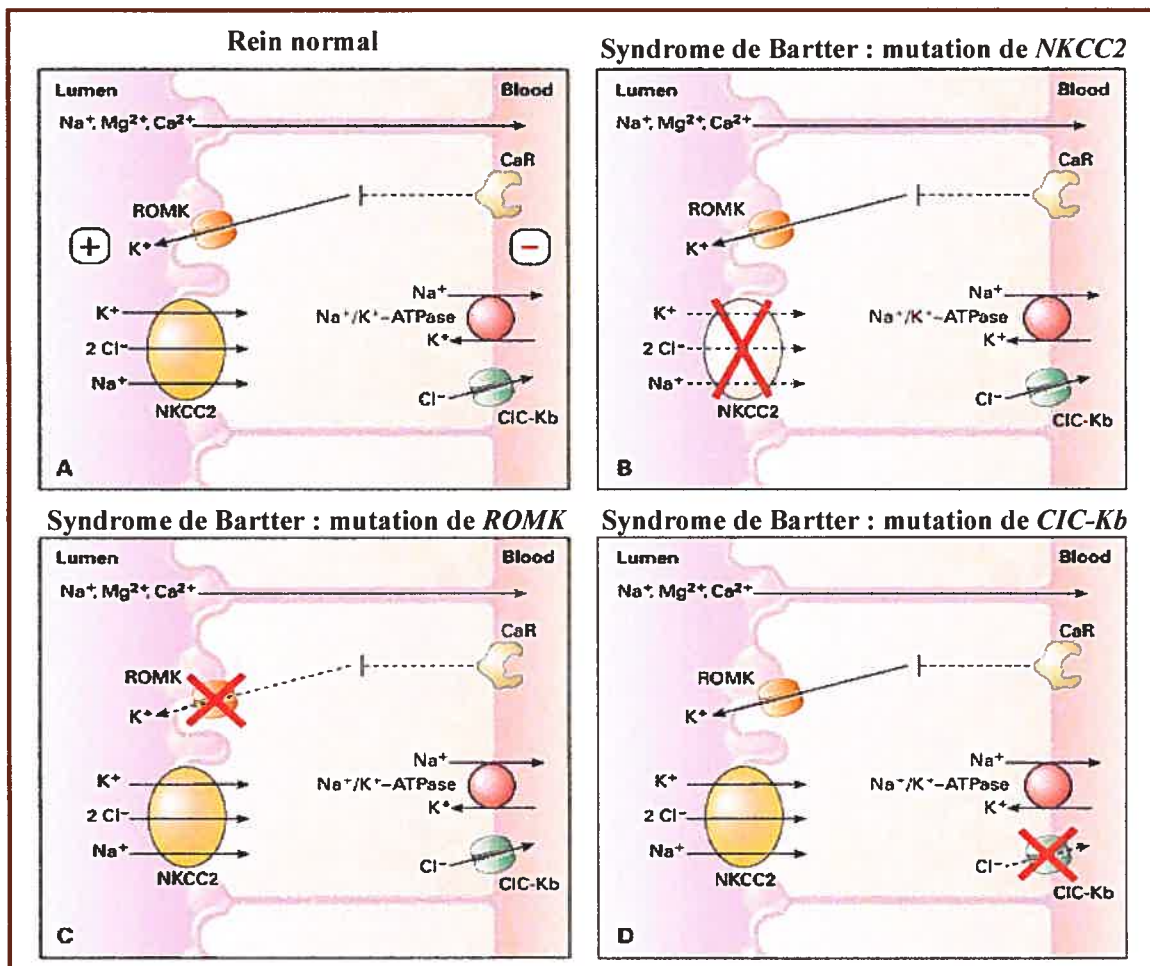


Figure 20 : Les différents syndromes de Bartter

5.1.1.3) Le mécanisme de l'hypokaliémie

Le mécanisme de l'hypokaliémie, commun à ces anomalies génétiques (syndrome de Bartter, de Gitelman mais aussi syndrome de Liddle), se situe en regard de la cellule principale du tube collecteur cortical. Toutes ces hypokaliémies ont en commun un mécanisme faisant intervenir une augmentation de la sécrétion tubulaire apicale de potassium en échange de la réabsorption de sodium à ce niveau. Le facteur majorant l'excrétion tubulaire de potassium est l'hyperpolarisation

de la membrane apicale résultant de l'augmentation de l'électronégativité luminale et traduisant soit une hyperactivité minéralocorticoïde soit une augmentation du débit luminal de sodium dans le tube collecteur cortical, soit enfin une réabsorption augmentée de sodium. L'ensemble de ces mécanismes diversement associés est nécessaire pour majorer l'excrétion tubulaire de potassium et générer une hypokaliémie.

5.1.2) Mutation affectant le canal sodium épithélial

5.1.2.1) Syndrome de Liddle

Le syndrome de Liddle découvert en 1963 est un désordre génétique autosomique dominant caractérisé par une hypertension avec baisse du taux de potassium plasmatique et de rénine ainsi qu'une suppression de la sécrétion de l'aldostérone.

Cette maladie est due à un gain de fonction du canal sodium épithélial (ENaC) du tubule rénal. Ce canal est localisé dans la membrane apicale des épithéliums impliqués dans la réabsorption du sodium notamment le tubule rénal, le colon descendant, l'arbre trachéo-bronchique et les glandes sudoripares. Le syndrome de Liddle découle d'une mutation au niveau du gène *ENaC*. La protéine ENaC est composée d'au moins 3 sous-unités (α , β , γ). Les mutations responsables de la maladie sont toutes situées sur la partie C-terminale des sous-unités β , γ dont les gènes sont situés en 16p13-p12. La plupart des mutations aboutissent à l'introduction d'un codon stop ou à un décalage du cadre de lecture, générant une chaîne tronquée à son extrémité C-terminale. Les autres sont des mutations ponctuelles situées au niveau d'un motif proline-tyrosine (PY) C-terminal, hautement conservé à travers les espèces. Ce motif est responsable de la liaison de ENaC avec une protéine, Nedd4, qui joue un rôle critique dans l'endocytose et la dégradation du canal. Dans le syndrome de Liddle, l'absence ou la non-fonctionnalité du motif PY rend impossible la liaison de Nedd4 à la sous-unité mutée. La présence des canaux de la membrane

plasmique de façon constitutive est responsable de la réabsorption sodée excessive à l'origine de l'hypertension artérielle (Jeunemaitre, 2002 ; Schild, 2004).

5.1.2.2) Pseudohypoaldostéronisme de type 1

Cette anomalie originale de mutation activatrice constitutionnelle du canal ENaC a fait suggérer qu'une perte de fonction de ce même canal pourrait avoir des conséquences cliniques spécifiques. Des mutations inactivatrices ont été identifiées et sont responsables d'un syndrome clinique identifié depuis longtemps comme le pseudohypoaldostéronisme de type 1 (fig. 21). Cette affection rare qui se transmet sur un mode autosomique récessif est responsable d'un tableau néonatal sévère avec perte de sel, hypovolémie (baisse du volume sanguin total circulant), hypotension, hyperactivation marquée du système rénine-angiotensine, acidose métabolique hyperkaliémique et des infections pulmonaires récurrentes simulant une mucoviscidose. Cette affection est liée à une mutation inactivatrice du canal sodique épithélial, la mutation pouvant survenir sur la chaîne α , β , ou γ de ce canal. Cette mutation est responsable d'une diminution de la probabilité d'ouverture du canal ENaC, d'une résistance généralisée à l'action de l'aldostérone et d'un déficit permanent atteignant tous les organes cibles de l'aldostérone (reins, côlon, glandes salivaires ainsi que les poumons) (Scheiman, 1999).

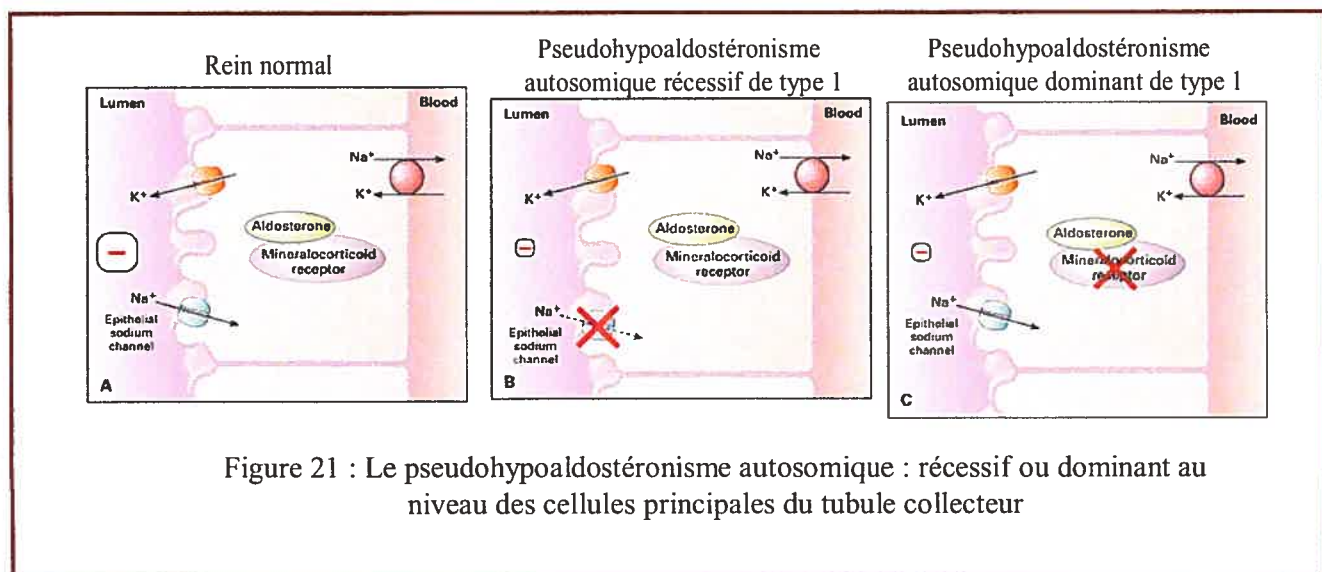


Figure 21 : Le pseudohypoaldostéronisme autosomique : récessif ou dominant au niveau des cellules principales du tubule collecteur

5.1.3) Mutation affectant le canal au chlore : syndrome de Fanconi

Le syndrome de Fanconi est une maladie héréditaire très rare, liée à l'X, révélée dans l'enfance ou à l'âge adulte par une protéinurie tubulaire : par défaut de réabsorption tubulaire proximale de certaines protéines de faible poids moléculaire filtrées par le glomérule, comme la bêta-2 microglobuline. Le défaut moléculaire concerne un canal au chlore, CICN5.

5.2) Le diabète insipide

Les diabètes insipides (DI) sont définis physio-pathologiquement par l'impossibilité de concentrer maximalelement les urines et cliniquement par une polyurie. La diurèse est anormalement élevée (>30mL/kg/jour pour un patient adulte) et de faible osmolarité (<250mmol/kg). Les DI peuvent être central (DIC) ou néphrogénique (DIN).

Le DIC survient lors d'une perte de fonction ou une altération de l'hormone antidiurétique suite à une mutation dans le gène codant pour la préprohormone *AVP-NPII-GP* ou lors d'un traumatisme.

Les DIN peuvent être héréditaire ou secondaire à l'hypercalcémie, l'hypokaliémie ou l'administration de lithium. Les DIN héréditaires peuvent être purs, ce qui veut dire purement aquarétiques, ou complexes quand la diurèse s'accompagne de perturbations de l'excrétion d'autres électrolytes (calcium, potassium). Les DIN purs sont secondaires soit à la perte de fonction du récepteur V2 de la vasopressine (AVPR2) soit à la perte de fonction du canal à l'eau dépendant de la vasopressine, l'aquaporine 2 (AQP2). Les DIN héréditaires complexes sont observés dans les syndromes de Bartter anténataux.

Le diabète insipide peut également être secondaire à une polydipsie primaire (diabète insipide dipsogénique) et/ou psychologique.

Il existe aussi une forme de diabète insipide temporaire qui est associé à la gestation, on parle alors de diabète insipide gestationnel.

5.2.1) Les types de diabète insipide

Le diabète insipide central est un désordre métabolique résultant d'une production ou d'une sécrétion insuffisante de l'hormone antidiurétique (AVP). Comme nous l'avons vu précédemment, le DIC est un désordre métabolique pouvant être héréditaire ou acquis. La forme héréditaire est causée par des mutations autosomiques dominantes ou récessives du gène de la vasopressine (20p13). La forme acquise du DIC peut être générée par des tumeurs cérébrales, des traumatismes crâniens, ou encore des maladies auto-immunes. Toutes les formes de DI sont traitables grâce à l'administration de dDAVP.

Le DI dipsogénique est un désordre métabolique causé principalement par une perturbation du centre de régulation de la soif dans l'hypothalamus. Le seul traitement existant est une augmentation de l'apport hydrique quotidien.

Le diabète insipide psychogénique est un dérèglement du centre de la soif de nature psychologique, survenant le plus fréquemment après des épisodes traumatiques. Tout comme le DI dipsogénique, le traitement résulte en une régulation de l'apport en eau à l'organisme.

Le DI gestationnel est causé par un métabolisme accru de l'AVP par les enzymes placentaires entraînant une importante diurèse chez la mère. Ce dérèglement peut être compensé par augmentation de la prise d'eau ou encore par une administration de dDAVP qui n'est pas hydrolysé par les aminopeptidases placentaires.

5.2.2) Le diabète insipide néphrogénique

Deux définitions du DIN peuvent être données : une première restreinte et l'autre élargie. La définition restreinte présente le fait que la perméabilité à l'eau du canal collecteur rénal n'est pas

augmentée par la vasopressine. La définition élargie définit le DIN comme l'impossibilité d'établir un gradient corticomédullaire rénal. Le DIN est un état pathologique pouvant être héréditaire ou acquis (Bichet, 2003).

La forme acquise est souvent secondaire à un traitement au lithium (Marple 1995, Timmer RT 1999), à une hypokaliémie (Frokiær 1996) ou à une obstruction de l'uretère (Marple, 1996). Ces désordres sont tous associés à une baisse de l'expression des AQP2 dans les modèles de rats étudiés. Les mécanismes responsables sont peu connus.

Les malades atteints de diabète insipide néphrogénique héréditaire excrètent de grandes quantités d'urine diluée. Les tubules collecteurs rénaux sont résistants à l'action de l'hormone antidiurétique (arginine-vasopressine, AVP) et le mécanisme de concentration des urines est atteint. Dans 90 % des cas, la maladie, liée à l' X, est due à des mutations du gène du récepteur de l'arginine-vasopressine qui affectent la première étape de la transmission du signal aboutissant au transport de l'eau. Dans 10% des cas, la maladie est liée à des mutations du gène de l' aquaporine II impliqué dans la dernière étape du transport de l'eau. Cette maladie, de découverte récente, est autosomique récessive : les garçons et les filles sont atteints de manière égale. Le diagnostic précoce est fondamental car il permet, malgré l'absence actuelle de tout traitement, d'éviter les épisodes de déshydratation qui peuvent entraîner un déficit intellectuel irréversible.

5.2.2.1) Le DIN héréditaire lié au chromosome X

En 1992, avec la collaboration du Dr Mariel Birnbaumer, le Dr Bichet a été le premier au monde à découvrir chez deux familles ayant le diabète insipide néphrogénique les mutations causant la maladie dans le gène du récepteur V2 de la vasopressine. Depuis, il a étudié avec ses collaborateurs plus de cent familles provenant des États-Unis et d'Europe, ce qui a permis de déceler chez ces familles les femmes porteuses de la maladie et de détecter très tôt les enfants qui

en étaient atteints. Les mutations du gène de l'AVPR2 causent souvent une perte de fonction ou une séquestration et engendrent la dégradation prématurée des AVPR2 (Bichet, 1998). Les sujets atteints sont dans l'incapacité de concentrer les urines suite à une administration d'AVP (Bichet, 1992). Cette maladie représente 90 % des DIN purs et les 10% restant correspondent aux DIN autosomal.

Les mâles portant un gène *AVPR2* muté ont un phénotype caractérisé par des périodes infantiles de déshydratation pouvant être sévère occasionnant des baisses de pression importantes qui entraînent une mauvaise oxygénation du système nerveux central, des reins mais aussi d'autres organes. Le retard mental et physique ainsi que l'insuffisance rénale sont les conséquences d'un diagnostic tardif et d'un traitement inadéquat (Bichet, 1998).

L'estimation épidémiologique du nombre de patient souffrant de DIN lié au chromosome X est de 8,8 par million de naissance mâle dans la province de Québec (Arthus, 2000). A ce jour, plus de 180 mutations au niveau du gène de l'AVPR2 entraînant un DIN ont été rapportées dans plus de 239 familles. Les mutations peuvent être des mutations faux sens (50%) ou non sens (11%), de larges délétions (5%), des changements de cadre de lecture (27%), des délétions et insertions en phase (4%), des changements du site d'épissage (2%) ou encore une mutation complexe. Les mutations du gène de l'*AVPR2* sont classées en trois catégories. La catégorie 1 correspond aux récepteurs mutants exprimés à la membrane basolatérale qui possèdent une faible affinité pour son ligand. Les mutants de type 2 ont un transport intracellulaire défectueux. La catégorie 3 correspond aux récepteurs mal transcrits.

5.2.2.2) Le DIN héréditaire autosomique

Des phénotypes de mâles et de femelles atteints de DIN non lié au chromosome X et des études de perfusion de dDAVP ont permis de caractériser une nouvelle forme de DIN (Deen, 1995). Les

mutations sur le gène de l'*AQP2* furent décrites comme étant la cause du DIN autosomique. (Deen, 1995). A ce jour, plus de 33 mutations de l'*AQP2* ont été recensées de part le monde. Les mutations peuvent être de différents types : faux sens (65%), changement du cadre de lecture (23%), non-sens (8%) et changement du site d'épissage (4%) (Morello, 2001). Les mutations récessives entraînant un DIN autosomique récessif sont localisées sur toute la longueur du gène ; par contre, les mutations dominantes se retrouvent pour la majorité au niveau C-terminal de la protéine, ce qui correspond à la fin du gène de l'*AQP2*. Au niveau cellulaire, ces protéines mutantes présentent des traffics intracellulaires différents. Les mutations récessives engendrent souvent un mauvais repliement de la protéine qui se traduit par un adressage inapproprié de la protéine, le plus souvent la protéine se retrouve au niveau du RE (Marr, 2002). D'autres mutations peuvent générer des mutants qui seront localisés au niveau de l'appareil de Golgi (Kamsteeg, 1999). Des mutations du gène de l'*AQP2* sont dites dominantes négatives car lors de l'expression de cette protéine mutante avec une protéine sauvage, la première va s'hétérotétramériser avec la forme sauvage et la retenir à l'intérieur de la cellule (Kamsteeg, 1999). Un autre phénomène remarquable est l'aptitude conférée à certaines mutations capables d'interagir avec la protéine sauvage dans le but de l'emmener à la membrane basolatérale au lieu de la membrane apicale dans des cellules polarisées (Kamsteeg, 2003).

Chapitre 2 :
L'aquaporine 2

1) Les canaux à eau : aquaporine

Les aquaporines (AQPs) sont des membres de la famille ubiquiste de protéines canaux nommées suite à l'identification du premier membre, la protéine majeure des cellules des lentilles fibreuses (MIP). Les protéines MIP (major intrinsic protein) constituent une famille de canaux comptant plus de 150 membres caractérisés dans les membranes cellulaires de tous les organismes vivants (des bactéries aux humains). Les aquaporines sont des canaux à eau capable de faire passer $3 \cdot 10^9$ molécules d'eau par seconde et par monomère.

1.1) Découverte et historique

Chez les humains, 60 à 70 % du poids du corps est de l'eau qui a besoin d'être équilibrée de part et d'autre des membranes lipidiques dans les membranes biologiques. En 1991, Agre et ses collègues ont découvert la présence de canaux ayant une forte perméabilité à l'eau dans les membranes d'érythrocytes (Preston, 1992). Ils étudiaient les antigènes du sang contre les cellules Rh lorsqu'un polypeptide de 28 kD a contaminé leurs expériences dont le but était de purifier les polypeptides Rh. La protéine fut alors appelée CHIP28 (channel-like integral protein of 28kD) mais sa fonction était inconnue. En octobre 1991, la protéine est exprimée dans des ovocytes de *Xenopus laevis* et le comportement de l'ovocyte est analysé au microscope lorsqu'il est placé dans un tampon hypotonique. Les ovocytes contrôles ne sont pas affectés alors que les ovocytes injectés avec l'ARNm de CHIP28 montrent une haute perméabilité à l'eau. Ils ont alors appelé cette protéine AQP1. A ce jour, 10 AQPs ont été identifiées chez les mammifères et plus de 200 membres de cette famille ont été trouvés chez les plantes, les microbes, les invertébrés et les vertébrés (Schrier, 2003). Elles ont été nommées AQP0 à AQP9.

1.2) Les différentes aquaporines

1.2.1) Fonctions des différentes AQP

Suite à plusieurs études d'analyse de séquence, de comparaisons phylogénétiques et de perméabilité, les AQP ont été subdivisées en aquaporines pures et aquaglycéroporines (Agre, 2002) (fig.22). Les AQP 0, 1, 2, 4, 5 et 8 sont des canaux sélectifs à l'eau (aquaporines pures) alors que les AQP 3, 7 et 9 sont des canaux permettant le passage d'eau, de glycérol, d'urée mais aussi de petits électrolytes (aquaglycéroporines). L'aquaporine 6 possède une faible perméabilité à l'eau et a des propriétés physico-chimiques de conductance anionique. Elle jouerait un rôle dans le métabolisme acido-basique (Yasui, 1999). Les aquaglycéroporines sont aussi appelées GFP (Glycerol Facilitator- like Proteins) grâce à leur sélectivité vis-à-vis du glycérol.

Les AQP sont réparties dans les différents types cellulaires de l'organisme (tab.1).

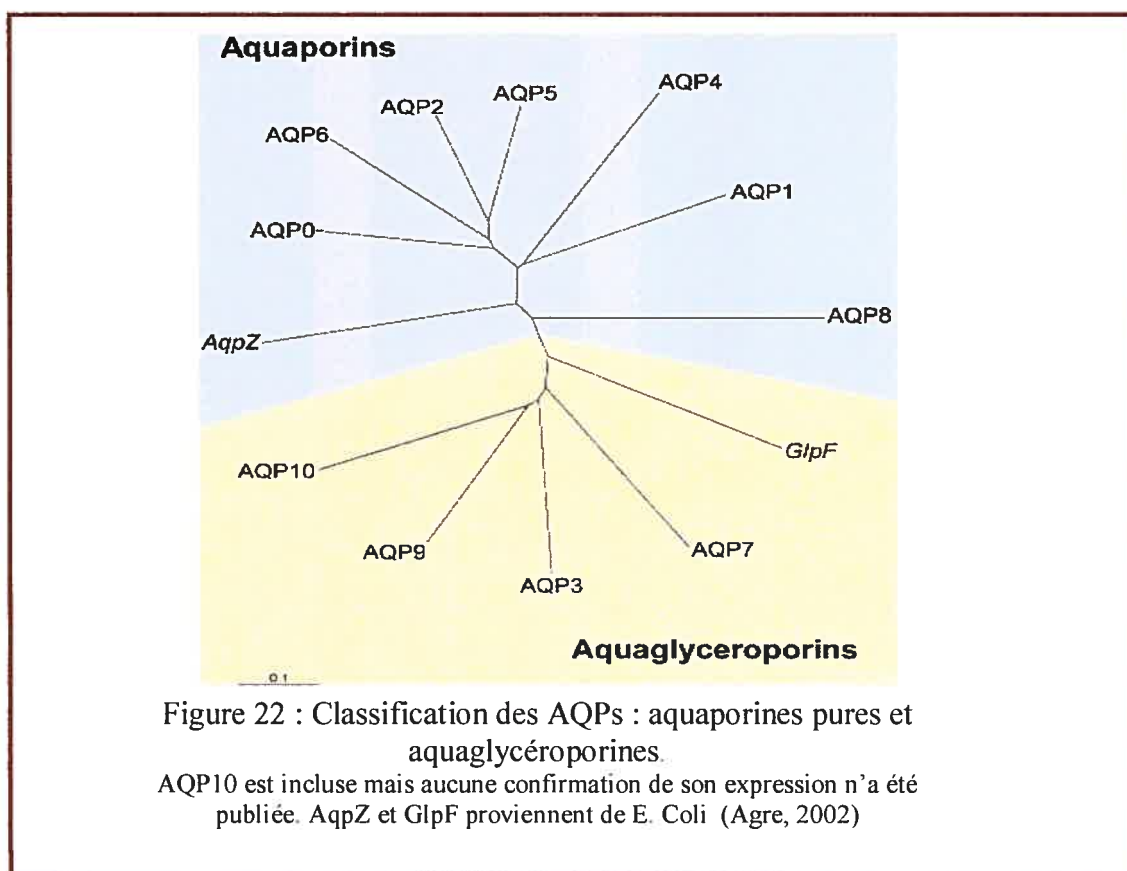


Figure 22 : Classification des AQP : aquaporines pures et aquaglycéroporines.

AQP10 est incluse mais aucune confirmation de son expression n'a été publiée. AqpZ et GlpF proviennent de E. Coli (Agre, 2002)

1.2.2) Localisation des différentes AQPs

Les différentes AQPs sont localisées dans différents organes humains (tab. 1).

Tableau 1 - Distribution des aquaporines selon leur type et selon le tissu

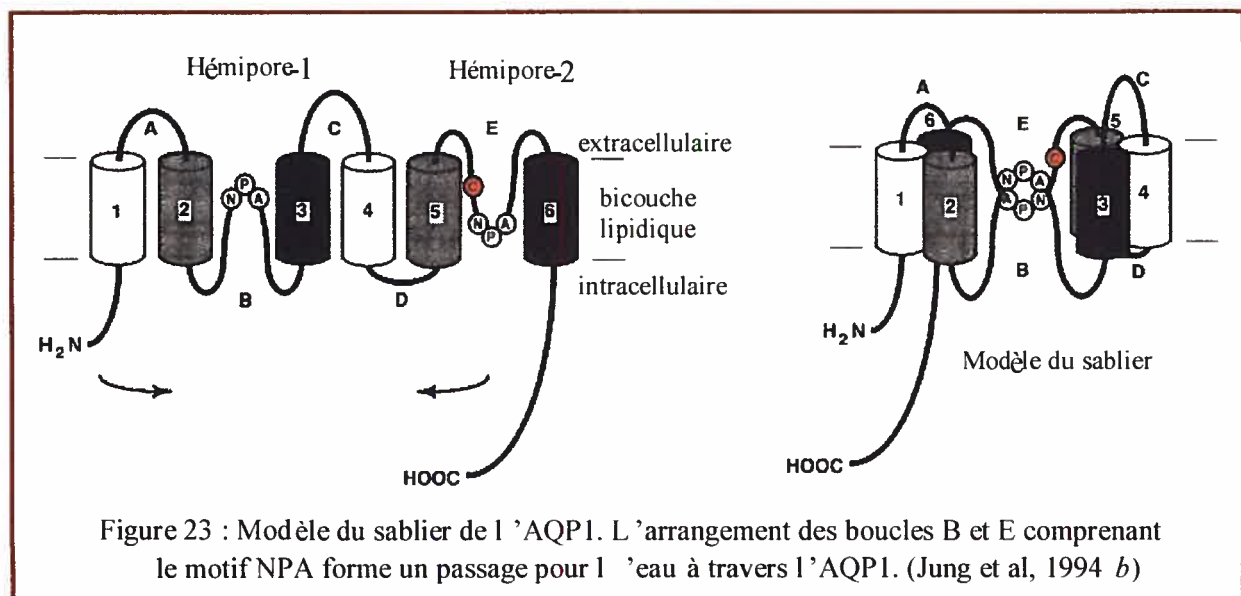
	AQP0	AQP1	AQP2	AQP3	AQP4	AQP5	AQP6	AQP7	AQP8	AQP9
Œil	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
Cerveau	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Rein	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-
Cœur	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
Vaisseaux	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Globule rouge	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
Estomac	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Foie	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+
Poumon	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+
Trachée	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-
Glandes salivaires	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-
Glandes lacrymales	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Muscle squelettique	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Intestin grêle	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Colon	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
Testicules	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Peau	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Placenta	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Plexus Choroïdes	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

L'AQP0 a été isolée dans l'œil en 1976 sans que sa fonction n'ait alors pu être établie. Son rôle consisterait dans le transport de l'eau et le maintien de la transparence du cristallin. L'AQP1 est localisée dans les globules rouges, l'œil, l'encéphale, le rein et les poumons. L'AQP2 est retrouvée principalement dans les cellules principales du tubule collecteur de la médullaire interne rénale. L'AQP3 est présente dans l'épithélium de la trachée, l'estomac, l'encéphale et les cellules du tubule collecteur rénal. L'AQP4 est trouvée dans l'encéphale, les poumons, les glandes salivaires et les cellules du tubule collecteur rénal. Les AQP5 sont présentes uniquement

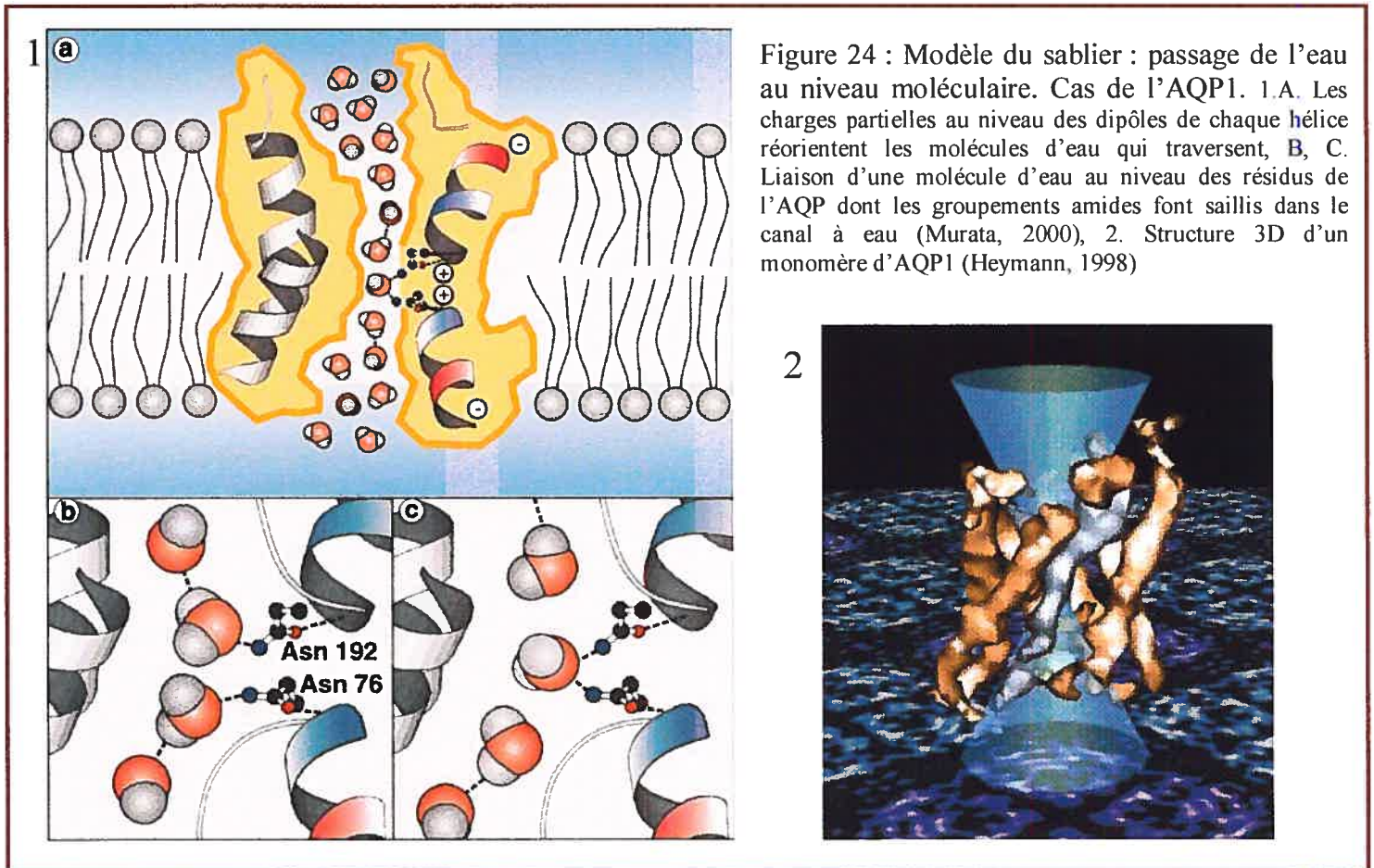
dans les organes sécréteurs comme les glandes salivaires et lacrymales et les AQP6 dans les vésicules intracellulaires des cellules intercalaires des tubes collecteurs rénaux. L'AQP7 a été récemment isolée à partir des testicules ; on la retrouve dans des tissus qui ne sont pas directement impliqués dans l'équilibre hydrique, tels que le cœur, le tissu adipeux ou le cerveau. Dans le rein, l'AQP7 est présente dans la membrane luminale de la dernière partie du tubule proximal. L'AQP8 a aussi été clonée à partir des testicules, et retrouvée dans le pancréas, le foie, le poumon, le placenta et le côlon. Elle est pratiquement absente du rein. L'AQP9 a été mise en évidence dans le foie. (Agre, 1998 ; Agre, 2002 ; Nielsen, 2002 ; Schrier, 2003).

1.3) Structure générale

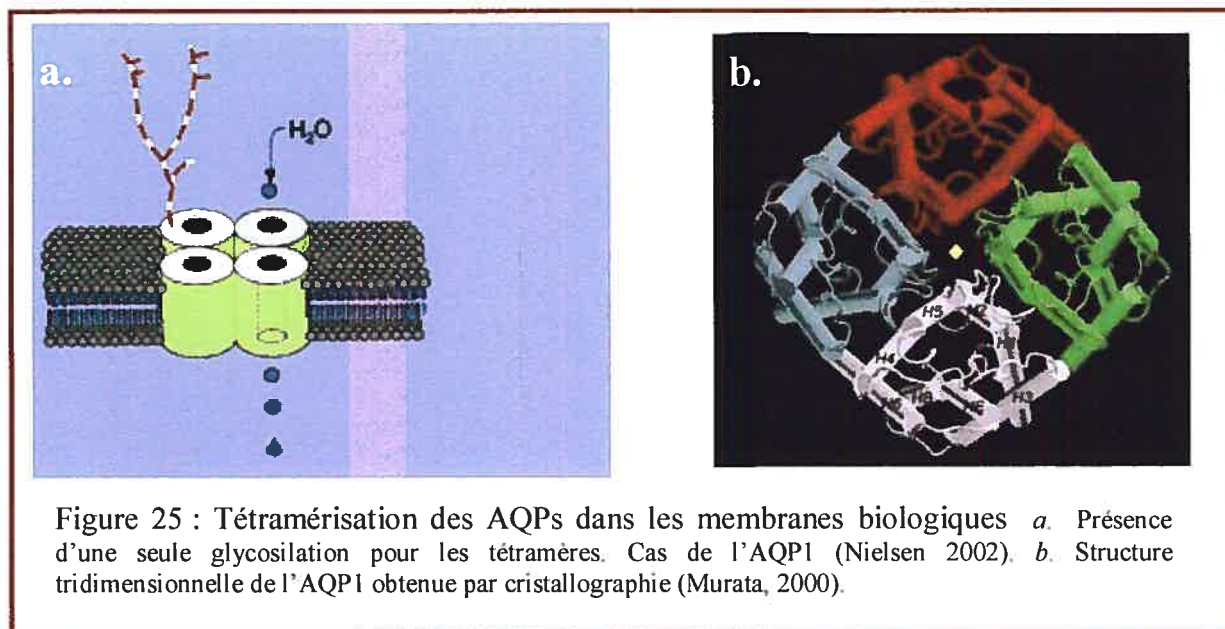
Les AQPs sont des protéines membranaires possédant six domaines transmembranaires (TM1-6) dont les extrémités N et C-terminales sont cytoplasmiques. Cette protéine possède 2 boucles intracellulaires et 3 extracellulaires. Les boucles 2 et 5 expriment un motif NPA (asparagine-proline-alanine) hautement conservé chez les aquaporines (Schrier, 2003). Ces deux motifs NPA s'intègrent dans la bicouche lipidique afin de former une structure en forme de sablier permettant la formation du pore à eau (fig. 23) (Jung, 1994, Schrier, 2003).



Les deux motifs forment un dipôle permettant le passage des molécules d'eau. Des études structurales de cristallographie de l'AQP1 ont confirmé cette hypothèse. (Murata, 2000) (fig. 24).



des homotétramères dont chaque monomère est fonctionnel pour le passage de l'eau. Les aquaporines-1 forment des homotétramères d'AQP1 ayant une glycosilation sur un seul monomère (fig. 25) (Nielsen, 2002). Des études de Brown (Van Hoek, 1998 ; Verbavatz 1993) indiquent que les AQP2, 3 et 5 formeraient aussi des tétramères. Par contre, les AQP4 seraient présentes sous forme de structures oligomériques importantes à la membrane plasmique.



Tous les oligosaccharides N-liés sont liés sur le groupement amide de la chaîne latérale de l'Asn dans la séquence consensus Asn-X-Ser/Thr (où X représente n'importe quel acide aminé). Les glycosylations peuvent être subdivisées en trois différents groupes : les riches en résidus mannose, les complexes et les hybrides (fig. 26) ayant toutes les trois un corps pentasaccharidique commun (Manp (alpha1,6) - Manp(alpha1,3) - Manp(beta1,4) - GlcpNAc (beta1,4) - GlcpNAc(beta1,N) - Asn. Les protéines d'AQPs glycosilées présentent une glycosylation de type complexe sur un seul monomère composant l'homotétramère.

Le phénomène de glycosylation a lieu au niveau du réticulum endoplasmique, cette étape est impliquée dans le contrôle qualité du repliement de la protéine. Une glycosylation correcte est donc nécessaire pour le tri des protéines membranaires notamment les AQPs avant qu'elles ne passent du réticulum endoplasmique vers le compartiment cis-golgien.

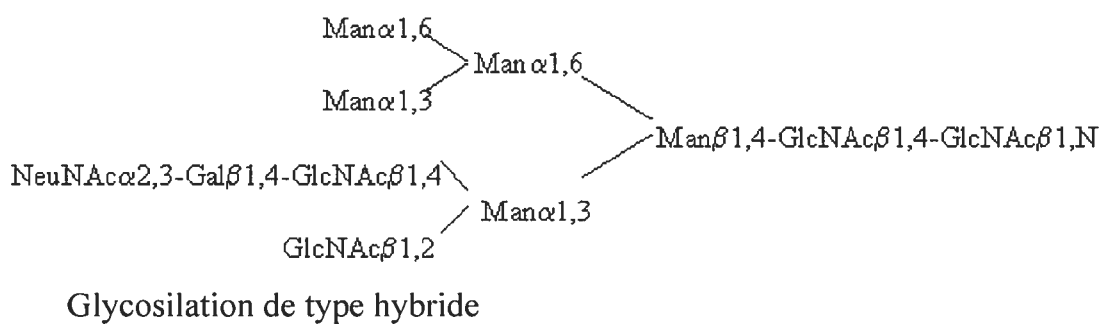
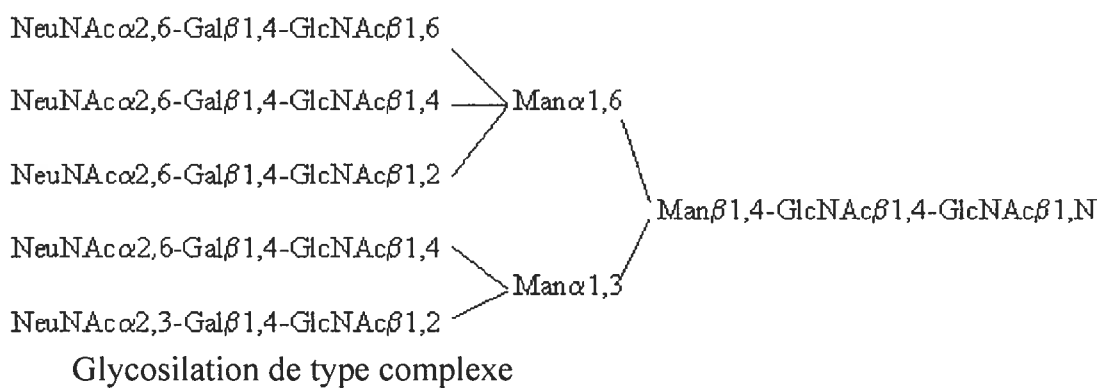
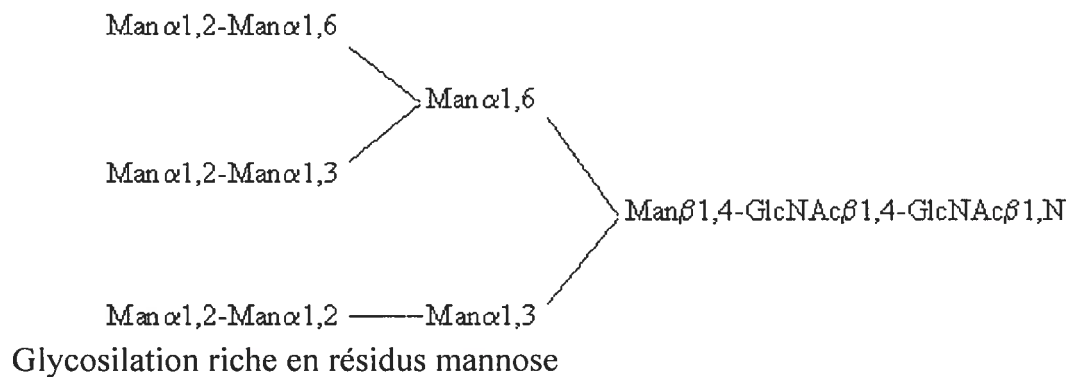
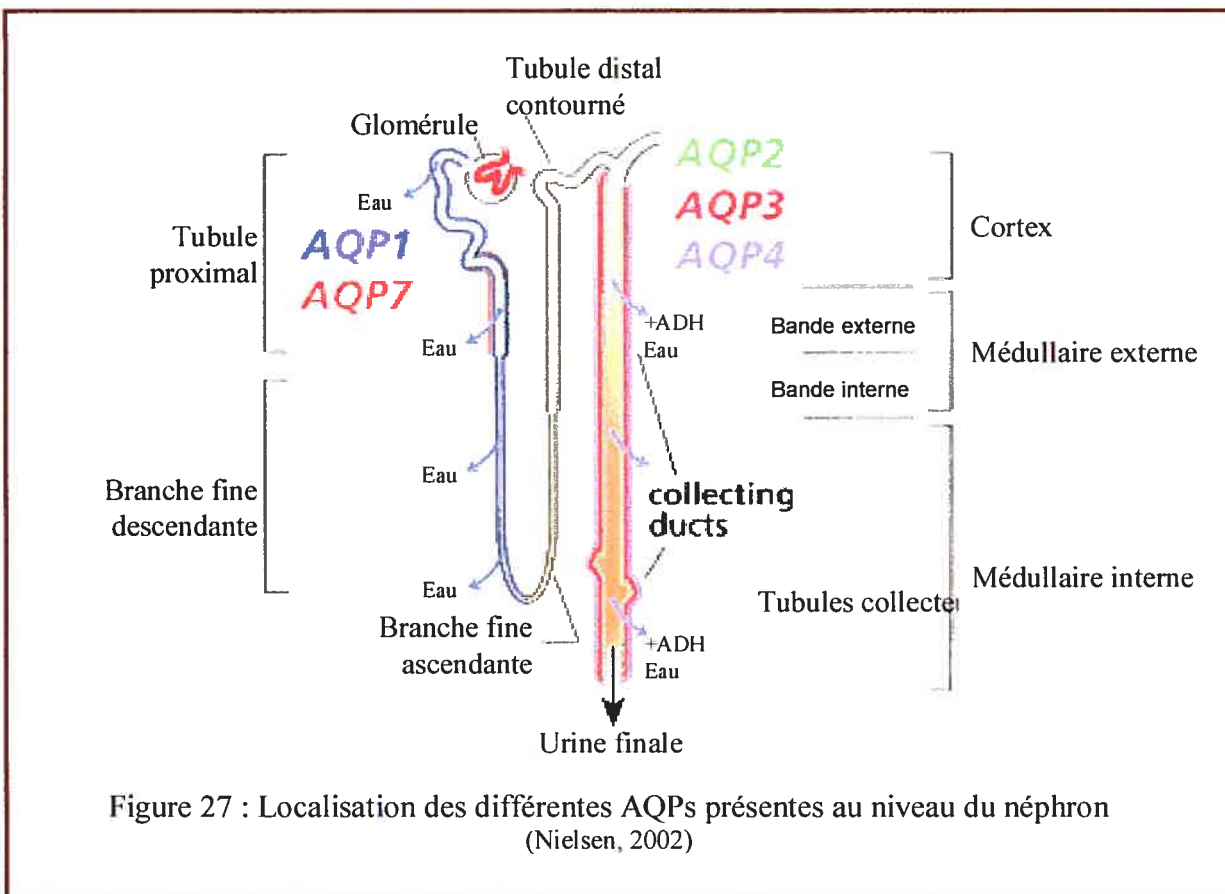


Figure 26 : Les différents types de N-glycosilation

2) Les AQP du rein



2.1) AQP1

Les AQP1 sont localisées constitutivement à la membrane apicale et basolatérale du tubule proximal rénal, responsable de 80% de la réabsorption de l'eau filtrée au niveau glomérulaire mais aussi au niveau de la branche descendante fine de l'anse de Henle (Nielsen, 1993 ; Murarta, 2000). L'AQP1 joue un rôle dans le système de contre courant car l'absence de l'AQP1 dans les vasa recta de la médullaire modifie le mécanisme d'échange de contre courant car cela diminue la force osmotique au niveau de la médullaire nécessaire à la concentration de l'urine.

2.2) AQP 3 et 4

Les AQP3 et 4 sont exprimées de façon constitutive à la membrane basolatérale des cellules du tubule collecteur rénal (Ecelbarger, 1995 ; Terris, 1995). L'AQP4 est majoritairement dans la médullaire interne alors que l'AQP3 est présente dans le tubule collecteur au niveau du cortex, de la médullaire interne et externe (Nielsen, 2002). Grâce à la variation du gradient osmotique entre le cytoplasme cellulaire des tubules collecteurs rénaux et l'interstitium dû à l'action de l'AQP2, les AQP3 et 4 permettent la réabsorption de l'eau dans le corps.

Il a été démontré que l'expression d'AQP3 est régulée par des changements dans le niveau d'AVP (Terris, 1996), par contre l'AQP4 n'est pas affectée.

2.3) AQP6

Les AQP6 sont exprimées dans les cellules intercalées du tubule collecteur au niveau du cortex, de la médullaire interne et externe. Elles ont une localisation cellulaire et subcellulaire. Elles sont exclusivement associées avec des vésicules intracellulaires ; elles seraient des canaux à eau intracellulaire.

2.4) AQP7 et AQP8

L'AQP7 est exprimée au niveau du tubule proximal. L'AQP8 a récemment été identifiée dans le domaine intracellulaire des cellules du tubule proximal et du tubule collecteur. (Nielsen, 2002)

2.5) AQP2

2.5.1) Découvertes

Le tubule collecteur étant le site majeur de la concentration de l'urine et l'AQP1 n'étant pas présente, les chercheurs ont tenté d'identifier des protéines homologues. Des expériences utilisant

des amorces oligonucléotidiques comprenant les motifs NPA de l'AQP1 ont permis d'isoler un ADNc provenant des cellules du tubule collecteur (Fushimi, 1993). Cette protéine homologue fut alors nommée AQP2 et elle fut localisée dans des vésicules intracellulaires et à la membrane apicale des cellules du tubule collecteur rénal lors d'un traitement à l'AVP lors d'expérience de perfusion (Nielsen, 1993 et 1995). Ce trafic intracellulaire des vésicules intracellulaires vers la membrane apicale est corrélé avec une augmentation de la perméabilité membranaire (Nielsen, 1995). Le gène AQP2 fut ensuite cartographié dans la région q13 du chromosome 12. Le gène possède quatre exons et trois introns (Deen, 1994). Le gène AQP2 code pour un polypeptide de 271 acides aminés (fig. 31) (Schrier, 2003)

2.5.2) Structure

L'AQP2 présente la même morphologie structurale que les autres AQPs. Elle possède six domaines transmembranaires avec 5 boucles ainsi que les deux motifs NPA. A ce jour, la structure tridimensionnelle de l'AQP2 n'a pas été établie. La protéine possède un site consensus de N-glycosylation en Asn₁₂₃-X-T₁₂₅ où l'Asn₁₂₃ est glycosilé. La terminaison carboxyle de l'AQP2 présente des sites de phosphorylation pour la protéine kinase A (PKA) en la sérine 256 (Ser₂₅₆) et pour la protéine kinase C (PKC) en la sérine 231 (Ser₂₃₁) (Berl, 2000 ; Van balkom, 2002). Comme nous l'avons vu précédemment, les protéines d'AQP2 se rassemblent en homotétramères au sein des membranes biologiques.

2.5.3) Trafic intracellulaire de l'AQP2

L'AQP2, comme beaucoup d'autres protéines membranaires glycosylées, est synthétisée dans le réticulum endoplasmique (RE) où elle est structurée et assemblée en homotétramères. Au niveau de cette organelle, un oligosaccharide riche en résidu mannose est attaché sur l'Asn₁₂₃ de l'AQP2.

Dans le complexe de Golgi, le groupe riche en résidus mannose est modifié après quoi les protéines d'AQP2 ont une glycosylation dite de type complexe (fig. 26). A la différence de beaucoup de protéines glycosylées, seulement un ou deux monomères de l'AQP2 formant les tétramères sont glycosylés. 25% des protéines d'AQP2 nouvellement synthétisées sont glycosylées ; le reste des AQP2 étant non-glycosylé (Baumgarten, 1998). Les protéines d'AQP2 ayant une glycosylation complexe et celles non-glycosylées sont des protéines stables ayant une demi vie de 6 à 12 heures (Hendricks, 2004). De plus, Hendricks et ses collègues ont démontré que la glycosylation des AQP2 n'est pas essentielle pour la tétramérisation ni pour le transport du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi. Mais la glycosylation est importante pour la sortie de la protéine d'AQP2 de l'appareil de Golgi et pour l'adressage à la membrane plasmique. La masse des AQP2 ayant une glycosylation de type complexe est entre 40-45kD. Les homotétramères d'AQP2 sont alors stockés dans des agrégaphores qui sont des vésicules intracellulaires.

2.5.4) Régulation des AQP2

En 1981, Wade et coll ont émis l'hypothèse d'un transport intracellulaire régulé par l'AVP de vésicules contenant des AQP2. Cette hypothèse suggère que des intermédiaires sont nécessaires à la réabsorption d'eau au niveau des cellules du tubule collecteur et que ce transport est modulé par l'AVP. Suite au clonage de l'AQP2, des expériences de perfusion d'AVP ont montré que l'AQP2 pouvait être intracellulaire ou à la membrane plasmique (Nielsen, 1995). En effet, en l'absence d'AVP, les tétramères d'AQP2 sont localisés dans des vésicules nommées agrégaphores (Nielsen, 1993). En présence d'AVP, l'hormone antidiurétique se lie à son récepteur au niveau de la membrane basolatérale. Suit alors une cascade intracellulaire via les protéines G_i qui active l'adénylate cyclase permettant ainsi l'augmentation de l'AMPc

intracellulaire. De cette façon, la PKA activée phosphoryle les AQP2 en la Ser₂₅₆ (Fushimi, 1997), permettant ainsi l'adressage des agrégophores contenant les AQP2 à la membrane apicale. La protéine G_i est dite essentielle au bon transport membranaire des AQP2. Il est cependant connu que cette isoforme de la protéine G interagit avec les isoformes δ et ζ de la protéine kinase C (Sands, 1997). En 1998, Valenti et coll. ont suggéré que la protéine G_i serait impliquée dans le processus de fusion de l'agrégophore avec la membrane plasmique. Cette hypothèse a été soutenue par les expériences de Sands (1997) qui ont montré une association directe des sous unités G_{1 α 1-3} avec des vésicules sécrétrices.

La phosphorylation par la PKA en Ser₂₅₆ est essentielle pour le transport membranaire des agrégophores (Fushimi, 1997).

2.5.5) Trafic des agrégophores d'AQP2 vers la membrane apicale

Les canaux AQP2 sont insérés au niveau de la membrane apicale des cellules principales du tubule collecteur de la médulla interne rénal suite à une stimulation cellulaire par l'AVP. Les agrégophores contenant les AQP2 contiennent des protéines nécessaires à la migration vésiculaire permettant de phosphoryler ou de déphosphoryler les AQP2 vésiculaires (Lande, 1996). La liaison de la PKA à la vésicule d'AQP2 est permise grâce à la présence d'un complexe multi-protéique comprenant une AKAP (A kinase anchoring protein), la sous unité régulatrice de la PKA, une protéine kinase C ζ (PKC ζ) et une phosphatase 2B (PP2B) (Jo, 2001). Cet arrangement multi-protéique serait responsable de la régulation des cycles de type PKA-dépendante de phosphorylation et de déphosphorylation des protéines membranaires (Dell'Aqua et Scott, 1997) (fig. 28).

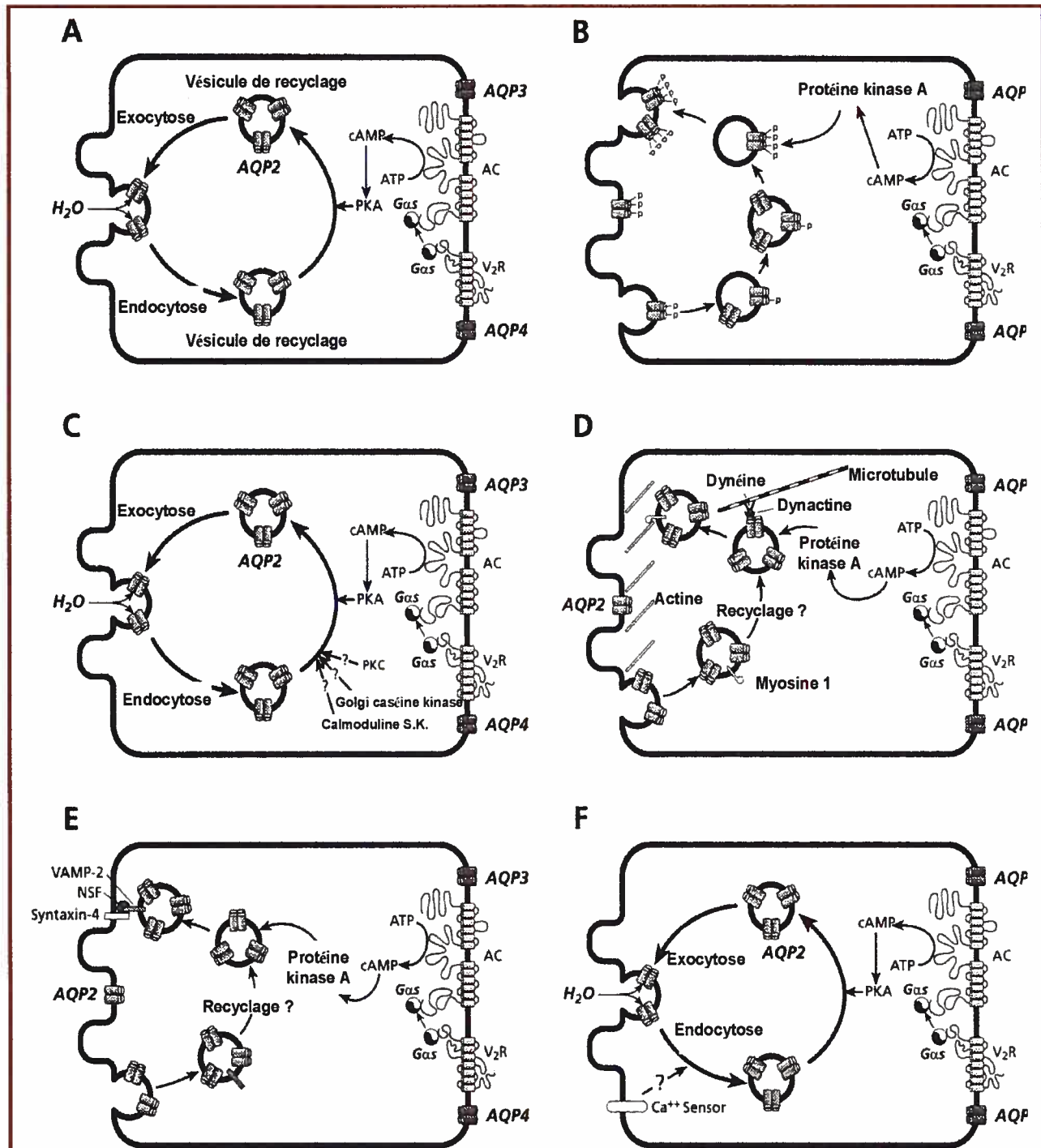


Figure 28 : Cascade de signalisation du trafic de l'AQP2 lors de la régulation par l'AVP. D'après Nielsen, 2002. *A*: Cascade de signalisation via l'AVPR2, l'adénylyl cyclase, l'AMPc et la protéine kinase A. *B*: La protéine kinase A phosphoryle les monomères d'AQP2 en Ser-256. La phosphorylation de 1 ou 2 monomères de l'homotétramère est nécessaire pour le trafic vers la membrane apicale. *C*: D'autres kinases joueraient un rôle dans la régulation du trafic des AQP2. *D*: Les éléments du cytosquelette sont nécessaires pour le trafic des AQP2 vésiculaires comme les protéines moteurs des microtubules (dynéine et dynactine) et aussi des filaments d'actine. *E*: Le modèle du mécanisme de fusion nécessite des protéines de reconnaissances comme VAMP2 et la syntaxin-4. *F*: La régulation du calcium intracellulaire jouerait un rôle dans le trafic des AQP2.

En ce qui concerne la migration des vésicules contenant les AQP2 vers la membrane apicale, elle serait possible grâce à l'action des microtubules intracellulaires (Bradbury, 1994). Des études plus récentes ont permis de mettre en évidence le rôle de la dynéine, de la dynactine et de la myosine I dans le transport vésiculaire par les microtubules : il y aurait une interaction entre ces éléments et les agrégophores (Bi, 1997 ; Marples, 1997 ; Marples, 1998). En 1998, le groupe de Brown a suggéré que la tubuline interviendrait aussi dans la migration des agrégophores. Klusmann et al. (2001) ont récemment démontré que la dépolymérisation de l'actine induit la translocation de l'AQP2. Ils pensent que la polymérisation de l'actine joue un rôle de barrière pour le trafic des vésicules contenant l'AQP2 entre les compartiments intracellulaires et la membrane apicale. Cette barrière filamenteuse d'actine serait dépolarisée lors de la stimulation par l'AVP ce qui faciliterait l'insertion de l'AQP2 à la membrane apicale (Tamma, 2001). En 2004, Noda et al. ont démontré pour la première fois l'interaction directe entre l'AQP2 et l'actine (fig. 28).

Récemment, des expériences ont montré l'interaction des AQP2 vésiculaires avec des protéines contenant un domaine PDZ, le SPA-1 (signal-induced proliferation-associated gene-1) qui sont des protéines GAP (GTPase-activating protein) de Rap1. La distribution de SPA-1 coïncide avec celle des AQP2 dans les cellules du tubule collecteur rénal. Cette protéine SPA-1 liant directement les AQP2 régulerait en partie le trafic intracellulaire des AQP2 (Noda, 2004). Afin d'identifier les segments importants de l'AQP2 pour le trafic intracellulaire, Van Balkom et coll. (2004) ont fait des chimères d'AQP1 et d'AQP2. Ils ont ainsi démontré que la région N220-S229 est essentielle pour la localisation des AQP2 à la membrane plasmique apicale alors que les queues N- et C-terminales sont absolument nécessaires pour le trafic des AQP2 vers les vésicules

intracellulaires et pour leur transport vers la membrane apicale mais aussi de la membrane apicale vers l'intérieur de la cellule (van Balkom, 2004)

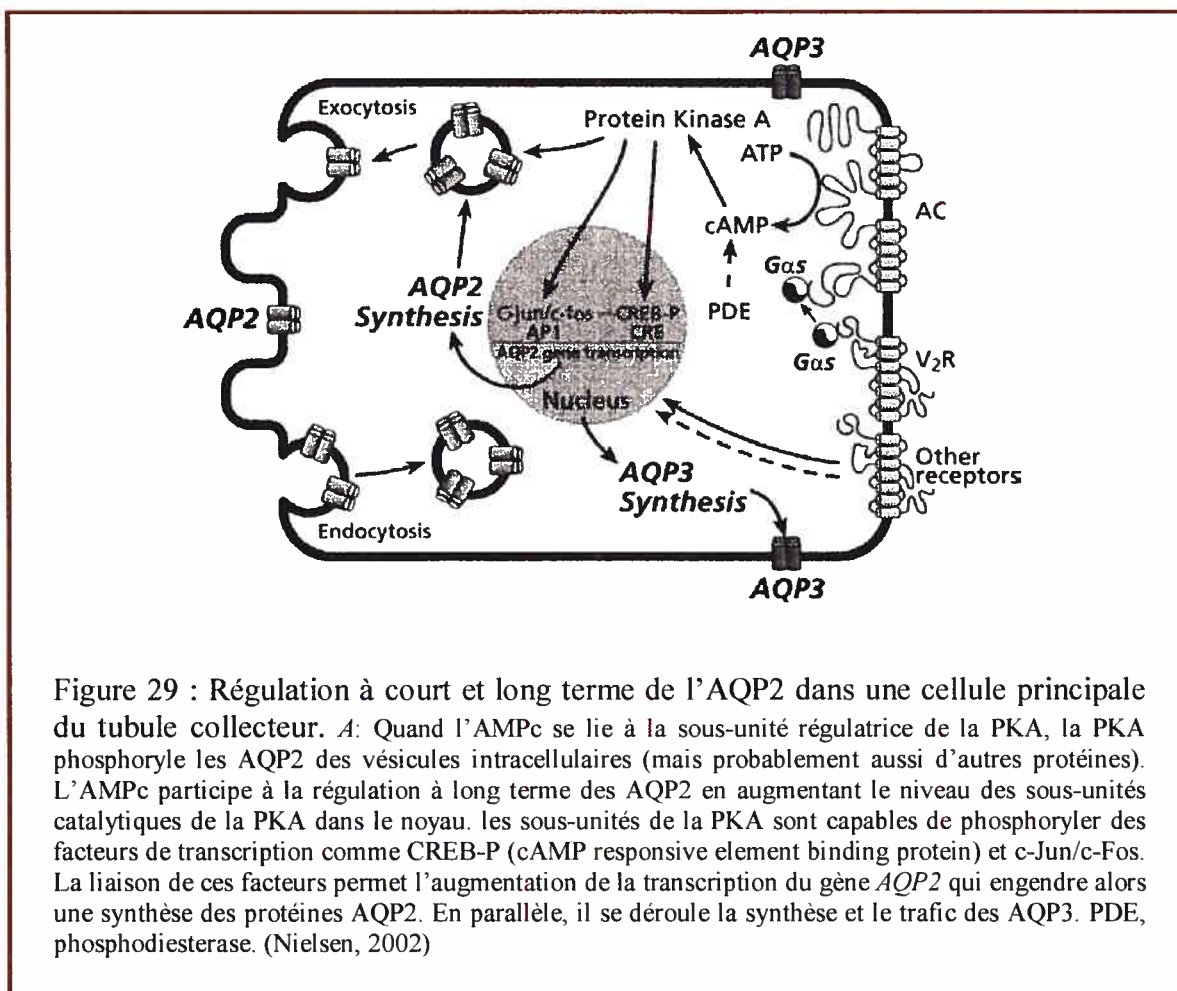
La fusion des agrégophores avec la membrane apicale se ferait par un complexe SNARE/VAMP. Franki et coll. et Harris et al. ont démontré, suite à l'isolation des agrégophores contenant des AQP2, la présence d'une isoforme de synaptobrevine appelé VAMP-2 (vesicule-associated membrane protein) qui co-localise avec les AQP2 vésiculaires (Nielsen, 1995). Mandon (1996) et Gouraud (2002) ont découvert, respectivement, que la syntaxine 4 et que la syntaxine 1A sont exprimées à la membrane apicale des cellules principales du tubule collecteur. Les protéines VAMP-2, syntaxine 4 et syntaxine 1 présentent une forte affinité de liaison entre elles (Pevsner, 1994) ; ce qui suggère que ces composantes du complexe de fusion seraient responsables de la fusion sélective des agrégophores d'AQP2 avec la membrane apicale (Gouraud, 2002). De plus, la protéine SNAP-23 fut caractérisée dans les cellules principales du tubule collecteur, son rôle serait d'augmenter l'affinité de VAMP-2 pour les syntaxines 1 et 4 (Pevsener, 1994). Ce complexe protéique homologue à celui rencontré dans les neurones laisse penser que le processus d'exocytose se ressemblerait dans ces deux types cellulaires.

Les AQP2, à la fin de la stimulation par l'AVP, sont soit recyclées à partir de la membrane plasmique soit excrétées dans l'urine.

2.5.6) Régulation à long terme des AQP2 : régulation transcriptionnelle

Les protéines AQP2 ont deux types de régulation celle via la PKA (régulation à court terme, chap. 2.5.4 et 2.5.5) et la régulation à long terme. Le gène *AQP2* possède un élément CRE (cAMP-responsive element) dans la région flanquante 5' (Uchida, 1994). L'activation de la PKA induit la phosphorylation de la protéine CREB (cAMP-response element binding) qui va se lier sur l'ADN de l'AQP2 et active la transcription du gène. Des études utilisant le promoteur de

l'AQP2 lié à un gène rapporteur exprimé dans des cellules en culture indiquent que l'élément CRE agit synergiquement avec le site liant AP1 qui est lui-même activé par la liaison de *c-fos/c-jun* (Yasui, 1997). La production de la protéine *c-fos* est aussi stimulée par l'activation de la PKA. D'autres sites de liaison de facteurs de transcription (notamment deux boîtes GATA) ont été identifiés (Uchida, 1994), leur rôle fonctionnel reste encore à être déterminé. Certaines protéines devraient agir en tant que répresseur de la transcription, expliquant ainsi que l'expression de l'AQP2 est restreinte aux cellules principales du tubule collecteur (fig. 29).



Chapitre 3 :

**Analyse fonctionnelle de nouvelles mutations
de l'aquaporine-2 responsables du
diabète insipide néphrogénique**

1) Introduction

Les aquaporines 2 (AQP2), découvertes en 1993 par Fushimi, sont des protéines composées de 271 acides aminés. Elles jouent un rôle important dans la réabsorption au niveau des cellules du tubule collecteur rénal.

La liaison de l'arginine vasopressine (AVP) à son récepteur l'AVPR2 au niveau de la membrane basolatérale des cellules du tubule collecteur rénal permet une activation de l'adénylate cyclase entraînant alors une augmentation du niveau de l'AMPcyclique intracellulaire. Il en résulte alors la phosphorylation de l'AQP2 sur la sérine 256 par la protéine kinase A (PKA) et les AQP2 activées contenues dans des vésicules subapicales sont redistribuées à la membrane apicale. La présence d'un gradient de concentration permet alors la réabsorption de l'eau à la membrane apicale via les AQP2. L'eau intracellulaire est sortie de la cellule principale du tubule collecteur rénal vers l'interstitium via les AQP3 et 4 présentes constitutivement à la membrane basolatérale. Le processus est inversé lors de la dissociation de l'AVP à son récepteur AVPR2.

Le diabète insipide néphrogénique (DIN) est une maladie caractérisée par l'incapacité de concentrer l'urine (plus de 3 litres d'eau par 24 heures) en réponse à une stimulation par l'AVP. Le DIN peut être dû à une mutation du gène de l'*AVPR2* (forme de NDI liée à l'X) ou une mutation du gène de l'*AQP2* (forme de DIN autosomale).

A ce jour, plus de 33 mutations du gène de l'AQP2 ont été mises en évidence présentant des traffics cellulaires différents. Des publications précédentes montrent que certaines mutations de l'AQP2 sont non-fonctionnelles à cause d'un mauvais trafic vers la membrane apicale, les AQP2 sont alors retenues dans le réticulum endoplasmique (RE) (Canfield, 1997, Tamarappoo, 1998). D'autres mutants sont fonctionnels mais sont

retenus au niveau de l'appareil de Golgi comme la mutation E258K. Lors d'une coinjection de E258K avec l'AQP2 sauvage (AQP2-wt) dans des cellules polarisées, les mutants forment des hétérotétramères avec l'AQP2-wt empêchant ainsi le transport des AQP2-wt vers la membrane plasmique (Kamsteeg, 1999) ; la mutation E258K est dite dominante négative. D'autres mutations dans le gène peuvent générer des protéines capables d'interagir avec la forme sauvage en formant des hétérotétramères et de l'emmener à la membrane basolatérale (Kamsteeg, 2003). Récemment, l'équipe de Deen a mis en évidence un nouveau type de mutants. La protéine mutante P262L est fonctionnelle et est localisée à la membrane plasmique dans un système d'ovocytes ; alors que lors de l'expression dans un système de cellules polarisées, cette protéine mutante est retenue dans des vésicules intracellulaires. Une co-expression de P262L et de la forme sauvage de l'AQP2 montre une expression du mutant à la membrane apicale. La forme sauvage de l'AQP2 a permis le « sauvetage » de la forme mutante P262L (de Mattia, 2004).

Dans ce travail, nous avons identifié dans une famille d'origine espagnole une personne atteinte de polyurie sévère dont la mère et la grand-mère présente une faible polyurie alors que le père ne présente aucun phénotype de la maladie. Après séquençage du gène de l'AQP2, le patient possède un génotype d'hétérozygote composé par deux mutations: D150E (GAT à GAA : Asp à Gln) et G196D (GGC à GAC : Gly à Asp). Pour déterminer le rôle de ces mutations dans le DIN, les mutants d'AQP2 sont analysés. Grâce à une expression dans un système d'ovocytes de *Xenopus laevis*, la fonctionnalité et la localisation des protéines mutantes d'AQP2 sont étudiées. Des expériences de coinjection nous permettront de déterminer les interactions probables entre les AQP2 mutantes et sauvage.

2) Matériels et méthodes

1) Les patients

Cette famille d'origine espagnole incluent maintenant 3 enfants tous atteints de diabète insipide néphrogénique. Le premier enfant, né en 1999, a été bien caractérisé par une étude phénotypique complète. Il présente une polyurie, des épisodes de déshydratation hypernatrémiques à 3, 5 et 8 mois. Une osmolarité urinaire de base à 77 mmol/kg, une absence de concentration urinaire à la dDAVP administrée en sous-cutané, l'osmolarité urinaire ne dépassant pas 119 mmol/kg. Deux frères jumeaux sont nés en 2003 et présentent eux aussi un diabète insipide néphrogénique. Cette famille ne présentant ni histoire familiale de diabète insipide néphrogénique ni consanguinité, nous avons séquencé en premier le gène *AVPR2* et nous avons identifié une séquence normale. Nous avons ensuite séquencé le gène *AQP2* et nous avons identifié 2 mutations différentes de l'aquaporine-2, les individus atteints étant des hétérozygotes composés. L'analyse haplotypique et mutationnelle a déterminé l'origine de chaque allèle. Des études phénotypiques sont en cours pour déterminer la présence ou non de manifestations polyuriques chez les hétérozygotes

2) Analyse haplotypique

Les marqueurs génotypiques des 3 loci *AFM259vf9*, *D12S131*, *AFMb007yg5* qui flanquent le gène *AQP2* dans la région chromosomique 12q13 sont utilisés afin de suivre la ségrégation des allèles comportant les mutation entraînant le DIN pour chaque famille. *AFM259vf9*, *D12S131* et *AFMb007yg5* sont des répétitions de dinucléotides. Pour

l'interprétation des données haplotypiques, il n'y a pas de recombinaison possible dans la région de 1,5 mégabase se trouvant entre *AFM259bf9* et *AFMb007yg5*.

3) Construction de l'ADN complémentaire (ADNc) et synthèse de l'ARN complémentaire (ARNc)

Grâce à une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) utilisant la polymérase Pfu, chaque mutation des patients entraînant le DIN est introduite dans le plasmide pT7Ts-AQP2 (don de P. Deen). Les amorces utilisées sont CCT CCA CCG AAG AGC GCC GCG pour D150E et GTC GTC ACT GAC AAA TTT GAT C pour G196D. Les clones sont sélectionnés après séquençage.

Après linéarisation des plasmides pT7Ts-AQP2, pT7Ts-AQP2-D150E et pT7Ts-AQP2-G196D par Sall, les ARNc avec la coiffe G sont synthétisés *in vitro* en utilisant le kit d'ARN polymérase (Ambion). La concentration des solutions est déterminée par spectrophotométrie.

4) Préparation des ovocytes de *Xenopus laevis*

Les ovocytes sont préparés comme décrit auparavant (Bissonnette, 1999). Brièvement, les ovocytes aux stades V et VI de *Xenopus laevis* (Université d'Alberta, Edmonton, CAN) sont isolés et incubés dans une solution saline tamponnée sans Ca^{2+} (200 mOsm). Les ovocytes sont défolliculés grâce à une digestion par la collagénase et gardés à 18°C dans une solution Barth (mM: 90 NaCl, 3 KCl, 0.82 MgSO_4 , 0.41 CaCl_2 , 0.33 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 5 HEPES, pH 7,6) complétée avec 5% de sérum de cheval, 2,5 mM de sodium pyruvate, 100 U.ml^{-1} de pénicilline et 0.1 mg.ml^{-1} de streptomycine. Les ovocytes sont

injectés avec les quantités propices d'ARNc codant pour les protéines de l'AQP2-wt ou mutantes. Toutes les expériences sont effectuées trois jours après les injections d'ARNc.

5) Isolation des membranes totales et des membranes plasmiques

Les membranes totales et plasmiques sont isolées selon la technique de Deen (2001). Brièvement, afin d'obtenir des membranes totales, les ovocytes sont broyés à la pipette dans du TBS avec des inhibiteurs de protéases afin d'obtenir un homogénat. Ce dernier est centrifugé 2 fois à 200 g pendant 5 min à température ambiante. Puis, une dernière centrifugation de 16000 g pendant 20 min à température ambiante permet d'obtenir un culot de membranes totales qui est resuspendu dans du TBS en mettant 1 μ l de tampon par ovocyte de départ. Pour l'isolation des membranes plasmiques, les ovocytes défoliculés sont mis en solution dans un tampon salin MES avec 1% de silica lavés deux fois avec un tampon MBSS (20 mM de Mes ; 80 mM NaCl ; pH 6.0) et incubés dans le tampon MBSS avec 0,1% d'acide polyacrylique. Puis l'homogénat est centrifugé à 13 g pendant 30 min à 4°C. Après deux lavages avec du MBS, les ovocytes sont homogénéisés dans du Hba. Après cinq lavages par des centrifugations de 13,5 g à 4°C durant 30s, les membranes plasmiques sont récupérées grâce à une centrifugation à 14 000 g pendant 20 min.

6) Mesures de la perméabilité membranaire

Le matériel utilisé pour les expériences de volumétrie a déjà été décrit par Gagnon (2004). Les ovocytes sont incubés 20 minutes dans une solution isotonique (mM: 80 NaCl, 3 KCl, 0.82 MgCl₂, 0.74 CaCl₂, 5 HEPES, 35 mannitol, pH 7.6, \cong 200mOsm). Un ovocyte est placé dans une chambre de 120 μ l éclairé par une diode. La solution est

diffusé dans la chambre à une vitesse de 1.5 ml.min^{-1} . La surface de l'ovocyte est mesurée par une caméra CDD avec un objectif de 3X capable de transférer les mesures en volume. Un choc hypotonique est induit grâce à une solution hypotonique (identique à la solution isotonique excepté pour le mannitol : 25 mM , $\cong 180 \text{ mM}$).

7) Analyse des données

La perméabilité membranaire (P_f) d'un ovocyte est obtenue grâce à l'équation suivante :

$$P_f = \frac{1}{S \times v_w \times \Delta\pi} \left(\frac{dV}{dt} - \frac{dV}{dt_0} \right)$$

dV/dt_0 et dV/dt : flux d'eau mesuré avant et après le choc hypotonique ;

S : surface standard d'un ovocyte (0.4 cm^2);

v_w : volume spécifique de l'eau ($18.2 \text{ cm}^3.\text{mol}^{-1}$);

$\Delta\pi$: variation de l'osmolarité durant l'expérience ($200 \text{ mOsm} - 180 \text{ mOsm} = 20 \text{ mOsm}$).

8) Expériences d'immunobuvardage

Le tampon Laemmli est ajouté au surnageant de protéines. L'échantillon de protéines est déposé sur un gel d'électrophorèse SDS-polyacrilamide à 12% et transféré du gel à une membrane de nitrocellulose Hybond par les procédures standard. Les liaisons non spécifiques sur la membrane de nitrocellulose sont bloquées en utilisant un lait non gras à 5% dans du TBS (solution de blocage) pendant une heure à température ambiante. La membrane est ensuite incubée avec l'anticorps primaire $\alpha\text{-AQP2 N-20}$ (Santa Cruz) dilué au $1/100^{\text{ème}}$ dans un tampon TBS-T (0,1% de Tween) avec 5% de lait non gras, durant toute la nuit à 4°C . La membrane est lavée quatre fois dans du TBS-T et bloquée une

nouvelle fois pendant une heure à température ambiante. L'incubation avec l'anticorps secondaire α -goat HRP, dilué au 1/5000^{ème} dans du TBS-T avec 5% de lait non gras, se fait à température ambiante durant une heure, et la membrane de nitrocellulose est lavée avec du TBS-T. La détection de l'activité de HR est faite en utilisant un kit de luminescence (Super Signal West Dura, Pierce) ainsi qu'un film Biomax MR Kodak.

9) Expériences d'immunofluorescence

Trois jours après l'injection, les ovocytes sont rincés trois fois avec une solution de Barth et incubés dans une solution de formaldéhyde 1% pendant une heure. Les ovocytes fixés sont alors rincés trois fois et incubés toute la nuit dans une solution de Barth à 30% sucrose. Les ovocytes sont enveloppés dans un milieu d'enrobage Tissue-Tek dilué 1/7^{ème} dans de l'eau (Sakura Finetek, USA), congelés, coupés (10 μ m d'épaisseur) grâce à un cryostat et montés sur des lames. Les lames sont rincées trois fois dans du PBS et bloquées contre les liaisons non spécifiques avec une solution de BSA à 2% pendant 30 minutes à température ambiante. L'incubation avec l'anticorps primaire α -AQP2 (N-20) (Santa Cruz) dilué 1:20 dans du PBS se fait dans une chambre humide à température ambiante pendant 90 minutes. Les lames sont alors rincées comme précédemment. Les lames sont incubées une heure à température ambiante avec l'anticorps secondaire Alexa-488 α -goat dilué à 1 :1000 dans du PBS comme pour l'anticorps primaire et lavées. Un milieu de montage (Prolong Antifade kit, Molecular Probes) est ajouté pour l'observation avec un filtre FITC (zoom X 20).

3) Résultats

1) Analyse des patients

L'analyse de séquence de gène de l'*AVPR2* ne révèle pas de mutations. Alors, la séquence génomique de l'*AQP2* a été étudiée, et deux mutations ont été trouvées. Le patient est hétérozygote composé avec deux mutations récessives : D150E et G196D. Ce sont des mutations faux-sens dans le gène de l'*AQP2*. L'arbre généalogique établi pour cette famille nous permet de mieux comprendre les phénotypes des différents protagonistes (fig.29)

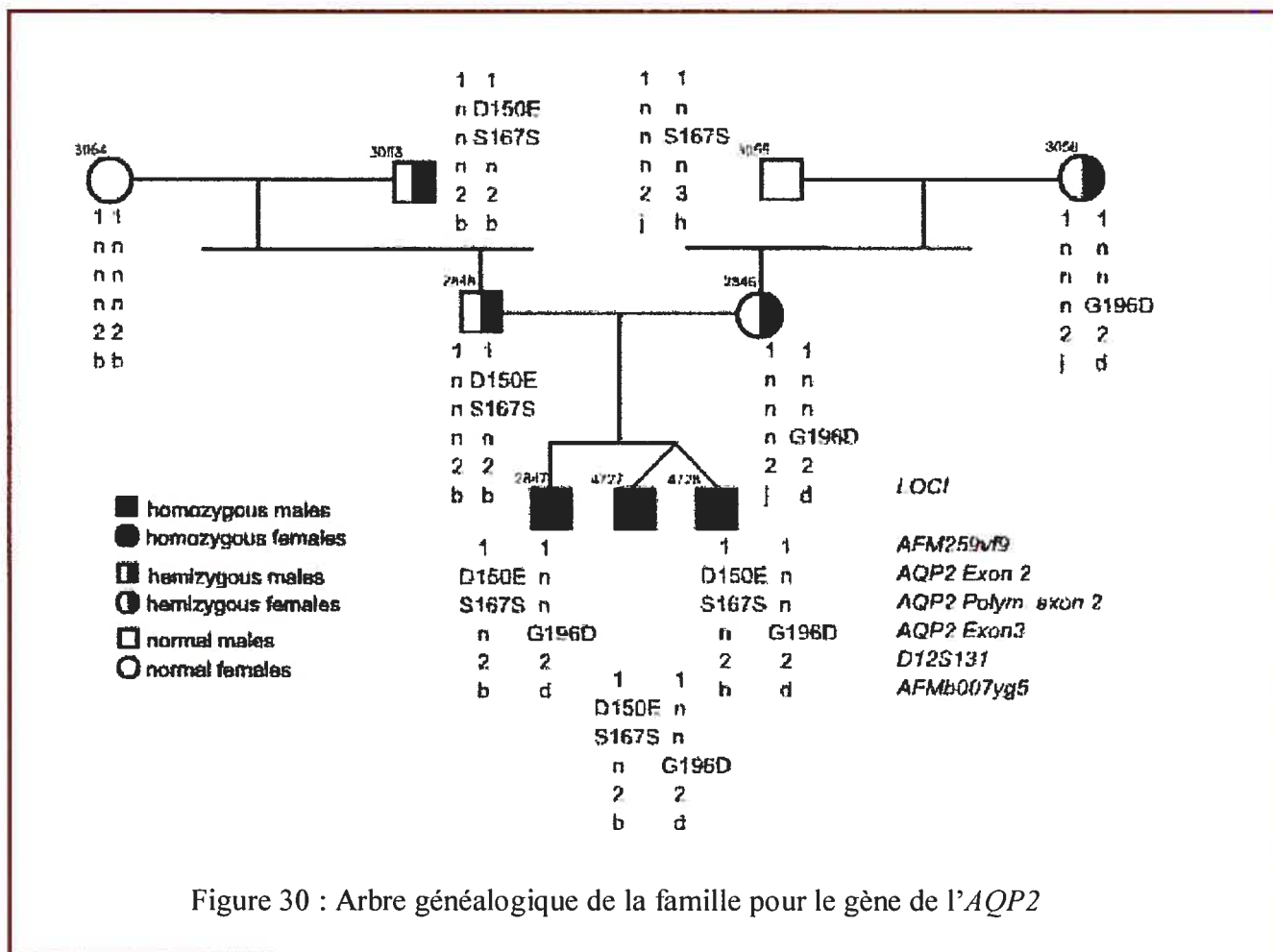
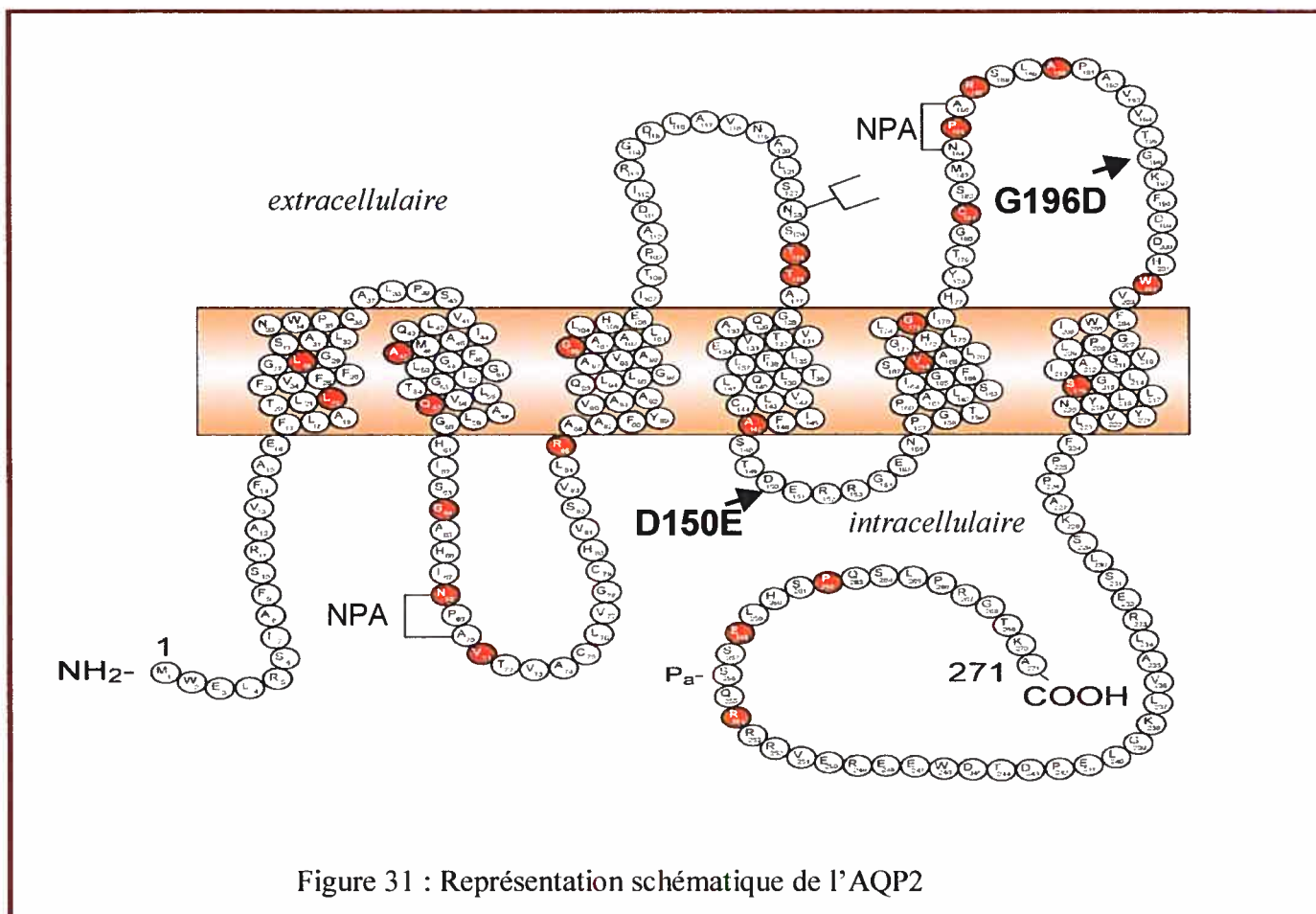


Figure 30 : Arbre généalogique de la famille pour le gène de l'*AQP2*

Les mutations trouvées sont D150E, G196D et S167S (TCC à TCT). Les deux premières sont de nouvelles mutations jamais décrites dans la littérature. En ce qui concerne S167S, c'est un polymorphisme retrouvé fréquemment chez les humains.

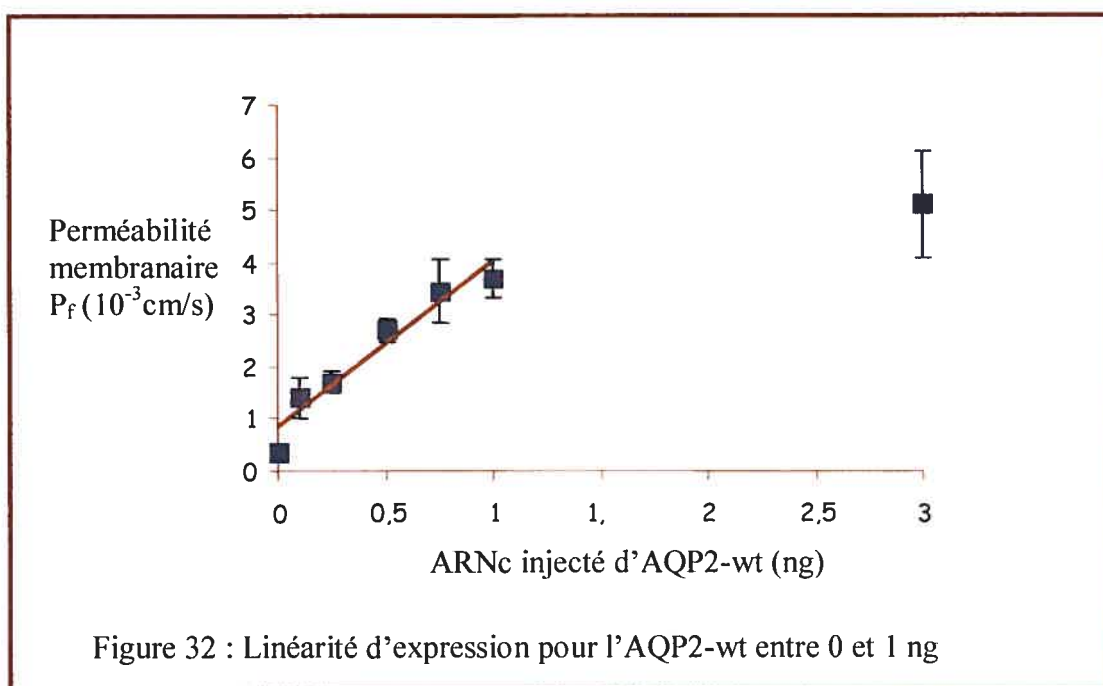
D150E est localisé dans l'exon 2 du gène ce qui correspond en terme de protéine au niveau de la deuxième boucle intracellulaire. G196D est présent dans l'exon 3 du gène de l'*AQP2* et l'acide aminé se retrouve dans la troisième boucle extracellulaire. Ces deux mutations ne sont pas localisées au niveau des motifs NPA ni dans des domaines transmembranaires (fig. 31).



2) Analyse fonctionnelle des AQP2 mutantes

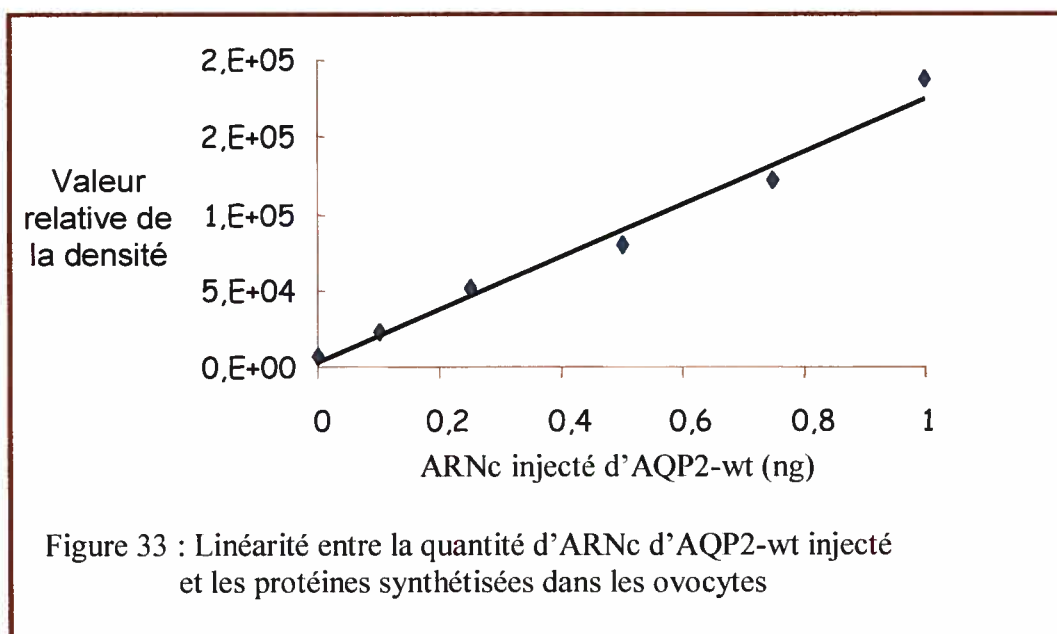
Afin de déterminer le rôle de ces mutants dans le DIN, chaque mutation a été introduite dans la séquence de l'ADNc de l'AQP2 contenue dans un vecteur d'expression d'ovocytes. Les expressions dans un système d'expression ovocyte permettent de déterminer la fonctionnalité et la localisation du canal à eau.

Une gamme étalon des concentrations d'ARNc de l'AQP2-wt a été établie dans le but de déterminer la zone de linéarité de l'expression dans le système d'ovocytes de *Xenopus laevis* (fig. 32). Grâce à ces expériences, les concentrations 0,5 et 1 ng d'ARNc d'AQP2-wt sont utilisées pour les expériences comme contrôle positif. En ce qui concerne les contrôles négatifs, des ovocytes non injectés sont testés.



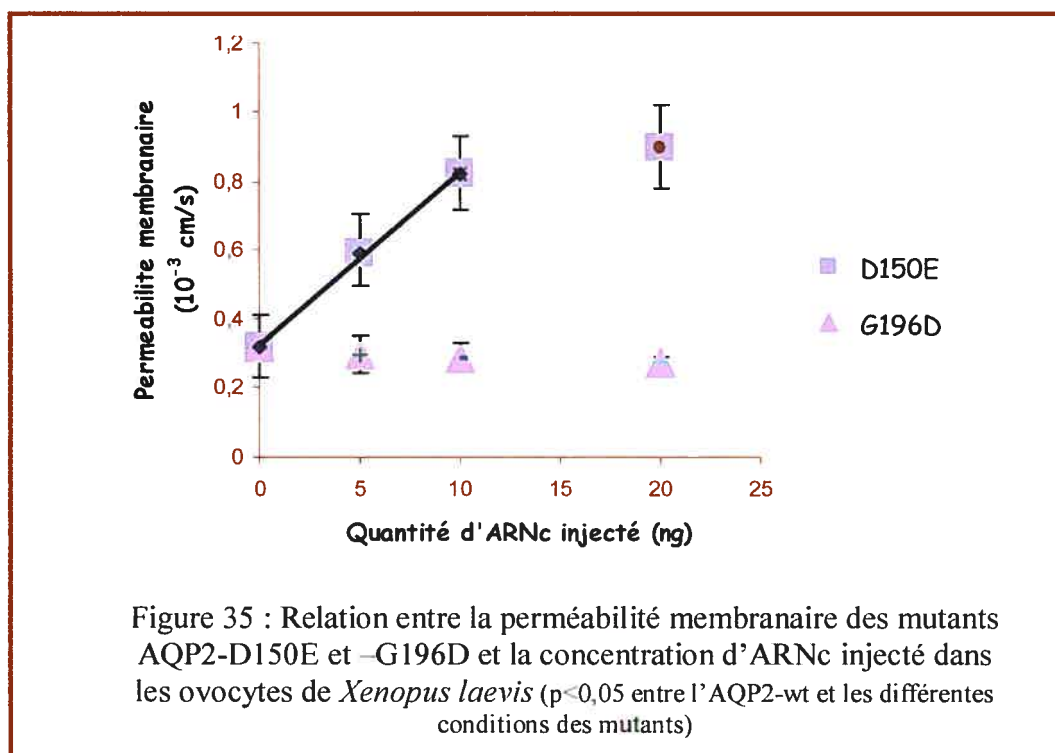
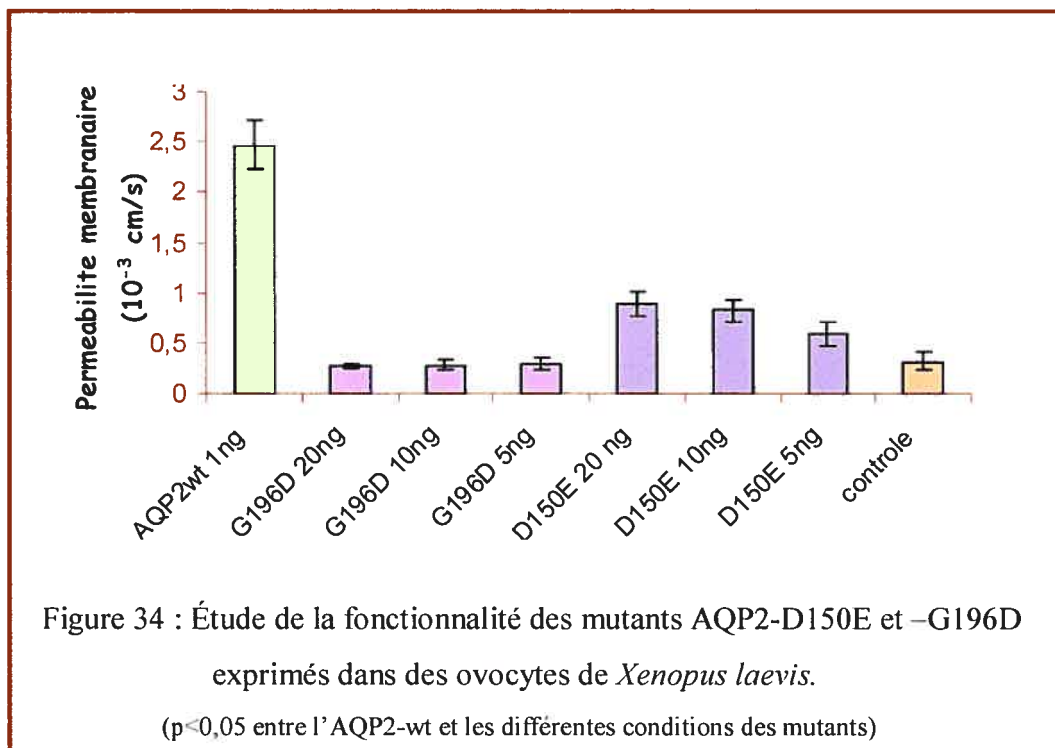
Nous avons aussi déterminé la zone de linéarité entre la quantité d'ARNc d'AQP2-wt et la quantité de protéines exprimées dans les ovocytes. Ces expériences démontrent une

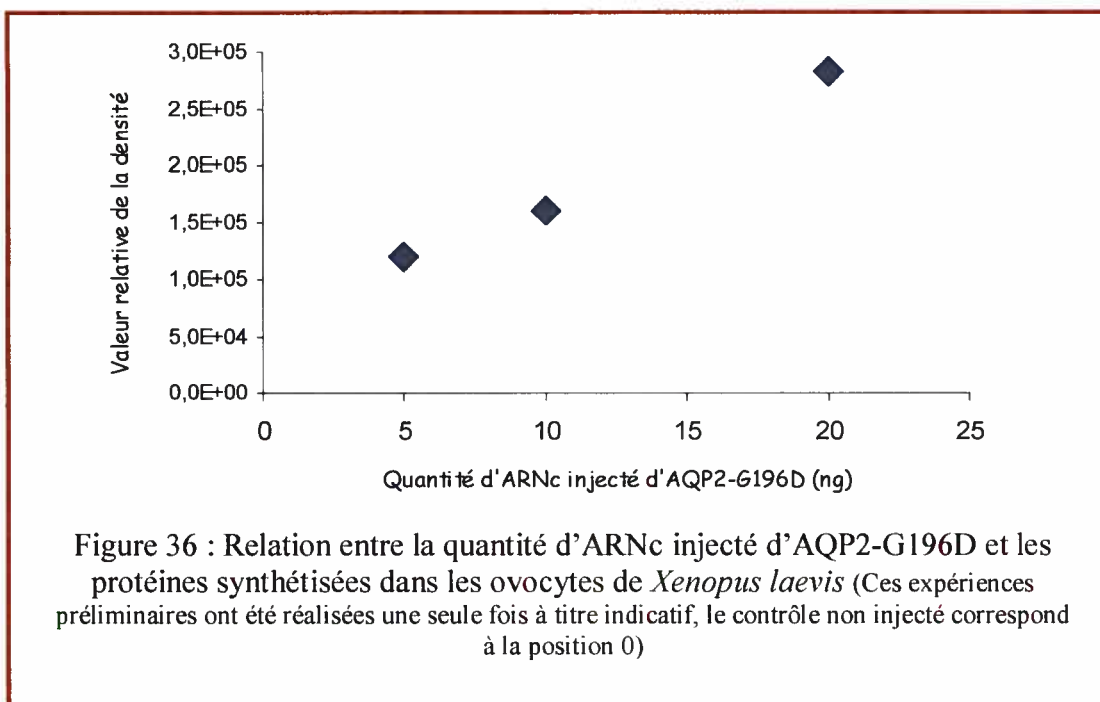
linéarité ce qui permet de confirmer nos expériences et de voir que la machinerie cellulaire n'est pas saturée et répond correctement à l'injection d'ARNc. A partir de ces deux expériences préliminaires, nous pouvons dire que les ovocytes injectés sont un système permettant l'étude de nos AQP2 mutantes (fig.33).



Pour les mutants d'AQP2, les ovocytes sont injectés avec 10 ng d'ARNc. Les expériences préliminaires présentées ci-dessous ont été faites une fois avec 4 ovocytes par condition. On peut ainsi voir que si l'on augmente la quantité d'ARNc injecté dans les ovocytes pour le mutant AQP2-G196D, la perméabilité membranaire n'augmente pas. On pourrait penser que la protéine n'est pas synthétisée (voir fig. 36). Pour le mutant AQP2-D150E, on constate une linéarité de 0 à 10 ng d'ARNc. Puis à 20 ng d'ARNc injecté, la gamme n'est plus linéaire ce qui laisse penser que la machinerie cellulaire est

saturée. C'est pour cela que dans la littérature, les auteurs injectent des quantités d'ARNc de 10 ng afin d'avoir des résultats compris dans la zone de linéarité de la fonctionnalité.





En ce qui concerne l'AQP2-G196D, on constate que la protéine est synthétisée par les ovocytes de *Xenopus laevis* lors de l'injection de 5, 10 ou 20 ng. On constate une linéarité entre la quantité d'ARNc injecté et la densité relative. Donc à 10 ng, nous sommes dans la zone de linéarité. Les expériences de densitométrie nous permettent de voir que la protéine est bien synthétisée dans ce système d'expression. Lorsque l'on corrèle ces expériences avec celle de perméabilité membranaire, on constate que l'on obtient le même profil fonctionnel pour les différentes concentrations d'ARNc utilisées.

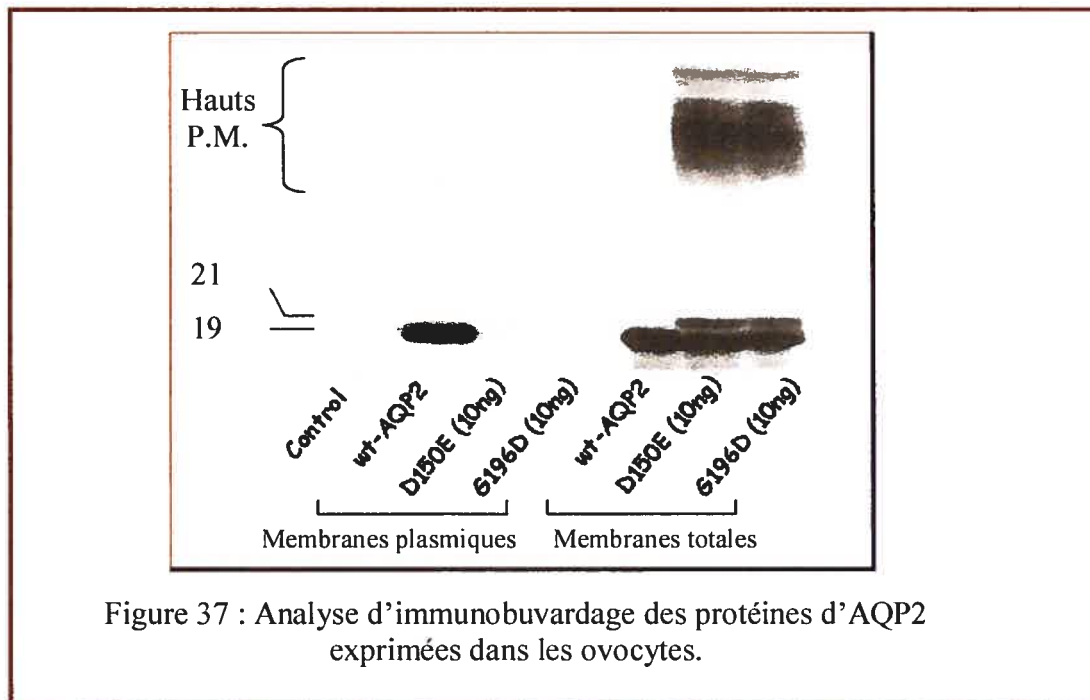
Par contre pour l'AQP2-D150E, la quantité d'ARNc injectée joue un rôle important dans la détermination de sa fonctionnalité. À partir de ces deux expériences et avec les données de la littérature, nous avons donc décidé d'injecter une quantité de 10 ng pour réaliser nos expériences.

Trois jours après l'injection des différents ARNc dans les ovocytes, les expériences de western blot et d'immunobuvardage sont réalisées. Afin de savoir si les mutants d'AQP2

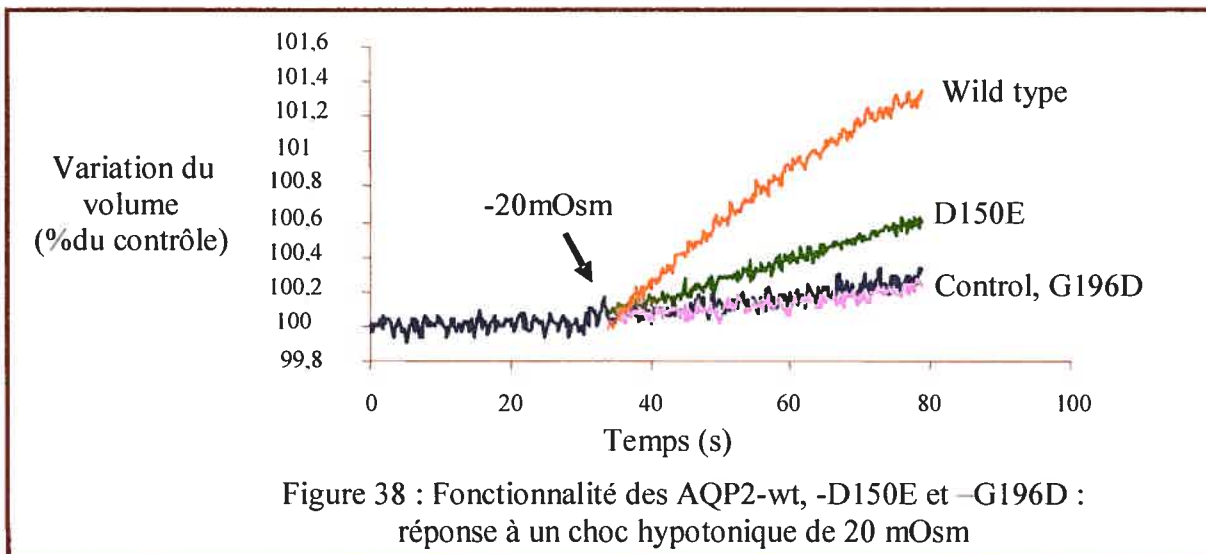
sont synthétisés et connaître leur niveau d'expression dans les ovocytes, les membranes totales et les membranes plasmiques sont isolées des ovocytes et des expériences d'immunobuvardage sont réalisées (fig.34). L'AQP2-wt est présente dans les membranes totales sous forme d'une bande à 19kD, cette bande représente la forme non glycosilée de la protéine. La bande de poids moléculaire inférieur représente les formes dégradées de la protéine (Marr, 2002). Par contre, lors d'une exposition plus longue du film radiographique, une bande entre 40 et 45 kD est présente et correspond à la protéine glycosilée de type complexe (Deen, 1995). Les deux mutants présentent le même profil avec la bande à 19 kD correspondant à une forme non glycosilée et une autre à 21 kD qui correspondrait aux protéines ayant une glycosilation riche en résidus mannose (Marr, 2002). Des expériences préliminaires au sein de notre laboratoire laissent penser que ces bandes sont des AQP2 mutantes ayant une glycosilation riche en résidus mannose (données non fournies). Les bandes de haut poids moléculaires n'ont pas été caractérisées. En ce qui concerne la bande à 21 kD pour l'AQP2-wt, cette forme glycosilée riche en résidus mannose n'est pas visible car sa durée de vie est très éphémère dans la cellule. De plus, les mutations D150E et G196D ne modifient pas le site de glycosilation de la protéine comparé à T125M dont la mutation ne permet pas une glycosilation de la protéine (Marr, 2002).

En ce qui concerne les membranes plasmiques (fig.34), l'AQP2-wt est présente en grande quantité dans ces membranes alors que les protéines d'AQP2-D150E ne sont présentes qu'en partie. Le fait que le signal soit plus fort dans les membranes totales que dans les membranes plasmiques laissent penser que l'AQP2-D150E est retenue dans une organelle intracellulaire perturbant ainsi sa route vers la membrane plasmique. Par contre, l'AQP2-G196D n'est pas localisée à la membrane plasmique des ovocytes. Cela laisse penser que

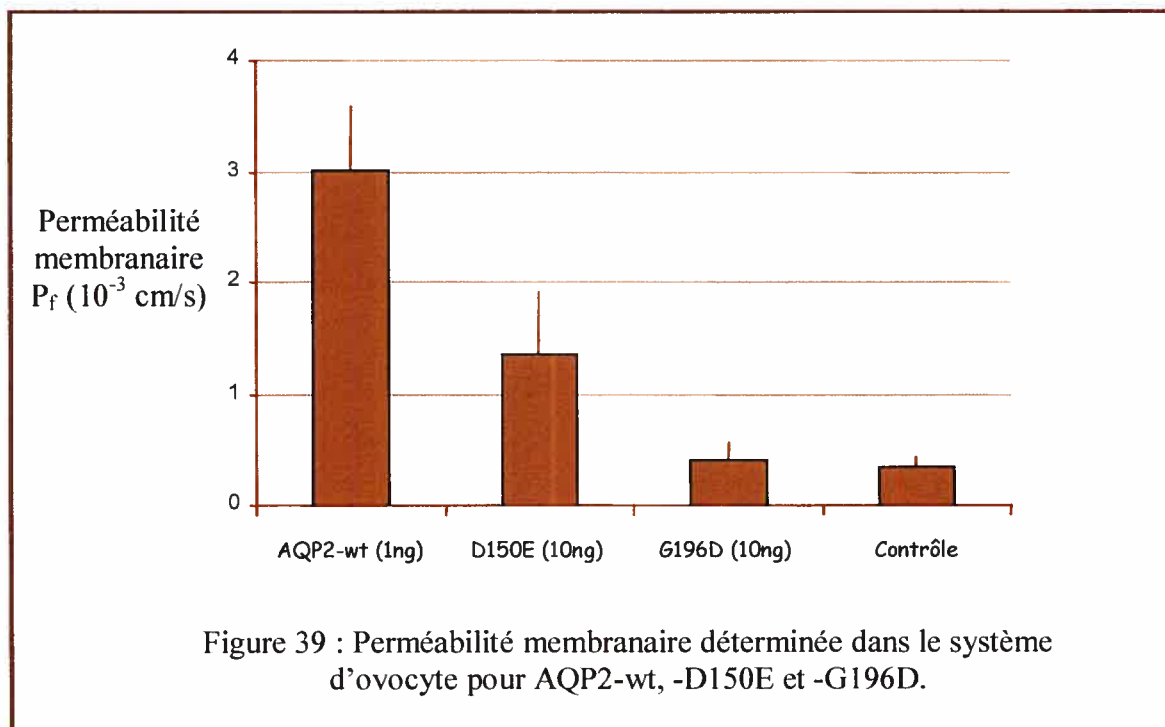
la totalité des protéines synthétisées sont intracellulaires et sont totalement retenus lors de leur trafic vers la membrane plasmique.



Trois jours après l'injection d'ARNc, le transport de l'eau est déterminé en utilisant un choc osmotique de 20 mOsm alors que dans certaines publications, les chocs osmotiques peuvent atteindre jusqu'à 180 mOsm (Marr, 2002). Le système d'ovocyte est moins perturbé lors de ce choc et des variations plus fines peuvent être observées (fig.35).



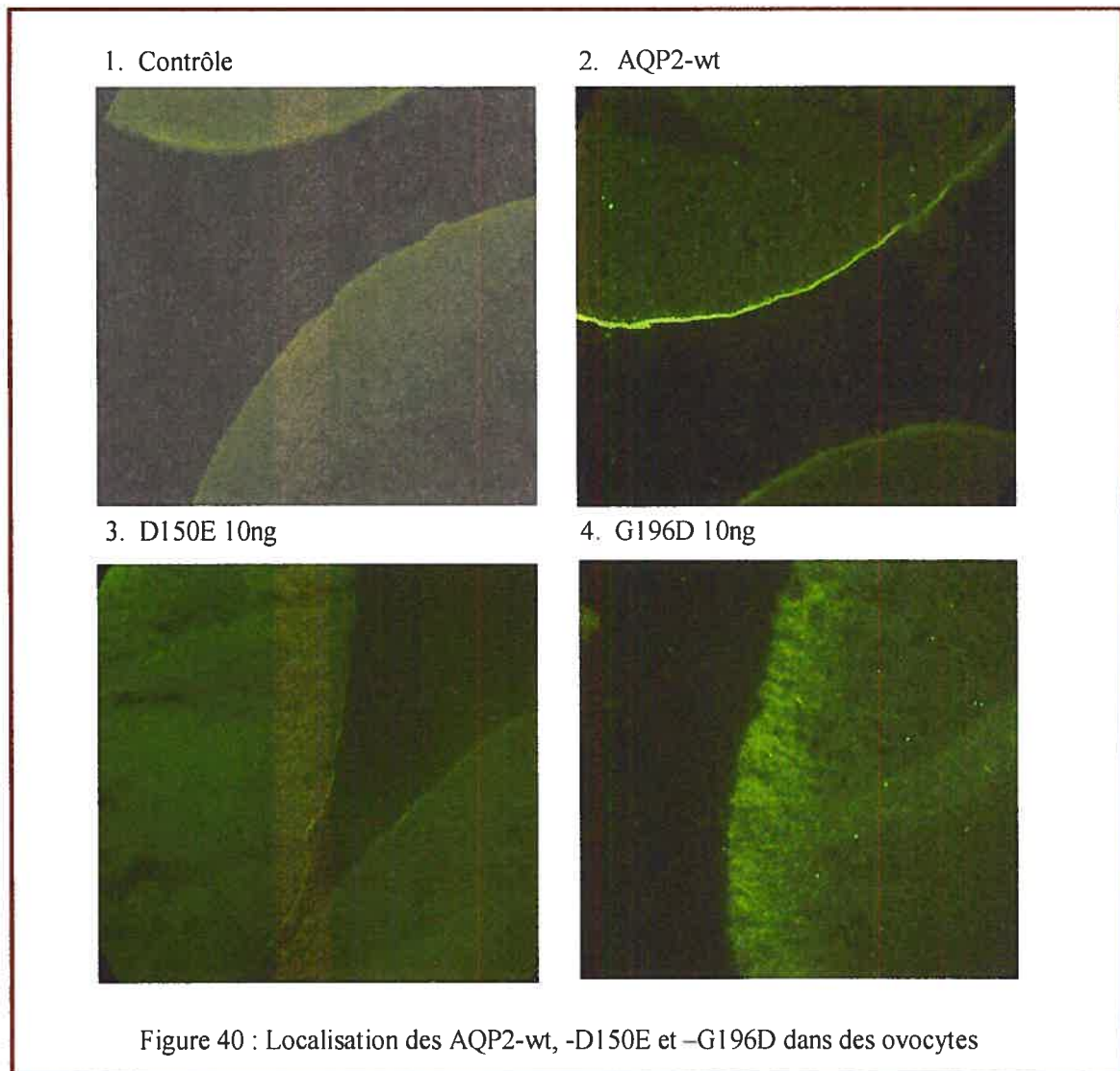
Les analyses du transport de l'eau révèlent une fonctionnalité partielle pour l'AQP2-D150E ($P_f = 1,3 \pm 0,5 \cdot 10^{-3} \text{cm.s}^{-1}$) comparé à l'AQP2-wt ($P_f = 3 \pm 0,5 \cdot 10^{-3} \text{cm.s}^{-1}$) (fig.35). Alors que la perméabilité membranaire de l'AQP2-G196D est identique à celle des ovocytes non injectés correspondant au contrôle ($P_f = 0,4 \pm 0,1 \cdot 10^{-3} \text{cm.s}^{-1}$). Ce mutant n'est pas fonctionnel dans ce système d'expression.



3) Localisation cellulaire des mutants d'AQP2 dans les ovocytes

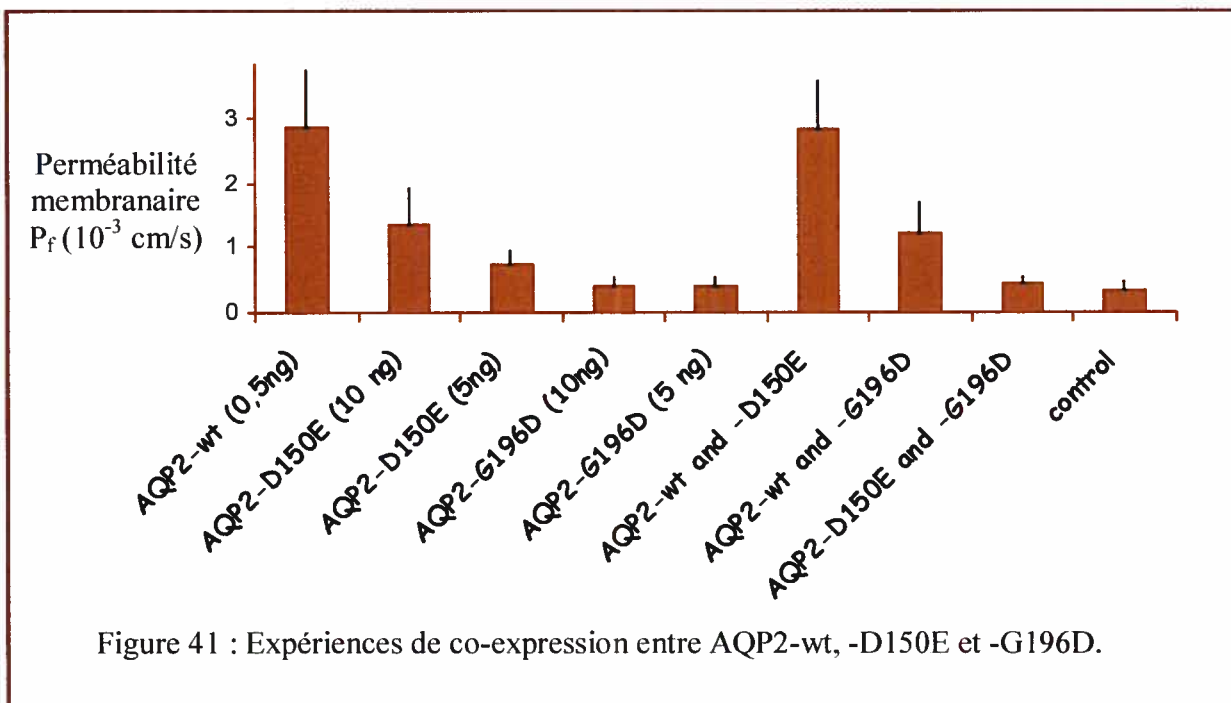
Afin d'identifier la localisation des mutants d'AQP2 au niveau des ovocytes, des expériences d'immunofluorescence sont présentées. En ce qui concerne l'AQP2-wt, son expression est localisée au niveau de la membrane plasmique avec un niveau important du signal (fig.37). Les protéines d'AQP2-G196D ont un signal diffus à l'intérieur de la

cellule et aucune présence au niveau de la membrane plasmique n'est à noter. Par opposition, une partie des protéines d'AQP2-D150E est localisée à la membrane plasmique (environ 10%) et le reste des protéines sont présentes de manière diffuse à l'intérieur de la cellule.



4) Expérience de co-expression : interaction entre les mutants et l'AQP2 -wt?

Afin de comprendre les phénotypes des différents patients de la famille d'origine espagnole, nous avons expérimenté des expériences de co-injection entre les mutants et l'AQP2-wt mais aussi entre D150E et G196D. Pour déterminer les interactions possibles entre les différentes protéines, des expériences de perméabilité membranaire ont été mises en œuvre. Les résultats montrent que lors d'une co-injection entre l'AQP2-wt et l'AQP2-D150E (fig.38), il n'y a pas de modifications de la perméabilité membranaire, le niveau est identique à l'AQP2-wt (AQP2-wt : $P_f = 2,87 \pm 0,85 \cdot 10^{-3} \text{ cm.s}^{-1}$ et AQP2-wt/D150E : $P_f = 2,84 \pm 0,72 \cdot 10^{-3} \text{ cm.s}^{-1}$). Par contre, lors de la co-injection AQP2-wt et AQP2-G196D, une diminution notable de la perméabilité membranaire est à souligner ($P_f = 1,2 \pm 0,48 \cdot 10^{-3} \text{ cm.s}^{-1}$). Lors de la co-injection de D150E et G196D, une diminution de la perméabilité membranaire est à noter, la P_f a la même valeur que l'AQP2-G196D.



4) Discussion

Trafic intracellulaire des AQP2

L'AQP2 est, comme d'autres protéines membranaires glycosylées, synthétisée dans le réticulum endoplasmique (RE) où les monomères d'AQP2 sont assemblés en tétramères (Cobbold, 2003). Au niveau de cette organelle, une N-glycosylation est ajoutée à la protéine au niveau du site consensus (N₁₂₃-X-T₁₂₅). Au niveau de chaque tétramères, un seul monomère comporte cette glycosylation (Baumgarten, 1998 ; Hendriks, 2004). Le passage dans l'appareil de Golgi permet une maturation de la glycosylation riche en résidus mannose en une glycosylation dite complexe. La masse de l'AQP2 glycosylée de manière complexe est entre 40 et 45 kD. Les protéines mal repliées sont reconnues par des protéines chaperonnes du RE (permettant le contrôle de la qualité des protéines) et interagissent avec celles-ci (Aridor, 2002 ; Rutishauser, 2002 ; Kim, 1998) empêchant ainsi l'acheminement de la protéine vers sa destination cellulaire. C'est le cas du CFTR Δ 508 qui interagit avec la calnexine au niveau du RE (Cobbold, 2003). Les protéines d'AQP2 mal repliées sont détectées sous forme non-glycosylée (19 kD) et glycosylée riche en résidus mannose (21 kD) (Van Lieburg, 1994). Ce qui indiquerait une rétention de ces protéines au niveau du RE. Les protéines AQP2-wt synthétisées correctement ont un temps de passage très rapide dans le RE donc, dans des expériences de western blot, la forme glycosylée riche en résidus mannose à 21 kD n'est pas visible.

Phénotype des mutants d'AQP2-D150E et -G196D entraînant le DIN

A la différence de T125M (Marr, 2002), les mutations D150E et G196D ne sont pas localisées au niveau du site consensus de glycosylation donc n'altèrent en aucun cas la glycosilation de la protéine car les bandes à 21 kD sont présentes chez les deux mutants (expériences préliminaires avec l'endoglycosidase non fournies) (fig.34). D150E et G196D présentent aussi la bande à 19 kD correspondant à la forme non glycosylée de la protéine.

La mutation D150E présentant une baisse de fonctionnalité, une bande glycosilée à 21 kD ainsi qu'un marquage plasmiq ue faible est considérée comme partiellement fonctionnelle, comme la mutation A47V (Marr, 2002). Sa perte partielle de fonction serait due à une rétention au niveau du RE et non à une perte de fonction comme telle. En ce qui concerne G196D, les expériences montrent une perte totale de sa fonctionnalité qui serait due à une rétention probable dans le RE, comme la mutation P185A qui a les mêmes caractéristiques (Marr, 2002). De plus, G196D est exclusivement localisée à l'intérieur de la cellule confirmant les expériences de fonctionnalité.

Lors des expériences de western blot, des bandes de hauts poids moléculaires ont été mises en évidence pour D150E et G196D. Comme d'autres protéines CFTR Δ 508 (Cobbold, 2003) ou encore certains mutants de la tyrosinase qui se lient à la calnexine et/ou à la calreticuline (Halaban, 2000), les mutants D150E et G196D pourraient se lier avec des protéines spécifiques du RE, des chaperonnes, nécessaires dans le repliement des protéines et jouant un rôle de contrôle de la qualité.

Mais cette étude n'explique pas le syndrome de DIN sévère présent chez le patient hétérozygote composé.

Hétérotétramérisation entre les mutants et l'AQP2-wt ?

La co-expression de AQP2-D150 et AQP2-wt ne montre pas de différence significative de la perméabilité membranaire comparé à l'AQP2-wt seule comme les mutants L22V et C181W (Canfield, 1997). Si il y avait eu une interaction entre ces deux protéines, on aurait du voir une augmentation ou une diminution de la perméabilité membranaire car vu la stœchiométrie, la majorité des hétérotétramères posséderait un seul monomère d'AQP2-wt et 3 monomères d'AQP2-D150E. Donc, si l'AQP2-D150E était dominant négatif, il interagirait et retiendrait l'AQP2-wt dans des organites cytoplasmiques et l'on constaterait une diminution de la perméabilité membranaire. Par contre, si l'AQP2-wt formait des tétramères avec l'AQP2-D150E, elle l'entraînerait vers la membrane plasmique et la perméabilité membranaire augmenterait de façon significative. Il se peut aussi que l'AQP2-D150E soit exprimée que sous forme de monomères comme R187C (Kamsteeg, 1999) et que lors d'une co-expression, l'AQP2-D150E n'interagirait pas avec la forme sauvage de l'AQP2. A ce niveau, nous pensons qu'il n'existe pas d'interaction entre ce mutant D150E et l'AQP2-wt mais des expériences plus poussées devraient nous permettre de le déterminer.

En ce qui concerne la co-expression l'AQP2-wt et de l'AQP2-G196D, on constate une diminution significative de la perméabilité membranaire. Ces résultats laissent penser que l'AQP2-G196D interagirait avec l'AQP2-wt et la retiendrait à l'intérieur de la cellule ce qui entraînerait une perte de fonction due à un mauvais adressage cellulaire.

La mutation G196D serait donc dominante négative. Il en est de même lors de la co-expression de l'AQP2-G196D et l'AQP2-D150E. Cette mutation ressemblerait à E258K qui séquestre l'AQP2-wt et empêche le cheminement de l'AQP2-wt vers la membrane apicale ; la perte de fonction est due à un mauvais cheminement intracellulaire (Kamsteeg, 1999).

5) Conclusions et perspectives

Les deux mutations présentées D150E et G196D conférant le DIN autosomal seraient retenues dans le RE, totalement pour G196D et partiellement pour D150E, sous la forme glycosylée riche en résidus mannose de 21 kD. D150E n'interagirait pas avec la forme sauvage par contre G196D aurait un effet dominant négatif en retenant l'AQP2-wt à l'intérieur de la cellule. Nous pouvons voir que les expériences présentées ci-dessus corrélerent avec le phénotype des différents patients, et que le système d'expression dans des ovocytes de *Xenopus laevis* est un système d'expression permettant de reproduire les phénotypes de l'AQP2. Les résultats obtenus grâce aux techniques de western blot, d'immunofluorescence et de perméabilité membranaire corrélerent avec le phénotype du patient et entre elles aussi.

Des expériences dans des cellules polarisées permettraient de localiser les deux mutants au niveau cellulaire ainsi que lors de la co-expression avec l'AQP2-wt et entre les deux mutants. De plus, l'étude du trafic intracellulaire des hétérotétramères permettrait de voir leur devenir au sein de la cellule, mais aussi voir s'il y a un adressage à la membrane basolatérale au lieu de la membrane apicale. L'analyse des interactions possibles des deux mutants avec des protéines chaperonnes du RE serait à

faire afin de pouvoir, à plus long terme, trouver des moyens de sauvetage pour les protéines mal repliées. L'étude des protéines mutantes de l'AQP2 permet de recenser les divers trafics intracellulaires des différents mutants et offre ainsi la possibilité d'avoir une meilleure compréhension du diabète insipide néphrogénique autosomal.

Bibliographie

- Adrior M. and L.A. Hannan, Traffic jam II : an update of diseases of intracellular transport (2002) *Traffic* 3:781-790
- Agre P., Bonhivers M. and M.J. Borgnia, The aquaporins, blueprints for cellular plumbing systems (1998) *J. Biol. Chem.* 273(24):14659-62
- Agre P., King L.S., Yasui M., Guggino W.B., Ottersen O.P., Fujiyoshi Y., Engel A. and S. Nielsen, Aquaporin water channels - from atomic structure to clinical medicine (2002) *J. Physiol.*, 542(1):3-16
- Arthus M.F., Lonergan M., Crumley M.J., Naumova A.K., Morin D., De Marco L.A., Kaplan B.S., Robertson G.L., Sasaki S., Morgan K., Bichet D.G. and T.M. Fujiwara, Report of 33 novel AVPR2 mutations and analysis of 117 families with X-linked nephrogenic diabetes insipidus (2000) *J. Am. Soc. Nephrol.* 11(6):1044-1054
- Barat C., Simpson L. and E. Breslow, Properties of human vasopressin precursor constructs: inefficient monomer folding in the absence of copeptin as a potential contributor to diabetes insipidus (2004) *Biochemistry* 43(25):8191-203
- Baumgarten R., Van De Pol MH., Wetzels JF., Van Os CH. And PM. Deen, Glycosylation is not essential for vasopressin-dependent routing of aquaporin-2 in transfected Madin-Darby canine kidney cells (1998) *J. Am. Soc. Nephrol.* 9(9):1553-9
- Berl T. And G.L. Robertson, Pathophysiology of water metabolism (2000) *The kidney* Vol1 6th ed.Chap.20:866-924
- Bi GQ., Morris RL., Liao G., Alderton JM., Scholey JM. and RA. Steinhart, Kinesin- and muosin-driven steps of vesicles recruitment for Ca²⁺-mediated exocytosis (1997) *J. Cell. Biol.* 138:99-1008
- Bichet DG., Nephrogenic diabetes insipidus (1998) *Am. J. Med.* 105(5):431-42
- Bichet DG, Hendy GN, Lonergan M, Arthus MF, Ligier S, Pausova Z, Kluge R, Zingg H, Saenger P, Oppenheimer E, et al., X-linked nephrogenic diabetes insipidus: from the ship Hopewell to RFLP studies (1992) *Am. J. Hum. Genet.* 51(5):1089-1102
- Bichet DG., Turner M. and D. Morin, Vasopressin receptor mutations causing nephrogenic diabetes insipidus (1998) *Proc. Assoc. Am. Physicians.* 110(5):387-94
- Bichet DG. and M. Zellweger, Nephrogenic diabetes insipidus (2003) *Enc. Med.*
- Bissonnette P., Noel J., Coady M.J. and JY. Lapointe, Functional expression of tagged

- human Na⁺-glucose cotransporter in *Xenopus laevis* oocytes (1999) *J. Physiol.* 520 Pt 2:359-71
- Bradbury NA. and RJ. Bridges, Role of membrane trafficking in plasma membrane solute transport (1994) *Am. J. Physiol.* 267(1 Pt 1):C1-24
 - Brewster UC. and MA. Perazella, The renin-angiotensin-aldosterone system and the kidney: effects on kidney disease (2004) *Am. J. Med.* 116(4):263-72.
 - Brown D., Katsura T. and CE.Gustafson, Cellular mechanisms of aquaporin trafficking (1998) *Am. J. Physiol.* 275(3 Pt 2):F328-31
 - Canfield MC., Tamarappoo BK., Moses AM., Verkman AS. And EJ. Holtzman, Identification and characterization of aquaporin-2 water channel mutations causing nephrogenic diabetes insipidus with partial vasopressin response (1997) *Hum. Mol. Genet.* 6(11):1865-71
 - Cobbold C., Monaco AP., Sivaprasadarao A. and S Ponnambalam, Aberrant trafficking of transmembrane proteins in human disease (2003) *Trends Cell. Biol.* 13(12):639-647
 - Cooper M. F. Regulation and organization of adenylyl cyclases and cAMP (2003) *Biochem. J.* 375 (517–529)
 - Dell'Acqua ML. and JD. Scott, Protein kinase A anchoring proteins (1997) *J. Biol. Chem.* 272:12881-122884
 - de Mattia F., Savelkoul PJ., Bichet DG., Kamsteeg EJ., Konings IB., Marr N., Arthus MF., Lonergan M., van Os CH., van der Sluijs P., Robertson G. and PM. Deen, A novel mechanism in recessive nephrogenic diabetes insipidus: wild-type aquaporin-2 rescues the apical membrane expression of intracellularly retained AQP2-P262L (2004) *Hum. Mol. Genet.* 13(24):3045-56
 - Deen PM., Croes H., van Aabel RA., Ginsel LA. and CH. Van Os, Water channels encoded by mutant aquaporin-2 genes in nephrogenic diabetes insipidus are impaired in their cellular routing (1995) *J. Clin. Invest.* 95(5):2291-6
 - Deen PM., Weghuis DO., Sinke RJ., Geurts van Kessel A., Wieringa B. and CH. van Os, Assignment of the human gene for the water channel of renal collecting duct Aquaporin 2 (AQP2) to chromosome 12 region q12-->q13 (1994) *Cytogenet. Cell. Genet.* 66(4):260-2
 - Dermot M. and F. Cooper, Regulation and organization of adenylyl cyclases and cAMP (2003) *Biochem. J.* 375:517–529

- Ecelbarger CA., Terris J., Frindt G., Echevarria M., Marples D., Nielsen S. and MA. Knepper, Aquaporin-3 water channel localization and regulation in rat kidney (1995) *Am. J. Physiol.* 269(5 Pt 2):F663-72
- Franki N., Macaluso F., Schubert W., Gunther L. and RM. Hays, Water channel-carrying vesicles in the rat IMCD contain cellubrevin (1995) *Am. J. Physiol.* 269(3 Pt 1):C797-801
- Frokiaer J., Marples D., Knepper M.A. and S. Nielsen, Bilateral ureteral obstruction downregulates expression of vasopressin-sensitive AQP-2 water channel in rat kidney (1996) *Am. J. Physiol.* 270:F657-F668
- Fushimi K., Sasaki S. and F. Marumo, Phosphorylation of serine 256 is required for cAMP-dependent regulatory exocytosis of the aquaporin-2 water channel (1997) *J. Biol. Chem.* 272(23):14800-4
- Fushimi K., Uchida S., Hara Y., Hirata Y., Marumo F. and S. Sasaki, Cloning and expression of apical membrane water channel of rat kidney collecting tubule (1993) *Nature* 361(6412):549-52
- Gagnon MP., Bissonnette P., Deslandes LM., Wallendorff B. and JY. Lapointe, Glucose accumulation can account for the initial water flux triggered by Na⁺/glucose cotransport (2004) *Biophys. J.* 86(1 Pt 1):125-33
- Gether U. Uncovering molecular mechanism involved in activation of G-protein coupled receptor (2000) *Endocrine Rev.* 21(1):90-113
- Gouraud S., Laera A., Calamita G., Carmosino M., Procino G., Rossetto O., Mannucci R., Rosenthal W., Svelto M., and G. Valenti G., Functional involvement of VAMP / synaptobrevin-2 in cAMP-stimulated aquaporin 2 translocation in renal collecting duct cells (2002) *J. Cell. Sci.* 115(Pt 18):3667-74
- Guyton AC. and JE. Hall, The kidney and body fluids (2000) *Textbook of Medical Physiology* 10th ed. 5:280-379
- Halaban R., Endoplasmic reticulum retention is a common defect associated with tyrosinase-negative albinism (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97:5889-5894
- Harris HW., Jo I., Amendt-Raduege AM., Majewski RR. And TG. Hammond, Rat kidney papilla contains abundant Synaptobrevin protein that participates in the fusion of antidiuretic hormone-regulated water channel-containing endosomes in vitro (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92:1876-1880

- Hebert TE., Moffett S., Morello JP., Loisel TP., Bichet DG., Barret C. and M. Bouvier, A peptide derived from a β 2-adrenergic receptor transmembrane domain inhibits both receptor oligomerization and activation (1996) *J. Biol. Chem.* 271:16384-16392
- Hendriks G., Koudijs M., van Balkom BW., Oorschot V., Klumperman J., Deen PM., and P. van der Sluijs, Glycosylation is important for cell surface expression of the water channel aquaporin-2 but is not essential for tetramerization in the endoplasmic reticulum (2004) *J. Biol. Chem.* 279(4):2975-83
- Heymann J.B., Agre P. And A. Engel, Progress on the structure and function of aquaporin 1 (1998) *J. Struct. Biol.* 121(2):191-206
- Jeunemaitre X. and AP. Gimenez-Roqueplo, Genetics and arterial hypertension: 3 approaches to decode a complex disease (2002) *Bull. Acad. Natl. Med.* 186(9):1595-606; discussion 1606-9
- Jo I., Ward DT., Baum MA., Scott JD., Coghlan VM., Hammond TG. and HW. Harris, AQP2 is a substrate for endogenous PP2B activity within an inner medullary AKAP-signaling complex (2001) *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 281(5):F958-65
- Jung JS., Preston GM., Smith BL., Guggino WB. and P. Agre, Molecular structure of the water channel through aquaporin CHIP. The hourglass model (1994) *J. Biol. Chem.* 269(20):14648-54
- Kamsteeg EJ., Bichet DG., Konings IB., Nivet H., Lonergan M., Arthus MF., van Os CH. and PM. Deen, Reversed polarized delivery of an aquaporin-2 mutant causes dominant nephrogenic diabetes insipidus (2003) *J. Cell. Biol.* 163(5):1099-109
- Kamsteeg EJ. and PM. Deen, Detection of aquaporin-2 in the plasma membranes of oocytes: a novel isolation method with improved yield and purity (2001) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282(3):683-90
- Kamsteeg EJ., Wormhoudt TA., Rijss JP., van Os CH. and PM. Deen, An impaired routing of wild-type aquaporin-2 after tetramerization with an aquaporin-2 mutant explains dominant nephrogenic diabetes insipidus (1999) *EMBO J.* 18(9):2394-400
- Kim PS. And P. Arvan, Endocrinopathies in the family of endoplasmic reticulum (er) storage diseases : Disorders of rotein trafficking and the role of er molecular chaperones (1998) *Endocr. Rev.* 19:173-202
- Klussmann E., Tamma G., Lorenz D., Wiesner B., Maric K., Hofmann F., Aktories K., Valenti G. and W.Rosenthal, An inhibitory role of Rho in the vasopressin-mediated translocation of aquaporin-2 into cell membranes of renal principal cells (2001) *J. Biol.*

Chem. 276(23):20451-7

- Knoers NV, de Jong JC., Meij IC., Van Den Heuvel LP. and R.J. Bindels, Genetic renal disorders with hypomagnesemia and hypocalciuria (2003) *J. Nephrol.* 16(2):293-6
- Kokko JP and Jr FC. Rector, Countercurrent multiplication system without active transport in inner medulla (1972) *Kidney Int.* 2:214-233
- Lande MB., Jo I., Zeidel ML., Somers M. and HW. Jr Harris, Phosphorylation of aquaporin-2 does not alter the membrane water permeability of rat papillary water channel-containing vesicles (1996) *J. Biol. Chem.* 271(10):5552-7
- Mandon B., Chou CL., Nielsen S. and MA. Knepper, Syntaxin-4 is localized to the apical plasma membrane of rat renal collecting duct cells: possible role in aquaporin-2 trafficking (1996) *J. Clin. Invest.* 98(4):906-13
- Marples D., Christensen S., Christensen E.I., Ottosen P.D. and S. Nielsen, Lithium-induced downregulation of aquaporin-2 water channel expression in rat kidney medulla. (1995) *J. Clin. Invest.* 95:1838–1845
- Marples D., Frokiaer J., Dorup J., Knepper M.A. and S. Nielsen, Hypokalemia-induced downregulation of aquaporin-2 water channel expression in rat kidney medulla and cortex (1996) *J. Clin. Invest.* 97:1960–1968
- Marples D., Frokiaer J. and S. Nielsen, Long-term regulation of aquaporins in the kidney (1999) *Am. J. Physiol.* 276(3 Pt 2):F331-F339
- Marples D., Schroer TA., Ahrens N., Taylor A., Knepper MA. and S. Nielsen, Dinein and dynactin colocalize with AQP2 water channel in intracellular vesicles from kidney collecting duct (1998) *Am. J. Physiol.* 274(2):F384-F394
- Marples D., Smith J. and S. Nielsen, Myosin-1 is associated with associated with AQP2 water channel bearing vesicles in rat kidney and may be involved in the antidiuretic response to vasopressin (Abstract) (1997) *J. Am. Soc. Nephrol.* 8:62
- Marr N., Bichet DG., Lonergan M., Arthus MF., Jeck N., Seyberth HW., Rosenthal W., van Os CH., Oksche A. and PM. Deen, Heteroligomerization of an Aquaporin-2 mutant with wild-type Aquaporin-2 and their misrouting to late endosomes/lysosomes explains dominant nephrogenic diabetes insipidus (2002) *Hum. Mol. Genet.* 11(7):779-89
- Melmed S. *The pituitary* 2th ed. (2002)
- Mohr E., Morris JF. and D. Richter, Differential subcellular mRNA targeting: deletion of a single nucleotide prevents the transport to axons but not to dendrites of rat hypothalamic magnocellular neurons (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92(10):4377-81

- Mohr E. and D. Richter, Subcellular Vasopressin mRNA Trafficking and Local Translation in Dendrites (2004) *J. Neuroendocrinol.* 16(4):333-339
- Morello JP. and DG. Bichet, Nephrogenic diabetes insipidus (2001) *Annu. Rev. Physiol.* 63:607-630
- Mouillac B., Chini B., Balestre M.N., Elands J., Trumpp-Kallmeyer S., Hoflack J., Hibert M., Jard S. and C. Barberis, The binding site of neuropeptide vasopressin V1a receptor. (1995) *J. Biol. Chem.* 270:25771–25777
- Murata K., Mitsuoka K., Hirai T., Walz T., Agre P., Heymann J.B., Engel A. and Y. Fujiyoshi, Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. (2000) *Nature* 407(6804):599-605
- Nielsen S., Chou CL., Marples D., Christensen EI., Kishore BK. and MA. Knepper, Vasopressin increases water permeability of kidney collecting duct by inducing translocation of aquaporin-CD water channels to plasma membrane (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92(4):1013-7
- Nielsen S., DiGiovanni SR., Christensen EI., Knepper MA. and HW. Harris, Cellular and subcellular immunolocalization of vasopressin-regulated water channel in rat kidney 1993 *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90(24):11663-7
- Nielsen S., Frøkiær J., Marples D., Kwon T.H., Agre P. and M.A. Knepper, Aquaporins in the Kidney: From Molecules to Medicine (2002) *Physiol. Rev.* 82:205-244
- Nielsen S., Kwon TH., Christensen BM., Promeneur D., Frøkiær J. and D. Marples, Physiology and pathophysiology of renal aquaporins (1999) *J. Am. Soc. Nephrol.* 10(3):647-663.
- Nielsen S., Smith BL., Christensen EI., Knepper MA. And P. Agre, CHIP28 water channels are localized in constitutively water-permeable segments of the nephron (1993) *J. Cell. Biol.* 120(2):371-83
- Noda Y., Horikawa S., Katayama Y. and S. Sasaki, Water channel aquaporin-2 directly binds to actin (2004) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 322(3):740-5
- Pevsner J., Hsu SC., Braun JE., Calakos N., Ting AE., Bennett MK. and RH. Scheller Specificity and regulation of a synaptic vesicle docking complex (1994) *Neuron* 13(2):353-61
- Pierce KL., Premont RT. and R.J. Lefkowitz, Seven-transmembrane receptors (2002) *Nature Rev.* 3:639-650

- Preston GM., Carroll TP., Guggino WB. and P. Agre, Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein (1992) *Science* 17;256(5055):385-7
- Rao VV., Loffler C., Battey J. and I. Hansmann, The human gene for oxytin-neurophysin I (OXT) is physically mapped to chromosome 20p13 by in situ hybridization (1992) *Cell Genet.* 61:271-273
- Richter D., Molecular events in the expression of vasopressin and oxytin and their cognate receptors (1988) *Am. J. Physiol.* 255:F207-F219
- Rutishauser J. and M. Spies, Endoplasmic reticulum storage diseases (2002) *Swiss. Med. Wkly.* 132:211-222
- Sands JM., Nacuse M., Baum M., Jo I., Hebert SC., Brown EM. and HW. Harris, Apical extracellular calcium/polyvalent cation-sensing receptor regulates vasopressin-elicited water permeability in rat kidney medullary collecting duct (1997) *J. Clin. Invest.* 99(6):1399-1405
- Scheiman SJ et al. Genetic disorders of renal electrolyte transport (1999) *New. Engl. J. Med.* 340:1177-87
- Schild L., The epithelial sodium channel: from molecule to disease (2004) *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 151:93-107
- Schrier R.W. and M.A. Cadnapaphornchai, Renal aquaporin water channel: from molecules to human disease (2003) *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 81:117-131
- Shayakul C., Smith CP., Mackenzie HS., Lee WS., Brown D. and MA. Hediger, Long-term regulation of urea transporter expression by vasopressin in Brattleboro rats (2000) *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 278(4):F620-7
- Snow BE., Hall RA., Krumins AM., Brothers GM., Bouchard D., Brothers CA., Chung S., Mangion J., Gilman AG., Lefkowitz RJ. and DP. Siderovski, GTPase activating specificity of RGS12 and binding specificity of an alternatively spliced PDZ (PSD-95/Dlg/ZO-1) domain (1998) *J. Biol. Chem.* 273:17749-17755.
- Star RA., Nonoguchi H., Balaban R. and MA. Knepper, Calcium and cyclic adenosine monophosphate as second messengers for vasopressin in the rat inner medullary collecting duct (1988) *J. Clin. Invest.* 81(6):1879-1888
- Tamma G., Klussmann E., Maric K., Aktories K., Svelto M., Rosenthal W. and G. Valenti, Rho inhibits cAMP-induced translocation of aquaporin-2 into the apical membrane of renal cells (2001) *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 281(6):F1092-101

- Tamarappoo BK. and AS. Verkman, Defective aquaporin-2 trafficking in nephrogenic diabetes insipidus and correction by chemical chaperones (1998) *J. Clin. Invest.* 101(10):2257-67
- Terris J., Ecelbarger CA., Marples D., Knepper MA. and S. Nielsen, Distribution of aquaporin-4 water channel expression within rat kidney (1995) *Am. J. Physiol.* 269(6 Pt 2):F775-85
- Terris J., Ecelbarger CA., Nielsen S. and MA. Knepper, Long-term regulation of four renal aquaporins in rats (1996) *Am. J. Physiol.* 271(2 Pt 2):F414-22
- Timmer RT. and JM. Sands, Lithium intoxication (1999) *J. Am. Soc. Nephrol.* 10(3):666-74
- Tsukaguchi H., Shayakul C., V. Berger U., and M.A. Hediger, Urea transporters in kidney: molecular analysis and contribution to the urinary concentrating process (1998) *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 275: F319-F324
- Uchida S., Sasaki S., Fushimi K. and F. Marumo, Isolation of human aquaporin-CD gene (1994) *J. Biol. Chem.* 269(38):23451-5
- Valenti G., Procino G., Liebenhoff, Frigeri A., Benedetti PA., Ahnert-Hilger G., Nurnberg B., Svelto M. and W. Rosenthal, A heterotrimeric G protein of the Gi family is required for cAMP-triggered aquaporin 2 in kidney epithelial cells (1998) *J. Biol. Chem.* 273:22627-22634
- van Balkom BW., Graat MP., van Raak M., Hofman E., van der Sluijs P. and PM. Deen, Role of cytoplasmic termini in sorting and shuttling of the aquaporin-2 water channel (2004) *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 286(2):C372-9.
- van Balkom BW., Savelkoul PJ., Markovich D., Hofman E., Nielsen S., van der Sluijs P. and PM. Deen, The role of putative phosphorylation sites in the targeting and shuttling of the aquaporin-2 water channel (2002) *J. Biol. Chem.* 277(44):41473-9
- van Hoek AN., Yang B., Kirmiz S. and D. Brown, Freeze-fracture analysis of plasma membranes of CHO cells stably expressing aquaporins 1-5 (1998) *J. Membr. Biol.* 165(3):243-54
- Van Lieburg AF., Verdijk MA., Knoers VV., van Essen AJ., Proesmans W., Mallmann R., Monnens LA., van Oost BA., van Os CH. and PM. Deen, Patients with autosomal nephrogenic diabetes insipidus homozygous for mutations in the aquaporin 2 water-channel gene (1994) *Am. J. Hum. Genet.* 55(4):648-52

- Verbavatz JM., Brown D., Sabolic I., Valenti G., Ausiello DA., Van Hoek AN., Ma T., and AS. Verkman, Tetrameric assembly of CHIP28 water channels in liposomes and cell membranes: a freeze-fracture study (1993) *J. Cell. Biol.* 123(3):605-18
- Wade JB., Stetson DL. and SA. Lewis, ADH action: evidence for a membrane shuttle mechanism (1981) *Ann. NY Aca. Sci.* 372:106-172
- Yasui M., Kwon TH., Knepper MA., Nielsen S. and P. Agre, Aquaporin-6: An intracellular vesicle water channel protein in renal epithelia (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96(10):5808-13
- Yasui M., Zelenin SM., Celsi G. and A. Aperia, Adenylate cyclase-coupled vasopressin receptor activates AQP2 promoter via a dual effect on CRE and AP1 elements (1997) *Am. J. Physiol.* 272(4 Pt 2):F443-50