

Université de Montréal

**Caractéristiques cardiométaboliques d'une souris inactivée pour le
cotransporteur potassium-chlorure de type 3**

par

Alexandre Garneau

École de kinésiologie et des sciences de l'activité physique, Faculté de médecine

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Ph. D.
en sciences de l'activité physique

novembre 2021

© Alexandre Garneau, 2021

Université de Montréal
Unité académique : École de kinésiologie et des sciences de l'activité physique,
Faculté de médecine

Cette thèse intitulée
**Caractéristiques cardiométaboliques d'une lignée de souris inactivée pour le
cotransporteur potassium-chlorure de type 3**

Présentée par
Alexandre Garneau

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes

Mickaël Begon
Président-rapporteur

Julie Lavoie
Directrice de recherche

Paul Isenring
Codirecteur

Raynald Bergeron
Membre du jury

Mathieu Laplante
Examineur externe

Résumé

La polyneuropathie sensitivomotrice héréditaire (PNSMH) est une maladie rare qui entraîne un ralentissement du développement moteur et mental, une déficience sensitivomotrice et des syndromes neuropsychiatriques, et qui s'accompagne souvent d'une agénésie du corps calleux. Par ailleurs, plusieurs évaluations rapportent une petite stature ou une masse corporelle anormalement basse chez les patients.

La PNSMH est causée par des mutations perte de fonction du cotransporteur K^+-Cl^- de type 3 (KCC3). Des évaluations cliniques détaillées et la caractérisation de souris inactivées pour *Kcc3* (*Kcc3^{KO}*) ont permis d'établir qu'un défaut d'export K^+-Cl^- cause les atteintes neurologiques anatomiques et fonctionnelles dans la maladie. Chez les souris *Kcc3^{KO}*, des manifestations extraneurologiques ont également été relevées : masse corporelle réduite, pression artérielle (PA) élevée, polydipsie et polyurie. Puisque la physiopathologie des désordres extraneurologiques découlant de la perte de fonction de *KCC3* reste incomplètement décrite, mes travaux avaient pour objectif d'en comprendre les mécanismes sous-jacents en utilisant un modèle *Kcc3^{KO}*.

Une caractérisation initiale de notre lignée de souris *Kcc3^{KO}* constitutive et systémique a montré des anomalies vasculaires et cardiaques accompagnant une élévation de PA diastolique. Cette lignée affichait également une polydipsie et une polyurie isoosmotique, de même qu'une réduction de masse corporelle et d'adiposité sans réduction d'apport alimentaire.

Une caractérisation métabolique détaillée de notre modèle a ensuite permis de révéler des réductions de masse grasse et de masse maigre. Cette minceur résulte sûrement en partie des augmentations d'activité locomotrice et de dépense énergétique mesurées. Une nette amélioration de la tolérance au glucose a aussi été trouvée, ainsi que des concentrations réduites de triacylglycérols plasmatiques. Enfin, nous avons noté que notre modèle est résistant à l'obésité induite par une diète hyperlipidique et affiche une élévation concomitante de l'expression d'enzymes lipogéniques et lipolytiques dans le gras viscéral, engendrant potentiellement une dissipation calorique.

En revisitant la fonction cardiovasculaire dans notre modèle par des méthodes de pointe, nous n'avons pas observé de changement de PA ni de différence de réactivité artériolaire en conditions basales, mais nous avons noté une élévation de distensibilité artériolaire passive. Chez notre modèle, nous n'avons pas non plus remarqué de sensibilité particulière de la PA au sel alimentaire, mais une excrétion urinaire fortement accrue de solutés sous diète hypersodée ainsi qu'une préférence marquée pour le sel. Ces observations sont compatibles avec un défaut de réabsorption hydrosodée par le rein pouvant d'ailleurs prévenir les élévations de PA.

En somme, nos travaux ont permis de mieux comprendre les atteintes cardiométaboliques qui accompagnent le tableau neurologique d'un modèle murin de PNSMH. Nous avons notamment relevé des bénéfices inattendus dans le métabolisme glucidique et lipidique suivant l'inactivation de *Kcc3*. Nous soupçonnons également que l'absence de KCC3 dans le rein engendre une fuite ionique urinaire s'accroissant sous diète hypersodée et pouvant influencer la PA en limitant l'expansion volémique. Nos observations d'anomalies pléiotropiques liées à l'inactivation de *Kcc3* font de ce gène une nouvelle cible pharmacologique potentielle et justifient la nécessité d'étudier l'anatomophysiologie cardiométabolique des patients atteints de PNSMH de façon plus approfondie.

Mots-clés : polyneuropathie sensitivomotrice héréditaire, modèle animal, cotransporteur K-Cl de type 3, homéostasie du glucose, métabolisme des lipides, dépense énergétique, hémodynamique, régulation hydrosodée, fonction rénale, réactivité artériolaire

Abstract

Hereditary motor and sensory neuropathy (HMSN) is a rare disease that leads to delayed motor and mental development, loss of sensory and motor function and neuropsychiatric syndromes, and that is often accompanied by partial or complete agenesis of the corpus callosum. Additionally, several cases of short stature or low body weight have been reported in patients.

HMSN is caused by loss-of-function mutations in K^+ - Cl^- cotransporter type 3 (KCC3). Detailed clinical reports and characterizations of mice inactivated for *Kcc3* (*Kcc3*^{KO}) have allowed to establish that defective K^+ - Cl^- export causes the anatomical and functional neurologic impairments in the disease. In *Kcc3*^{KO} mice, extra-neurological abnormalities have also been noted: lower body weight, high blood pressure (BP), polydipsia and polyuria. Because the pathophysiology of extra-neurological traits arising from *KCC3* loss of function remains incompletely described, my work aimed at understanding the mechanisms at play using a *Kcc3*^{KO} model.

An initial characterization of a constitutive and systemic *Kcc3*^{KO} mouse line showed vascular and cardiac abnormalities along with a rise in diastolic BP. This model also showed polydipsia and iso-osmolar polyuria along with reduced body weight and adiposity but no decrease in food intake.

A detailed metabolic characterization of our model further revealed reductions in fat and lean body masses. This leanness results certainly in part from increased locomotor activity and energy expenditure as measured. A marked improvement in glucose tolerance was also found in addition to lower plasmatic triglyceride concentrations. Lastly, we also demonstrated that our model is resistant to high-fat-diet-induced obesity and shows concomitant increase in expression of both lipogenic and lipolytic enzymes in visceral fat, thereby potentially generating caloric dissipation.

When revisiting the cardiovascular function of our model with cutting-edge methods, we measured normal BP and arteriolar reactivity in baseline conditions. However, we noted an increase in passive arteriolar distensibility. In our model, we did not notice sensitivity of BP to dietary salt but found a marked increase in urinary solute excretion under high-salt diet and a strong preference for salt. These observations are consistent with a defect in hydromineral reabsorption by the nephron that may prevent BP from rising.

In short, our work allowed to better understand the cardiometabolic characteristics that accompany the neurologic portrait of an HMSN mouse model. In particular, we noted unexpected benefits in carbohydrate and lipid metabolism upon *Kcc3* inactivation. We also suspect that KCC3 ablation in the kidney leads to urinary hydromineral wasting that can be more salient under dietary salt loading and can influence BP by blunting extracellular volume expansion. The pleiotropic abnormalities arising from *Kcc3* inactivation identify this gene as a new potential pharmacological target and argue for improving efforts at describing the cardiometabolic features of patients with HMSN.

Keywords: hereditary motor and sensory neuropathy, animal model, K-Cl cotransporter type 3, glucose homeostasis, lipid metabolism, energy expenditure, hemodynamics, hydromineral regulation, renal function, arteriolar reactivity

Table des matières

Résumé	5
Abstract	7
Table des matières	9
Liste des tableaux	19
Liste des figures	21
Liste des sigles et abréviations	23
Remerciements	25
Avant-propos	27
Introduction	29
1. Le cotransporteur potassium-chlorure de type 3 et les systèmes de transport membranaire .	30
1.1. Typologie des protéines de transport membranaire	31
1.1.1. Canaux.....	32
1.1.2. Transporteurs.....	32
1.1.3. Pompes	33
1.2. La famille des cotransporteurs cation-chlorure	34
1.3. Le cotransporteur potassium-chlorure de type 3 chez les mammifères	36
1.3.1. Découverte	36
1.3.2. Structure du gène, des transcrits et des produits protéiques.....	37
1.3.3. Sites d'expression dans l'organisme	41
1.3.4. Activité de transport	42
1.3.5. Régulation la fonction et des étapes en amont	43
1.3.5.1. Expression génétique.....	44
1.3.5.2. Traduction	44

1.3.5.3. Assemblage des structures tertiaire et quaternaire	44
1.3.5.4. Adressage et incorporation dans la membrane.....	45
1.3.5.5. Modulateurs allostériques endogènes ou exogènes.....	45
1.3.5.6. Modifications posttraductionnelles	46
1.3.6. Fonctions cellulaires.....	47
1.3.6.1 Cotransport K^+ - Cl^-	47
1.3.6.2 Transport transépithélial.....	49
1.3.6.3 Régulation du volume cellulaire	50
1.3.6.4 Implication dans la croissance et la prolifération cellulaires	50
1.3.6.5 Influence sur le potentiel membranaire	50
1.3.6.6 Impact sur d'autres systèmes de transport.....	51
1.3.7. Tableau clinique accompagnant les mutations chez l'humain	51
1.3.7.1. Polyneuropathie sensitivomotrice héréditaire	51
1.3.7.1.1. Découverte.....	51
1.3.7.1.2. Spécificité du diagnostic.....	52
1.3.7.1.3. Prévalence régionale.....	52
1.3.7.1.4. Effets fondateurs.....	52
1.3.7.1.5. Tableau clinique principal et désordres sensitivomoteurs	53
1.3.7.1.6. Autres désordres neurologiques.....	54
1.3.7.1.7. Anomalies anatomiques du système nerveux central	54
1.3.7.1.8. Anomalies histologiques du système nerveux.....	55
1.3.7.1.9. Analyses biochimiques dans le système nerveux	55
1.3.7.1.10. Impact de la temporalité de la perte de fonction	56
1.3.7.1.11. Composante développementale	56
1.3.7.1.12. Faibles masse et taille corporelles	57
1.3.7.1.13. Défauts dans la fonction respiratoire.....	57
1.3.7.1.14. Propriétés des érythrocytes.....	57
1.3.7.2. Neuropathie découlant du gain de fonction.....	58

1.3.8. Fonctions physiologiques	59
1.3.8.1. Fonctions dans le système nerveux	59
1.3.8.1.1 Développement du corps calleux.....	59
1.3.8.1.2 Activité électrique du système nerveux.....	59
1.3.8.1.3. Posture et démarche.....	60
1.3.8.1.4. Activité locomotrice	62
1.3.8.1.5. Audition.....	62
1.3.8.1.6. Nociception	62
1.3.8.1.7. Comportement exploratoire.....	63
1.3.8.1.8. Anatomie et fonction de la plaque motrice.....	63
1.3.8.2. Fonctions extraneurologiques	63
1.3.8.2.1. Transport rénal de solutés et polydipsie	63
1.3.8.2.2. Pression artérielle	64
1.3.8.2.3. Masse corporelle.....	65
1.3.8.2.4. Espérance de vie.....	66
2. Régulation hydrominérale	69
2.1. Régulation du volume cellulaire	70
2.2. Excrétion d'eau et de sel par l'organisme	71
2.3. Apport en eau et en solutés	72
2.3.1. Appétit pour le sel	73
2.3.2. Surcharge sodée et expansion volémique.....	73
2.4. Réabsorption et excrétion de l'eau et des solutés.....	75
2.4.1. Anatomophysiologie du néphron	75
2.4.2. Rôle de KCC3 dans le rein.....	78
2.4.3. Modulation de la filtration, de la réabsorption et de la sécrétion rénales.....	79
2.4.3.1. Mécanismes rénaux intrinsèques.....	79
2.4.3.1.1. Natriurèse de pression	80
2.4.3.1.2. Rétroinhibition tubuloglomérulaire	80
2.4.3.1.3. Équilibre glomérulotubulaire.....	81

2.4.3.2. Système rénine-angiotensine-aldostérone	81
2.4.3.3. Vasopressine.....	82
2.4.3.4. Peptides natriurétiques	82
3. Régulation de la pression artérielle	85
3.1. Zones cibles et désordres de la pression artérielle	86
3.1.1. Hypertension artérielle	86
3.1.2. Hypotension artérielle	88
3.2. Mécanismes de modification de la pression artérielle	89
3.2.1. Mécanismes vasculaires intrinsèques.....	89
3.2.1.1. Tonus vasomoteur	89
3.2.1.2. Autorégulation, compliance et tonus myogénique.....	90
3.2.1.3. Angiogenèse et remodelage vasculaire	91
3.2.2. Mécanismes nerveux.....	93
3.2.3. Mécanismes hormonaux.....	94
3.3. Étude de la fonction cardiovasculaire chez le rongeur.....	96
3.3.1. Monitoring de la pression artérielle chez le rongeur	96
3.3.1.1. Mesure indirecte.....	96
3.3.1.2. Mesure directe par cathétérisme aigu.....	98
3.3.1.3. Mesure directe par cathétérisme chronique et transducteur externe	98
3.3.1.4. Mesure directe par cathétérisme chronique et transducteur externe	99
3.3.2. Évaluation des propriétés des artéioles	101
3.3.2.1. Caractéristiques structurales et mécaniques passives.....	101
3.3.2.2. Réactivité aux agents vasomodulateurs.....	102

4. Métabolisme énergétique	103
4.1. Métabolisme des lipides	104
4.1.1. Mise en réserve des lipides.....	104
4.1.2. Utilisation des lipides	105
4.1.3. Cycle de substrats glycérolipides-acides gras	107
4.2. Métabolisme des glucides	108
4.2.1. Mécanismes assurant l'homéostasie du glucose	108
4.2.2. Implication des cotransporteurs cation-chlorure dans la fonction pancréatique endocrine	110
4.3. Bioénergétique	112
4.3.1. Intrants énergétiques	112
4.3.2. Extrants énergétiques et calorimétrie	113
4.3.2.1. Ventilation de la dépense énergétique.....	113
4.3.2.2. Quantifications énergétiques et calorimétrie directe	115
4.3.2.3. Calorimétrie indirecte.....	115
Objectifs et méthodologie	119
Résultats	121
Article 1 : Ablation of potassium-chloride cotransporter type 3 (<i>Kcc3</i>) in mouse causes multiple cardiovascular defects and isosmotic polyuria.....	121
Abstract	123
Introduction.....	123
Material and Methods.....	125
Source of supplies or equipment	125
Animals	126
Hemodynamic measurements	126
Aortic reactivity.....	127

Echocardiography.....	128
Sample preparation.....	128
Blood, serum, plasma and urine measurements	128
Microscopic studies.....	128
Quantitative PCR (qPCR)	129
Wire hang test.....	129
Statistics	129
Results.....	129
Hemodynamic parameters.....	129
Characterization of isolated thoracic aortas	130
Characterization of the heart	131
Renal function	131
Circulating factors involved in BP control.....	132
Body measurements and lipid profile.....	132
Neurologic assessment	132
Discussion	133
Tables and figures	136
References	149
Article 2 : Increased metabolic rate and lipid wasting in a mouse model of K-Cl cotransporter 3 inactivation are associated with marked leanness and improved metabolic profile	153
Abstract	155
1. Introduction	157
2. Material and methods	158
2.1. Animals	158
2.2. High-fat feeding	158

2.3. Metabolic cages.....	159
2.4. Body composition analysis.....	160
2.5. Oral glucose tolerance test (OGTT).....	160
2.6. Oral lipid tolerance test (OLTT).....	160
2.7. Circulating and tissue parameters.....	160
2.8. Reverse transcription and quantitative PCR.....	160
2.9. Statistical analyses.....	161
3. Results.....	162
3.1. Lower body weight and differences in body composition.....	162
3.2. Increased energy expenditure and locomotor activity.....	162
3.3. Improved glucose tolerance despite lower insulin secretion.....	163
3.4. Lower circulating lipids.....	163
3.5. Resistance to diet-induced obesity.....	164
3.6. Increased expression of fat metabolism enzymes.....	165
4. Discussion.....	167
Tables and figures with captions.....	172
Supplemental figures and tables.....	180
References.....	187
Article 3 : Blood pressure regulation and renal salt handling in a mouse model inactivated for K-Cl cotransporter type 3.....	197
Abstract.....	199
Introduction.....	200
Methods.....	202
Animals.....	202
Radiotelemetric probe implantation and baseline hemodynamic measurements.....	202

Restraint stress test	202
Salt loading protocol	202
Salt preference test	203
Intake measurements	203
Blood collection.	203
Arterial reactivity	204
Plasma renin activity and solute concentration	204
Urinary osmolality.....	204
Urinary solute concentration	204
Statistics	205
Results	206
Baseline hemodynamic parameters	206
Hemodynamic response to restraint stress	206
Reactivity of resistive arteries to vasoactive agents.....	206
Mechanics of resistive arteries	206
Hemodynamics and renal salt and water handling under a dietary sodium overload	207
Salt preference test.	207
Discussion and conclusion	209
Loss of KCC3 is associated with normal-low blood pressures.....	209
Resistive vessels from <i>Kcc3</i> ^{KO} mice are more compliant	209
Loss of KCC3 leads to abnormal response to salt loading.....	209
Loss of KCC3 leads to greater appetite for salt	210
Tables and figures	212
Supplemental figures.....	218
References	222

Discussion	225
Modèles murins	226
Neuropathie	230
Masse et composition corporelles	230
Activité locomotrice	232
Apport et dépense énergétiques.....	233
Métabolisme lipidique.....	235
Métabolisme glucidique	237
Profil cardiométabolique.....	239
Pression artérielle de base	239
Propriétés vasculaires	242
Pression artérielle sous stress physique aigu.....	243
Réponse à une diète riche en sel.....	244
Préférence au sel.....	244
Conclusion.....	247
Références bibliographiques	250
Annexe 1 : Équations décrivant les paramètres cardiovasculaires.....	279
Annexe 2 : Réponses cardiovasculaires attribuables à l’agonisme adrénergique	283
Annexe 3 : Précisions quant au quotient respiratoire	285

Liste des tableaux

Tableau 1 Nomenclature et caractéristiques fonctionnelles des cotransporteurs cation-chlorure des mammifères	34
Tableau 2 Matrice d'identité des KCC humains et murins	39
Table 1. Oligonucleotides used for qPCR studies.....	136
Table 2. Hemodynamic parameters.....	137
Table 3. Cardiac function	138
Table 4. Renal function	139
Table 5. Body measurements and lipid profile	140
Table 1. Time allocated daily to different categories of activities.....	172
Table S1. Oligonucleotides used for qPCR.....	180
Table S2. Amplitude of naturally-occurring metabolic rates.....	181
Table S3. Feeding and drinking patterns.....	182
Table 1. Baseline hemodynamic parameters during (A) nocturnal and (B) diurnal phases.....	212
Tableau 3 Traits phénotypiques d'intérêt extraneurologique décrits dans des lignées de souris inactivées pour <i>Kcc3</i>	228
Tableau 4 Principaux effets cardiovasculaires de l'activation des récepteurs adrénergiques	283

Liste des figures

Figure 1 Coefficients de perméabilité pour le passage de différentes molécules à travers une bicouche synthétique de phosphoglycérolipides	30
Figure 2 Modèle hydropathique de la structure tertiaire de KCC3A chez l'humain	35
Figure 3 Variants d'épissage de <i>KCC3</i> chez l'humain	38
Figure 4 Organisation quaternaire de KCC3	40
Figure 5 Transport transépithélial dans une cellule du tubule proximal	49
Figure 6 Anatomie du néphron.....	76
Figure 7 Catégories de remodelage vasculaire.....	93
Figure 8 Schéma d'un cycle de substrats glycérolipides-acides gras.....	107
Fig 1. Na ⁺ loading protocol.	141
Fig 2. Hemodynamic parameters.	142
Fig 3. Reactivity of isolated thoracic aorta.	143
Fig 4. Microscopic and transcriptomal analysis of thoracic aorta.....	144
Fig 5. Macroscopic, microscopic and transcriptomal analysis of the heart.	145
Fig 6. Secretion profile of hemodynamically relevant hormones.	146
Fig 7. Body measurements. A, Growth curves.	147
Fig 8. Neurologic assessment.....	148
Figure 1. Body composition.	173
Figure 2. Metabolic cages measurements.	174
Figure 3. Oral glucose tolerance test.	175
Figure 4. Oral lipid tolerance test.....	176
Figure 5. Body weight and composition as well as food consumption in response to a high-fat diet.	177
Figure 6. Lipogenic and lipolytic gene expression profile of visceral fat in mice after a high-fat diet.....	178
Figure 7. Lipogenic and lipolytic gene expression profile of subcutaneous fat in mice after a high-fat diet.....	179
Figure S1. Expression of <i>Mest</i> gene in mice after a high-fat diet.	183
Figure S2. Weight of hind limb muscles after a high-fat diet.	184

Figure S3. Circulating leptin concentrations after a high-fat diet.185

Figure S4. Liver triglyceride content after a high-fat diet.....186

Figure 1. Variation of (A) mean arterial pressure and (B) heart rate over the course of a restraint stress test and during recovery.213

Figure 2. Passive properties of perfused mesenteric 3rd order arteries.....214

Figure 3. Response to dietary salt loading.215

Figure 4. Salt preference test.....217

Figure S1. Dose-response curve of the response of resistive mesenteric arteries to norepinephrine.218

Figure S2. Dose-response curve of the response of resistive mesenteric arteries to acetylcholine.219

Figure S3. Dose-response curve of the response of resistive mesenteric arteries to sodium nitroprusside.....220

Figure S4. Dose-response curve of the response of resistive mesenteric arteries to endothelin-1.221

Liste des sigles et abréviations

ADP, adénosine diphosphate

Ang, angiotensine

ATP, adénosine triphosphate

CCC, cotransporteur cation-chlorure

CMLv, cellule musculaire lisse vasculaire

DIOA, acide dihydroindényloxyalcanoïque

EST, marqueur de séquence exprimée (*expressed sequence tag*)

HT, hétérozygote

HTA, hypertension artérielle

HUVEC, cellules endothéliales de veine ombilicale humaines (*human umbilical vein endothelial cells*)

KCC, cotransporteur K^+-Cl^- (*K^+-Cl^- cotransporter*)

KO, inactivé (génétiquement; *knockout*)

MPM, message par million

NCC, cotransporteur Na^+-Cl^- (*Na^+-Cl^- cotransporter*)

neuro, neurospécifique

NKCC, cotransporteur $Na^+-K^+-Cl^-$ (*$Na^+-K^+-Cl^-$ cotransporter*)

NO, monoxyde d'azote

PA, pression artérielle

PCR, amplification en chaîne par polymérase (*polymerase chain reaction*)

PNSMH, polyneuropathie sensitivomotrice héréditaire

QR, quotient respiratoire

RER, ratio d'échange respiratoire

SRAA, système rénine-angiotensine-aldostérone

syst, systémique

TAG, triacylglycérol (triglycéride)

TNF- α , facteur de nécrose tumorale α (*tumour necrosis factor α*)

WNK, with-no-lysine

WT, type sauvage (*wild type*)

Remerciements

Je souhaite d'abord remercier mes codirecteurs de thèse, Julie Lavoie et D^r Paul Isenring, d'avoir accepté de me superviser pour ce projet dans les dernières années. Je leur dois beaucoup de reconnaissance pour m'avoir offert de multiples opportunités d'épanouissement scientifique, professionnel et personnel. En plus de m'enseigner des habiletés techniques ou des notions importantes, ils ont été des exemples de persévérance et de rigueur.

Je veux souligner l'apport important de mes collègues de laboratoires actuels ou passés pour leurs enseignements ou leur aide. Je pense à Micheline Noël, Émilie Pepin, Sonia Kajla, Suzanne Cossette et Rachelle Frenette-Cotton qui ont joué des rôles importants pour me permettre de mener mes expériences. Je pense aussi aux autres étudiants au laboratoire, spécialement Andrée-Anne Marcoux, Paul Tan, Laurence Tremblay, Samira Slimani, Nozha Raguema, Kevin Coutu, Aida Kasei et Zulaykho Shamansurova que j'ai côtoyés et qui m'ont souvent aidé avec certains projets. Je veux également remercier les stagiaires qui ont été impliqués sur mon projet, en particulier Pierre Elias dernièrement, qui m'a apporté une aide technique importante au moment où j'en avais besoin. Je veux également remercier des collègues plus récemment arrivés qui me fournissent un coup de main ou des rétroactions utiles chaque fois que je les sollicite : Marie-Jeanne Fiola, Olivier Chenette-Stewart, Ludwig Haydock, Malika-Lisa Jacobsen-Maurasse et Gabriella Risi.

Je voudrais remercier les vétérinaires, coordonnateurs et membres du personnel dans les plateformes et les animaleries du Centre de recherche du CHUM (CRCHUM), du Laboratoire d'organogénèse expérimentale, de L'Hôtel-Dieu de Québec et de l'Université de Montréal. J'ai beaucoup appris de mes échanges avec les D^{rs} Hélène Héon, Maryse Boulay et Pierre Douville de même qu'avec plusieurs techniciennes ou techniciens très expérimentés qui ont toujours été attentifs à mes besoins et ont aidé au bon déroulement de mon projet. Dans différents contextes, les spécialistes de plusieurs laboratoires m'ont aussi fourni des conseils précieux; je pense spécialement à D^r Peng, Isabelle Chénier, Roxanne Lussier, Eric Joly, Mélanie Guévremont, Sylvie Dussault, Grace Fergusson, Mélanie Éthier, et Johane Morin. Je suis également reconnaissant du travail de soutien assuré par les bibliothécaires du CHUM et de l'Université de Montréal.

Je désire adresser quelques mots au sujet de mes voisins de laboratoire. J'ai beaucoup aimé côtoyer les membres des équipes de recherche du CRCHUM, du CRHDQ ainsi que de l'ÉKSAP, en particulier les professeurs et membres (actuels et passés) des équipes Mohsen Agharazii, Thierry Alquier, Raynald Bergeron, John Chan, Jacques Couet, Stéphanie Fulton, Jean-Marc Lavoie, Mariève Mathieu, Vincent Poitout, Marc Prentki, Alain Rivard, Johanne Tremblay et Shao-Ling Zhang avec qui j'entretiens des liens privilégiés. Je remercie Thomas, Sophie, Alexia, Léa, Cécile, Valentine, Alexandre Fisette et tous les autres pour les belles années passées ensemble, pour le bon voisinage et pour les activités en congrès ou à l'extérieur du laboratoire.

Sur une note plus personnelle, je dis merci à mes amis pour leur présence et leur support depuis le début de mon parcours et à plusieurs moments forts des dernières années. Alain, Alexandre D., Alexis, Aydin, Daniel, Émilie L, Eric D., Francis, Franck, Guillaume, Gabriel, Jerry, Karen, Kevin H.-G., Kevin T., Lennie, Marie, Marie-Michelle, Martin, Nicolas, Paul M., Rémi, Romain, Simon B., Simon G., Solia, Vicky, Yan B., Yan W... je vous remercie d'avoir été là. J'ai très hâte d'avoir la chance de tous vous retrouver très bientôt.

Je termine en remerciant les membres de ma famille, qui ont toujours été compréhensifs et à l'écoute durant les longs moments où je ne pouvais pas les voir. Merci encore à ma famille proche de croire en ce que je fais et merci du fond du cœur pour les encouragements, les bons mots, le soutien et la patience.

Avant-propos

Mes travaux de recherche principaux ont mené à la préparation de trois manuscrits décrivant les caractéristiques d'un modèle de souris inactivé pour un transporteur ionique (*Kcc3*) et modélisant une maladie neurodégénérative appelée polyneuropathie sensitivomotrice héréditaire. Pour ces trois manuscrits, j'ai réalisé la majorité de la collecte et de l'analyse des données. J'ai bien sûr reçu l'aide de collègues coauteurs pour certaines expériences spécifiques ou pour de l'assistance technique. Un premier manuscrit a été publié en 2016 (*PLOS One*), un deuxième a été soumis en 2021 (*Molecular Metabolism*) et un troisième est en préparation pour soumission à *Journal of Hypertension*. Avec le concours et les rétroactions de mes codirecteurs, j'ai été activement impliqué dans toutes les étapes de la préparation et de l'analyse des expériences, de même que dans la production des manuscrits.

En 2019, j'ai réalisé un stage de recherche dans le laboratoire d'Eric J. Delpire à Vanderbilt University Medical Center, durant lequel j'ai amorcé la caractérisation métabolique d'un modèle de souris avec gain de fonction dans *Kcc3*. Les résultats obtenus devraient faire l'objet d'un rapport de recherche à soumettre pour publication au début de 2022. Ils n'ont pas été inclus à cette thèse puisque des expériences sont toujours en cours et puisque les modalités de publication n'ont pas été établies.

J'ai également contribué aux projets de mes collègues de laboratoire impliquant KCC3 et différentes protéines de transport de la même famille, ce qui m'a valu des contributions dans quelques articles de recherche publiés entre 2018 et 2021 (*Journal of Cellular Physiology*, *American Journal of Physiology: Cell Physiology*, *The Journal of Physiology* et *The EMBO Journal*).

Notre groupe a aussi publié des revues de littérature présentant l'état des connaissances au sujet de la physiologie moléculaire de la famille de transport qui englobe KCC3. Ces articles sont parus entre 2017 et 2022 (*American Journal of Physiology: Cell Physiology*, *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, *Comprehensive Physiology*, *Journal of Hematology & Oncology*, *The Journal of Physiology*, *Physiology* et *Journal of Cellular Physiology*). Nous avons également été invités à publier des commentaires sur l'ultrastructure tridimensionnelle d'un transporteur ionique

en 2020 (*Nature Reviews: Nephrology*) et sur le rôle d'une protéine de transport ionique dans la production du liquide céphalorachidien en 2021 (*The Journal of Physiology*).

La complétion de travaux amorcés durant mes études prédoctorales au sujet du transport membranaire de silicium m'a valu des implications dans la publication de deux manuscrits entre 2015 et 2016 (*PLOS One* et *The Journal of General Physiology*). Nous avons aussi publié en 2018 un article de méthode en lien avec ce domaine de recherche (*The Journal of Physiology*).

Notre équipe a collaboré avec le groupe de Francesca Cicchetti du Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université Laval pour la caractérisation d'un modèle murin de la maladie de Huntington. Nous avons partagé du matériel et des protocoles pour un manuscrit paru en 2020 (*Molecular Psychiatry*).

Enfin, j'ai été impliqué dans l'investigation et la description de pathologies via la pratique de mon codirecteur D^r Paul Isenring à L'Hôtel-Dieu de Québec. Ces travaux ont mené à la publication de rapports cliniques entre 2015 et 2019 (*The New England Journal of Medicine*, *Blood Cancer Journal*, *Canadian Medical Association Journal*, *Kidney International* et *Journal of Molecular Medicine*). En préparation de mes études postdoctorales, j'ai aussi commencé à m'impliquer dans l'étude des syndromes d'hypercroissance, ce qui a permis la publication d'un article clinique en 2021 (*Journal of Molecular Medicine*) et la préparation d'un autre article soumis à *Human Genetics*.

Introduction

Les travaux associés à cette thèse visaient à décrire les rôles physiologiques attribuables à une protéine de transport ionique appelée cotransporteur K^+-Cl^- de type 3 (K^+-Cl^- cotransporter type 3, KCC3ⁱ), laquelle est présente dans les neurones, mais également dans une grande variété de cellules à l'extérieur du système nerveux. L'importance de KCC3 est mise en relief par un syndrome neurodéveloppemental et neurodégénératif humain en cas de perte de fonction de cette protéine (polyneuropathie sensitivomotrice héréditaire, PNSMH). La physiopathologie de ce syndrome a été étudiée depuis les années 2000 grâce à différents modèles de souris génétiquement modifiés. Ces travaux ont permis de mettre en évidence une importance de premier plan de KCC3 dans les neurones. Ces travaux suggèrent également quelques rôles additionnels pour KCC3 à l'extérieur du système nerveux, considérant la présence et l'implication de KCC3 dans d'autres types cellulaires. Comme il le sera étayé plus bas, KCC3 peut jouer des rôles directs dans différents processus physiologiques, mais également des rôles indirects via des interactions avec des protéines apparentées à lui homologiquement ou fonctionnellement. Ces rôles additionnels n'ont toutefois été que peu décrits.

Afin de bien mettre en valeur les rôles confirmés et potentiels de KCC3 ainsi que les liens à faire avec la PNSMH, l'*Introduction* de cette thèse présentera d'abord une description de la protéine KCC3, de la PNSMH et des modèles animaux déjà caractérisés. Ensuite, il sera question de trois grandes catégories de processus physiologiques où KCC3 a le potentiel de jouer des rôles majeurs : la régulation hydrominérale, la régulation de la pression artérielle (PA) et le métabolisme énergétique.

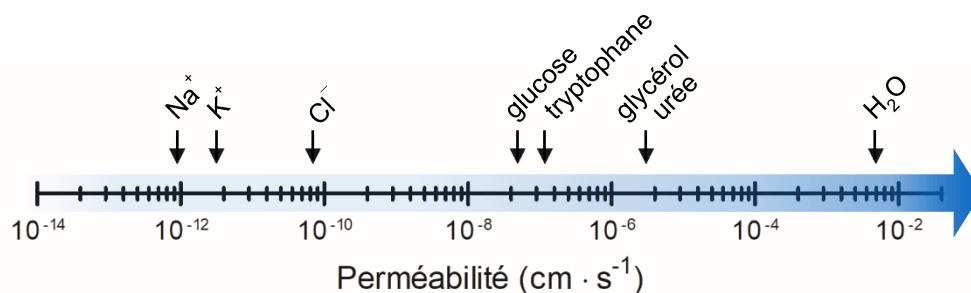
ⁱ Bien que les symboles officiels reliés aux cotransporteurs cation- Cl^- suivent la nomenclature de l'Human Genome Organisation (Saier, 2000; Hediger et collab., 2004), les sigles synonymes formés antérieurement à partir des noms anglais décrivant la fonction de ces transporteurs ont été retenus pour cette thèse puisqu'ils évoquent plus explicitement les substrats transportés (par ex., KCC3, synonyme de SLC12A6; voir les sections 1.1.2 et 1.3.2). Par convention, les noms abrégés des protéines sont écrits en caractères romains et en majuscules (par ex., KCC3) sauf exception. Les noms des gènes sont écrits en italique et en majuscules pour l'humain (par ex., *KCC3*) ou avec une majuscule initiale pour la souris (par ex., *Kcc3*; National Center for Biotechnology Information, 2004; Bruford et collab., 2020; International Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice et Rat Genome and Nomenclature Committee, 2021). Lorsque les orthologues humain et murin sont évoqués, la nomenclature du gène humain est retenue.

1. Le cotransporteur potassium-chlorure de type 3 et les systèmes de transport membranaire

KCC3 est une protéine de transport membranaire présente dans les membranes d'une grande variété de cellules dans plusieurs organes chez les animaux, mais aussi chez les plantes, les mycètes, les archées et les bactéries (Hartmann et collab., 2014). En particulier chez les animaux, la fonction de transport de solutés de part et d'autre des membranes cellulaires est indispensable pour de nombreux processus physiologiques. Si les composés hydrophobes traversent librement la bicouche lipidique qui délimite les cellules, l'eau affiche une perméation relativement élevée à travers cette bicouche ($10^{-2} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$) alors que les ions Cl^- , K^+ et Na^+ affichent des perméations inférieures par plusieurs ordres de magnitude (voir la Figure 1; Alberts et collab., 2008). Puisque les cellules ont besoin d'incorporer des substances hydrophiles, elles ont développé des systèmes de transport membranaires qui consistent en fait en une vaste gamme de protéines spécialisées enchâssées dans leurs membranes. Les analyses du génome humain estiment que jusqu'à 1200 gènes pourraient coder pour des protéines de transport (Venter et collab., 2001).

D'un point de vue primaire, le transport membranaire permet l'établissement et le maintien de concentrations intracellulaires cibles pour assurer la survie et l'intégrité des cellules malgré les fluctuations dans les conditions extracellulaires. Le transport membranaire peut aussi servir à

Figure 1 Coefficients de perméabilité pour le passage de différentes molécules à travers une bicouche synthétique de phosphoglycérolipides



Note. Les coefficients sont exprimés en $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$ sur une échelle logarithmique croissante. Le produit de la différence transmembranaire de concentration molaire volumique d'une molécule par son coefficient exprime le taux de passage en $\text{mol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$. (Informations tirées de Alberts et collab., 2008)

modifier le potentiel membranaire et à générer des signaux électriques par le mouvement de solutés porteurs d'une charge électrique. C'est par exemple de cette façon que sont générés et transmis les influx nerveux. Le changement de potentiel membranaire peut aussi être un signal à l'origine de différents processus comme la motilité cellulaire ou la libération par exocytose d'une substance (Alberts et collab., 2008). Enfin, l'action concertée de différentes protéines de transport permet des processus d'absorption ou de sécrétion par un déplacement net de solutés ou d'eau d'un emplacement à un autre dans l'organisme par un processus appelé transport transépithélial ou vectoriel (voir la section 1.3.6.1; Stein et Litman, 2015).

En fonction du type cellulaire et de l'emplacement dans un organisme, les populations de protéines de transport présentes et actives peuvent varier grandement. En effet, les protéines de transport sont soumises à plusieurs niveaux de régulation, notamment au stade de l'expression génétique, de l'adressage des protéines vers les différentes structures cellulaires et de la modulation de leur activité par la machinerie cellulaire, les signaux circulants ou des facteurs physicochimiques. L'agencement de différentes protéines de transport particulières et la régulation de leur activité permettent aux membranes d'une cellule d'acquérir une perméabilité sélective à différents substrats et peut conférer à cette cellule des fonctions comme l'excitabilité, la motilité, la transmission de signal électrique, l'absorption ou l'excrétion de substances (Stein et Litman, 2015).

1.1. Typologie des protéines de transport membranaire

Les protéines de transport membranaire sont toutes des protéines membranaires dites intégrales, mais il en existe trois catégories aux propriétés structurales et modes de fonctionnements différents : les canaux, les transporteurs et les pompes. Les protéines de transport permettent dans la plupart des cas d'accélérer le transport transmembranaire d'une substance suivant son gradient électrochimique dans un processus de diffusion facilitée ne nécessitant pas d'apport énergétique. Ce processus est dit passif et s'appuie sur les propriétés structurales de la protéine de transport qui favorise, oriente et accélère le déplacement net de la substance transportée (aussi appelée substrat). Certaines protéines de transport permettent au contraire un transport actif, lequel dépend d'une source d'énergie pour déplacer un substrat à l'encontre de son gradient électrochimique. Le transport actif dit primaire utilise l'énergie fournie par une réaction chimique pour rendre possible une activité de transport qui est défavorable du point de vue du gradient électrochimique. Il existe enfin un mode de transport appelé transport actif secondaire qui, lui, ne s'appuie pas sur une

réaction exothermique, mais plutôt sur un gradient électrochimique établi au préalable par un processus de transport actif primaire énergivore. Un gradient électrochimique fort (par exemple celui du Na^+ , dirigé vers le cytosol) constitue d'une certaine façon une source d'énergie chimique emmagasinée pouvant être utilisée de manière secondaire par une autre protéine de transport (Alberts et collab., 2008).

1.1.1. Canaux

Les canaux forment dans une membrane un pore dynamique doté de propriétés électrostatiques particulières permettant d'accélérer le déplacement de solutés plus ou moins spécifiques par un processus appelé diffusion facilitée. Un canal alterne continuellement entre ses conformations fermée et ouverte, cette dernière étant la seule permettant le transport des substrats. La probabilité d'ouverture d'un canal peut être modulée par différents facteurs, notamment chimiques (agonistes et antagonistes), électriques (pour les canaux tensiodépendants) ou physiques (forces d'étirement ou de cisaillement appliquées à la membrane, par exemple; Alberts et collab., 2008).

Les gènes des canaux codent pour des monomères qui s'associent le plus souvent sous forme d'homo- ou hétérooligomères nécessaires à l'obtention d'une fonction de transport optimale. Un exemple typique est le canal à Na^+ tensiodépendant des neurones, lequel est formé par quatre monomères de 300 kilodaltons chacun (Sato et collab., 1998). Les canaux permettent des vitesses de transport variables, mais certains canaux ioniques sont parmi les protéines de transport les plus rapides, faisant traverser jusqu'à 100 millions d'ions par seconde (Lodish et collab., 2008).

1.1.2. Transporteurs

Les transporteurs sont dotés d'au moins un site de liaison spécifique pour un substrat donné et, par un processus de translocation impliquant des changements conformationnels successifs, déplacent ce substrat de part et d'autre de la membrane. Ce processus est plus lent en comparaison avec les canaux, et permet typiquement le passage de 100 à 10 000 solutés par secondes par transporteur (Lodish et collab., 2008), la limite théorique étant fixée à 100 000 (Chakrapani et Auerbach, 2005). Un transporteur doté de sites de liaison pour un seul substrat, aussi appelé uniport, accélère le déplacement de ce substrat par diffusion facilitée. En revanche, un transporteur doté de sites de liaisons pour plus d'un substrat, aussi appelé cotransporteur, verra son activité de transport

influencée par ses propres propriétés structurales en plus des gradients électrochimiques en présence (Stein et Litman, 2015).

Un cotransporteur peut transporter ses substrats conjointement dans un même sens, auquel cas il sera catégorisé comme symporteur. En revanche, si un cotransporteur déplace des solutés dans des sens opposés, celui-ci sera catégorisé comme antiporteur. Dans la majorité des cas, les cotransporteurs accélèrent le transport de leurs substrats par diffusion facilitée. Il est cependant possible pour des cotransporteurs de transporter un substrat à l'encontre de son gradient électrochimique par transport actif secondaire. Ce cas de figure survient si la disposition des sites de liaison dans le transporteur le permet et si le gradient électrochimique de l'un des substrats cotransportés est d'une plus grande ampleur que les gradients électrochimiques des autres substrats cotransportés. Ainsi, le mouvement thermodynamiquement très favorable d'un soluté peut entraîner un autre soluté à être transporté contre gradient. Tout comme les canaux, les transporteurs peuvent s'associer en homo- ou en hétérooligomères (Stein et Litman, 2015).

En plus des noms pouvant avoir été attribués aux transporteurs au moment de leur découverte, ces derniers ont été classifiés selon un système instauré par l'organisme Human Genome Organisation (HUGO) dans l'une de 66 familles sous le format SLC_nX_m , où SLC signifie *solute carrier*, n est le numéro de famille, X est une lettre désignant la sous-famille, et m est le numéro du membre de la sous-famille (Hediger et collab., 2004).

1.1.3. Pompes

La dernière catégorie de protéines de transport membranaire regroupe des transporteurs actifs, aussi appelés des pompes. Ces protéines de transport ont une structure et un mode de fonctionnement par translocation similaires à ceux des transporteurs. Les pompes sont toutefois dotées d'une activité enzymatique fournissant l'énergie nécessaire au transport actif d'un soluté à l'encontre de son gradient électrochimique. Le plus souvent, la réaction d'hydrolyse de l'adénosine triphosphate (ATP) catalysée par la pompe elle-même est le processus fournissant l'énergie nécessaire au mouvement thermodynamiquement défavorable d'un soluté (Alberts et collab., 2008). Les pompes sont les protéines de transport les moins rapides, chaque unité permettant le passage de 1 à 1000 solutés par seconde (Lodish et collab., 2008). Les différentes pompes sont nommées et classées en suivant une nomenclature qui leur est propre.

1.2. La famille des cotransporteurs cation-chlorure

Parmi les nombreuses protéines de transport connues, une famille regroupe des cotransporteurs hautement conservés, avec des orthologues dans tous les domaines du vivant, et particulièrement impliqués dans l'équilibre sodé et osmotique : les cotransporteurs cation-Cl⁻ (CCC) ou la famille SLC12A. Il s'agit de symporteurs électroneutres dotés de patrons d'expression corporelle distincts et dont le sens de transport peut varier selon l'environnement ionique local (Gamba, 2005). Ils sont typiquement retrouvés sous forme d'homo- et d'hétérodimères à la membrane cytoplasmique où ils sont particulièrement abondants à un pôle ou à un autre des cellules épithéliales (Garneau et collab., 2019). À l'exception d'un membre dont l'affiliation à la famille demeure incertaine (CCC9, voir le Tableau 1), les CCC ont une structure de base similaire composée de domaines N- et C-terminaux intracellulaires séparées par 12 segments transmembranaires (Gamba, 2005; Hartmann et collab., 2014), comme il l'est montré pour KCC3 à la Figure 2.

Parmi une même espèce de mammifère, les différents membres de la famille partagent des niveaux d'identité protéique variables (environ 30 à 70 % chez l'humain; (Garneau et collab., 2019). Sur la

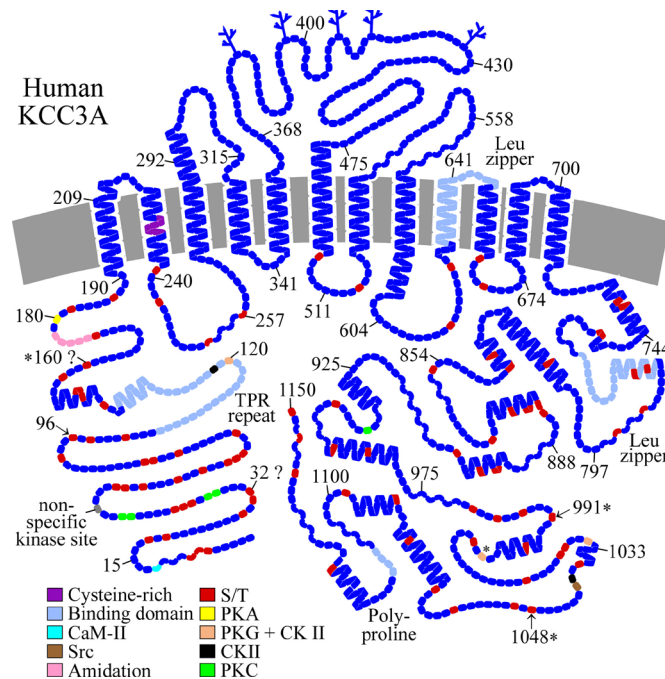
Tableau 1 Nomenclature et caractéristiques fonctionnelles des cotransporteurs cation-chlorure des mammifères

Cotransporteur...	Sigle	Nom HUGO	Autre nom	Substrats	Sens typique de transport	Distribution
Dépendants du Na⁺, cotransporteurs Na⁺-K⁺-Cl⁻ et Na⁺-Cl⁻						
Na ⁺ -K ⁺ -Cl ⁻ de type 1	NKCC1	Slc12a2	BSC2	Na ⁺ , K ⁺ , Cl ⁻	Import	Ubiquitaire
Na ⁺ -K ⁺ -Cl ⁻ de type 2	NKCC2	Slc12a1	BSC1	Na ⁺ , K ⁺ , Cl ⁻	Import	Rein, pancréas
Na ⁺ -Cl ⁻	NCC	Slc12a3	TSC	Na ⁺ , Cl ⁻	Import	Rein
Indépendants du Na⁺, cotransporteurs K⁺-Cl⁻						
K ⁺ -Cl ⁻ de type 1	KCC1	Slc12a4		K ⁺ , Cl ⁻	Export	Ubiquitaire
K ⁺ -Cl ⁻ de type 2	KCC2	Slc12a5		K ⁺ , Cl ⁻	Export	Neurones
K ⁺ -Cl ⁻ de type 3	KCC3	Slc12a6		K ⁺ , Cl ⁻	Export	Répondue
K ⁺ -Cl ⁻ de type 4	KCC4	Slc12a7		K ⁺ , Cl ⁻	Export	Répondue
Autres divisions						
cation- Cl ⁻ de type 8	CCC8	Slc12a9	CIP	pa, Aa...	nd	Répondue
cation- Cl ⁻ de type 9	CCC9	Slc12a8		pa, Aa...	nd	Répondue

Note. Aa, acides aminés. BSC, bumétamide-sensible cotransporteur. CIP, CCC-interacting protein. HUGO, Human Genome Organisation. nd, non déterminé. pa, polyamines. TSC, thiazide-sensible cotransporteur. ..., autres. (Informations tirées de Gamba, 2005; Gagnon et Delpire, 2013; National Institutes of Health, s. d.)

base notamment de propriétés fonctionnelles et de similarité de séquences, il est possible de décomposer SLC12A en quatre divisions (Tableau 1). La première regroupe trois protéines dites dépendantes du Na⁺ et chacune dotée d'une activité de transport pour le Na⁺ et le Cl⁻, alors que deux d'entre elles transportent également le K⁺. La deuxième division est celle des cotransporteurs K⁺-Cl⁻, composée de quatre protéines hautement homologues transportant ces deux substrats. Les troisième et quatrième divisions sont moins similaires aux autres membres de la famille et ne comprennent qu'une protéine chacune, c'est-à-dire CCC8 et CCC9. L'activité de transport de ces deux protéines demeure incomplètement décrite à ce jour, mais semble différer substantiellement de celle des autres CCC (Caron et collab., 2000; Daigle et collab., 2009).

Figure 2 Modèle hydrophatique de la structure tertiaire de KCC3A chez l'humain



Note. L'organisation topologique dans la membrane est typique des membres de la famille. Par convention, le milieu intracellulaire est en bas de la figure. Différentes portions de la protéine sont mises en évidence par un code de couleur et des annotations. CK, caséine kinase. PK, protéine kinase. Tiré de « Molecular insights into the normal operation, regulation, and multisystemic roles of K⁺-Cl⁻ cotransporter 3 (KCC3) », par A. P. Garneau, A. A. Marcoux, R. Frenette-Cotton, F. Mac-Way, J. L. Lavoie et P. Isenring, 2017, *American Journal of Physiology: Cell Physiology*, 313(5), p. C518 (<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00106.2017>). © 2017 par la American Physiological Society. Reproduit avec permission.

1.3. Le cotransporteur potassium-chlorure de type 3 chez les mammifères

Depuis une vingtaine d'années, de nombreuses études ont permis de démontrer des rôles physiologiques importants pour KCC3 dans différents organes (Gagnon et Delpire, 2013; Garneau et collab., 2017). En particulier, la découverte du lien causal entre des mutations perte de fonction dans *Kcc3* et une neuropathie héréditaire humaine (Howard et collab., 2002), suivie de la caractérisation de modèles animaux porteurs de mutations perte de fonction dans le gène orthologue, ont renforcé l'intérêt porté envers ce gène. La recherche autour des rôles cellulaires et physiologiques de KCC3 a également laissé entrevoir des possibilités thérapeutiques inédites non seulement dans les domaines de la neurobiologie, mais également dans ceux de la néphrologie, de la physiologie cardiovasculaire et du métabolisme (Garneau et collab., 2019).

1.3.1. Découverte

Avant même que l'identité moléculaire de KCC3 ne soit connue, il était admis qu'un système indépendant du Na^+ couplant le transport du K^+ à celui du Cl^- devait exister. En effet, des observations au début des années 1980 sur le taux de cotransport $\text{K}^+\text{-Cl}^-$ dans les érythrocytes de chèvre en réponse à différents agents pharmacologiques laissaient présager l'existence d'un tel système (Lauf, 1983). Ce n'est toutefois qu'au tournant de l'an 1999 que trois équipes de recherches indépendantes ont précisé l'identité moléculaire de KCC3.

Une première équipe (Hiki et collab., 1999) est arrivée à amplifier *KCC3* par la technique du *differential-display reverse transcription-polymerase chain reaction* (PCR, amplification en chaîne par polymérase), à partir de cellules endothéliales de veine ombilicale humaines (*human umbilical vein endothelial cells*, HUVEC) stimulées avec un facteur angiogénique (facteur de croissance endothélial vasculaire, *vascular endothelial growth factor*). Cette équipe a par la suite cloné la séquence à partir d'une librairie par criblage d'homologie de séquences.

Les deux autres équipes (Mount et collab., 1999; Race et collab., 1999) ont identifié KCC3 en interrogeant une base de données incluant des transcrits partiellement séquencés ou marqueurs de séquences exprimées (*expressed sequence tags*, EST; Boguski et collab., 1993). Comme points de requêtes, elles ont utilisé les séquences de KCC1 et de KCC2 qui venaient d'être découvertes quelques mois auparavant. Les équipes de Race et de Mount ont ainsi identifié des candidats et ont

par la suite cloné la séquence codante de *KCC3* par PCR à partir de banques d'ADN complémentaire de placenta, de muscle ou de cerveau humain.

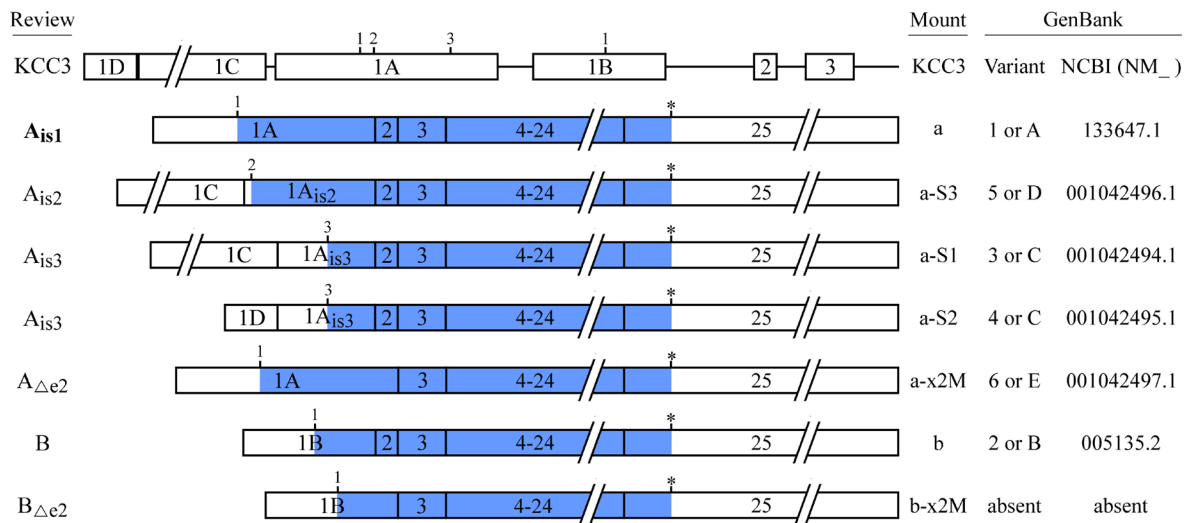
1.3.2. Structure du gène, des transcrits et des produits protéiques

Le gène *KCC3*, ou officiellement *SLC12A6*, est situé au locus 15q13-15 chez l'humain (locus 2 E3 chez la souris). Le transcrit primaire compte 108 069 paires de bases chez l'humain, disposées en 25 exons, en tenant compte du fait que l'exon 1 existe sous différents types (voir la Figure 3). L'exclusion alternative des exons 1A et 1B mène à la production de différents variants d'épissage, et deux des types de l'exon 1 peuvent même être retrouvés en tandem dans un transcrit primaire (Garneau et collab., 2017).

Chez l'humain et la souris, le produit protéique le plus abondant de *KCC3*, *KCC3A_{is1}*, compte 1150 résidus (orthologues identiques à > 98 %), alors que l'isoforme *KCC3B*, de 1099 résidus, a un patron et un degré d'expression restreints. Parmi la sous-famille des KCC, les protéines sont identiques entre elles à plus de 69 % (voir la matrice d'identité au Tableau 2), tant chez l'humain que chez la souris, mais *KCC1* et *KCC3* sont ceux qui partagent la plus haute homologie entre eux. L'identité protéique entre *KCC3* et les CCC dépendants du Na⁺ est passablement plus basse, de l'ordre de 30 %, et ce chez l'homme autant que la souris (Garneau et collab., 2017).

Si plusieurs indications quant à l'organisation topologique des CCC ont été révélées à la fin des années 1990 (Moore-Hoon et Turner, 1998; Gerelsaikhhan et Turner, 2000; Simard et collab., 2004) et ont été solidement attestées à partir de la décennie suivante (Moore-Hoon et Turner, 2000; Simard et collab., 2007), ce n'est qu'à partir de 2019 que l'ultrastructure des KCC a commencé à être résolue par cryomicroscopie électronique (Liu et collab., 2019). Bien que la structure intégrale la plus détaillée d'entre toutes celles disponibles pour les KCC soit celle de *KCC2* humain parue en 2020 (Xie et collab., 2020), tout indique que celle de *KCC3* y serait hautement similaire. En effet, les discordances d'alignement de *KCC3* par rapport à *KCC2* se limitent à une extension d'environ 65 résidus avant la séquence conservée du domaine N-terminal et un raccourcissement d'environ 51 résidus vers le dernier tiers du C-terminal. Les ultrastructures de *KCC3A* (X. Chi et collab., 2021) et *KCC3B* (G. Chi et collab., 2021) humains rapportés en 2021 sont d'ailleurs hautement concordantes avec celle de *KCC2* humain rapportée en 2020 (Xie et collab., 2020).

Figure 3 Variants d'épissage de *KCC3* chez l'humain



Note. Le transcrit primaire en 1^{re} ligne compte précisément 108 069 nucléotides. Les exons sont représentés en rectangles et les introns, en traits. Les exons et introns sont représentés à l'échelle (réduction d'un facteur 250 pour les introns). Les chiffres au-dessus des exons sont des sites alternatifs d'initiation de la traduction et les cadres de lectures correspondent aux zones colorées en bleu. Les variants sont nommés en fonction d'une nomenclature descriptive suggérée par notre groupe à gauche (Review), mais les désignations originales (Mount et collab., 1999) et celles de GenBank (National Institutes of Health, s. d.) sont fournies à droite. *, codon stop. is, site d'initiation. Tiré de « Molecular insights into the normal operation, regulation, and multisystemic roles of K⁺-Cl⁻ cotransporter 3 (KCC3) », par A. P. Garneau, A. A. Marcoux, R. Frenette-Cotton, F. Mac-Way, J. L. Lavoie et P. Isenring, 2017, *American Journal of Physiology: Cell Physiology*, 313(5), p. C518 (<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00106.2017>). © 2017 par la American Physiological Society. Reproduit avec permission.

Chaque chaîne polypeptidique de KCC3 dispose d'un domaine transmembranaire incluant les 12 segments caractéristiques de la famille, flanqué par un domaine N-terminal intracellulaire de longueur variable selon les variants d'épissage et un très long domaine C-terminal, lui aussi intracellulaire. Comme dans le cas des autres KCC, une longue boucle extracellulaire est retrouvée entre les segments transmembranaires 5 et 6, laquelle peut inclure plusieurs sites de glycosylation potentiellement importants sur le plan structural ou fonctionnel. Quelques résidus au potentiel régulateur ont été identifiés dans le domaine N-terminal (notamment la sérine 96), de même qu'une dizaine d'autres dans le domaine C-terminal. Parmi ces derniers, notons une pochette de liaison pour l'adénosine diphosphate (ADP) ou l'ATP (G. Chi et collab., 2021) ainsi que les résidus

Tableau 2 Matrice d'identité des KCC humains et murins

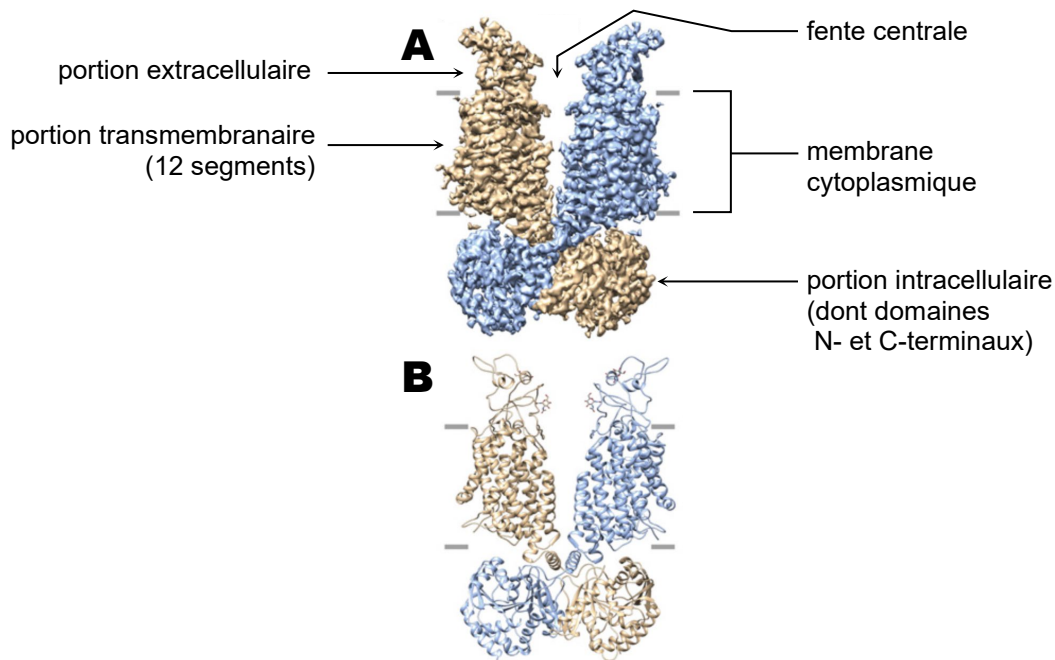
		<i>Mus musculus</i>					
		001240733.1	001342409.1	598410.2	001347623.1		
		KCC1	KCC2	KCC3	KCC4		
<i>H. sapiens</i>	KCC1	96,22	69,29	76,23	69,67	KCC1	
	KCC2	69,91	98,33	71,02	73,85	KCC2	
	KCC3	76,46	71,23	98,17	69,15	KCC3	
	KCC4	69,99	73,48	69,90	90,95	KCC4	
		KCC1	KCC2	KCC3	KCC4		
		001139434	001128243.1	598408.1	006589.2		
<i>Homo sapiens</i>							

Note. Les cases colorées en bleu et en jaune indiquent l'identité entre les différents membres de la famille chez l'humain et la souris, respectivement. Les cases colorées en gris indiquent l'identité entre les orthologues. L'identité est exprimée en pourcentage de résidus identiques à la même position déterminée par un alignement protéique réalisé avec Clustal Omega (Sievers et Higgins, 2014) à partir des produits protéiques les plus longs pour chaque gène tiré de la base de données des National Institutes of Health (s. d.). Pour chaque séquence utilisée, le numéro RefSeq qui suit la désignation NP_ est indiqué. Travail original.

théonine 991 et 1048 (Rinehart et collab., 2009), dont l'implication dans la régulation de l'activité du transporteur est appuyée par différentes études fonctionnelles, comme il en sera question plus loin dans ce texte (voir la section 1.3.5.6).

Il est aujourd'hui bien admis que deux protomères de KCC3 s'assemblent à la membrane à la manière de ciseaux (voir la Figure 4). Chaque protomère de KCC3 renferme une hélice au début du domaine C-terminal et les deux protomères font contact en croisant ces hélices. Ce point de rencontre agirait comme point de pivot et formerait le caveau d'une fente centrale (*central cleft*) délimitée de chaque côté par les deux protomères dans la région membranaire (Xie et collab., 2020; G. Chi et collab., 2021; X. Chi et collab., 2021). Dans les conformations identifiées, certains des segments transmembranaires participent à l'échafaudage tandis que d'autres s'empaquettent

Figure 4 Organisation quaternaire de KCC3



Note. Deux protomères sont représentés par des couleurs différentes selon des modèles (A) globulaire et (B) en hélices et boucles. L'agencement de la structure protéique est présenté de manière tridimensionnelle d'après les observations de cryomicroscopie électronique. Les structures d'intérêt ont été pointées, notamment les différentes portions d'un même protomère. Par convention, le milieu intracellulaire est en bas de chaque panneau. Adapté de « Structures and an activation mechanism of human potassium-chloride cotransporters », par Y. Xie, S. Chang, C. Zhao, F. Wang, S. Liu, J. Wang, E. Delpire, S. Ye et J. Guo, 2020, *Science Advances*, 6(50), p. 2 (<https://doi.org/10.1126/sciadv.abc5883>). CC BY-NC 4.0. Adapté avec permission (rognage et ajout d'étiquettes).

ensemble (X. Chi et collab., 2021). Le dimère est aussi assuré dans le modèle canonique par d'autres interactions hydrophobes entre l'hélice du pivot et certains résidus du domaine C-terminal (Xie et collab., 2020). Des structures secondaires dans le domaine N-terminal montrent également une affinité pour certaines portions du domaine C-terminal, ce qui favorise une conformation fermée du transporteur, dite autoinhibée (Xie et collab., 2020; G. Chi et collab., 2021). Les évidences expérimentales disponibles portent à croire que les sites de liaison pour le K^+ et le Cl^- se trouvent à proximité des segments transmembranaires 1 et 6 (X. Chi et collab., 2021), et ceux-ci sont probablement également encadrés par deux autres segments transmembranaires (3 et 8) si la structure est homologe à celle résolue pour le cotransporteur $Na^+K^+Cl^-$ de type 1 (NKCC1; Chew et collab., 2019).

1.3.3. Sites d'expression dans l'organisme

D'après les banques d'EST, *KCC3* est exprimé dans 34 des 45 structures anatomiques pour lesquelles des données sont disponibles (Garneau et collab., 2017). Les structures exprimant les plus forts taux de transcrits (plus de 37 messages par million, MPM), en ordre décroissant, sont les testicules, l'os, le col utérin, le tissu adipeux, la bouche, la glande pinéale, l'œsophage, le pharynx, les glandes salivaires, les parathyroïdes, la thyroïde, la moelle osseuse, les vaisseaux sanguins, la rate et le thymus. Des niveaux intermédiaires sont aussi rapportés dans le rein et le cerveau (28 et 24 MPM, respectivement), ainsi que dans le cœur et le muscle squelettique (11 et 9 MPM, respectivement). De façon intéressante, les banques d'EST n'affichent aucune expression dans les glandes surrénales, l'oreille ou les nerfs périphériques (Garneau et collab., 2017). Toutefois, quelques études de localisation fine par gène rapporteur ou par immunodétection ont montré l'expression de *KCC3* dans certaines cellules spécialisées de la glande médullosurrénale, de l'organe de Corti et des ganglions spinaux. D'autres études de localisation fines ont indiqué une expression de *KCC3* dans plusieurs structures du système nerveux central (cervelet, corps calleux, cortex cérébral, hippocampe, hypothalamus, moelle épinière, pont, tronc cérébral, expression typiquement maximale dans les fibres myélinisées de la matière blanche); dans les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLv) des artères (mésentérique, saphène et aorte, par exemple); dans les neutrophiles (à la membrane cytoplasmique ainsi qu'à la surface des phagosomes); de même qu'à la membrane basolatérale des épithéliocytes du tubule proximal et des cellules pariétales de la paroi gastrique (Pearson et collab., 2001; Boettger et collab., 2003; Le Rouzic et collab., 2006; Rust et collab., 2006; Fujii et collab., 2008; Salin-Cantegrel et collab., 2011; Sun et collab., 2012; Garneau et collab., 2016).

Des expériences d'hybridation de type Northern et d'immunobuvardage de type Western sur des extraits tissulaires ont révélé de forts niveaux d'expression de *KCC3* dans le cerveau, le cœur, le muscle squelettique et le rein chez l'humain et un patron hautement similaire chez la souris, à l'exception d'une détection forte dans les poumons (Mercado et collab., 2005). Des études d'expression et de fonction réalisées dans des types cellulaires spécifiques ou dans des lignées cellulaires ont aussi montré une expression robuste de *KCC3* dans les leucocytes et mélanocytes humains; les CMLv de la souris et du rat; les érythrocytes de la chèvre, de l'humain, de la souris; les neurones hippocampaux et les axones du nerf sciatique de la souris; ainsi que les lignées de cellules humaines immortalisées rénales embryonnaires HEK-293, endothéliales de veine

ombilicale HUVEC et d'adénocarcinome du côlon Caco-2 (revu dans [Garneau et collab., 2017](#)). Dans le système cardiovasculaire, il a été établi que KCC3 est le KCC le plus abondant, suivi de KCC1 et KCC4, alors que KCC2 est absent ([Mount et collab., 1999](#); [Di Fulvio et collab., 2003](#); [Adragna et collab., 2004](#); [Gamba, 2005](#)).

La ressource *Human Brain Transcriptome*ⁱⁱ (<https://hbatlas.org>) montre que l'expression de *KCC3*, comme celle d'autres CCC, est régulée temporellement dans le cerveau. En effet, dans la majorité des structures cérébrales, l'expression de *KCC3* est maximale au milieu du développement embryonnaire et redescend vers une valeur stable pour le reste de la vie. Des analyses de PCR chez la souris montrent que l'expression de *Kcc3* est trois fois plus élevée dans les ganglions spinaux chez le jeune adulte en comparaison avec le nouveau-né ([Lucas et collab., 2012](#)). Prises ensemble, ces données indiquent que le patron d'expression temporel de *KCC3* varie d'un tissu à l'autre et pourrait différer d'une espèce à l'autre, en adéquation avec les besoins tissulaires durant les différentes phases de la vie.

Il est à noter que le variant d'épissage majeur de *KCC3* est *KCC3A_{isl}* (voir la Figure 3 pour une description des différentes isoformes), c'est-à-dire qu'il inclut l'exon 1A et résulte de l'utilisation du premier site d'initiation de la transcription. Deux autres variants plus courts ont été identifiés par des études d'expression : *KCC3A_{Δe2}* (sans exon 2) retrouvé dans le cerveau; et *KCC3B*, forme prédominante dans le rein et le pancréas aussi retrouvé en petites quantités dans les CMLv aortiques de rat. D'après les observations disponibles, les organes qui expriment un variant mineur expriment également le variant majeur ([Mercado et collab., 2005](#); [Le Rouzic et collab., 2006](#)).

1.3.4. Activité de transport

La fonction primaire de KCC3 est d'effectuer le symport de K^+ et de Cl^- en quantités équimolaires. Comme il s'agit d'un mouvement parallèle, symétrique et équilibré de deux ions monovalents aux charges opposées, l'activité de transport de KCC3 est qualifiée d'électroneutre. Pour une cellule typique, le gradient électrochimique du K^+ est fortement dirigé vers le liquide interstitiel, alors que le gradient électrochimique du Cl^- est moins prononcé et dirigé vers le cytosol. Les équations

ⁱⁱ Le projet Human Brain Transcriptome est une initiative du Département de neurobiologie de la Yale University School of Medicine et constitue une base de données publique colligeant des données d'expression génétique reliées à l'encéphale humain aux différents stades de développement.

thermodynamiques du mouvement transmembranaire des substrats permettent de prédire que le gradient du K^+ (au moins 1,4 fois plus fort que celui du Cl^-) entraînera l'activité globale de transport en mode export dans les conditions typiques (Garneau et collab., 2017), ce qui a été maintes fois confirmé dans différents modèles cellulaires (Race et collab., 1999; Mercado et collab., 2000; Jennings et Adame, 2001; Mercado et collab., 2005; Kahle et collab., 2016).

Durant un cycle de transport complet, il est présumé que les ions Cl^- et K^+ se lient successivement à leurs sites de liaison intracellulaires, ce qui entraîne un changement conformationnel du transporteur, expose les sites de liaison au liquide interstitiel et entraîne la libération des ions un par un, suivant l'ordre de liaison, au gré d'autres changements conformationnels successifs, dans un comportement de transport portant le nom de *glide symmetry* (Lytle et collab., 1998). D'après les études fonctionnelles les plus récentes et par inférence homologique avec les autres CCC comme NKCC1, il est aussi présumé que KCC3 dispose de deux sites de liaison pour le K^+ et de deux autres pour le Cl^- . Il n'est toutefois pas exclu que le nombre total de sites de liaison soit deux ou même six (Garneau et collab., 2017; Frenette-Cotton et collab., 2018).

Les sites de liaison des CCC ne sont pas parfaitement spécifiques aux ions typiquement considérés comme leurs substrats. Par exemple, KCC3 peut réaliser l'export du Br^- , vraisemblablement par son site de liaison pour le Cl^- (Mercado et collab., 2005). Il a également été montré que le NH_4^+ peut emprunter le ou les sites de liaison du K^+ des KCC (Bergeron et collab., 2003). Puisque le gradient électrochimique du NH_4^+ est habituellement dirigé vers le cytosol, il en résulte une activité de coimport électroneutre de $NH_4^+-Cl^-$ (Wall et collab., 1995; Evans et Turner, 1998). Il a même été proposé dans une communication sous forme d'abrégé à un congrès scientifique que KCC3 pouvait avoir une activité de coexport K^+ -bicarbonate dans des cellules rénales (Wang et collab., 2003), mais aucune donnée supplémentaire n'a été publiée en ce sens depuis.

1.3.5. Régulation la fonction et des étapes en amont

Comme pour toute protéine de transport, il existe au moins sept points de régulation (Lin et collab., 2015) de KCC3 : (1°) expression génétique, (2°) traduction, (3°) assemblage des structures tertiaire et quaternaire, (4°) adressage et incorporation dans la membrane, (5°) interaction avec des modulateurs allostériques endogènes ou exogènes, (6°) modifications posttraductionnelles et

(7°) dégradation. Dans cette section, quelques exemples associés à chaque point de régulation seront mentionnés afin d'exposer la variété des mécanismes impliqués.

1.3.5.1. Expression génétique

Du point de vue de l'expression génétique, il existe par exemple un polymorphisme dans le promoteur de *KCC3* qui a été associé à une diminution de l'expression du transporteur par méthylation de l'ADN ainsi qu'à des maladies psychiatriques (Moser et collab., 2009). Dans des modèles cellulaires, le facteur de nécrose tumorale α (*tumour necrosis factor α* , TNF- α ; Shen et collab., 2001) et le facteur de croissance dérivé des plaquettes (*platelet-derived growth factor*; Zhang et collab., 2003) ont des effets inhibiteurs sur la transcription de *KCC3*. Par opposition, différents stimulateurs de l'expression de *KCC3* ont été identifiés dans des cultures primaires de CMLv de rat : VEGF (Hiki et collab., 1999), le facteur de croissance insulino-mimétique-1 (*insulin-like growth factor 1*; Shen et collab., 2001; Hsu et collab., 2007), le monoxyde d'azote (NO), la guanylate cyclase, la guanosine monophosphate cyclique et la protéine kinase G (Di Fulvio et collab., 2003).

1.3.5.2. Traduction

Un allèle nouvellement décrit de *KCC3* menant à une diminution de la quantité de protéine produite a été associé à une susceptibilité accrue à l'épilepsie. Il semble que ce polymorphisme dans la région 3' non traduite (3' *untranslated region*) entraîne un repliement de l'ARN messager qui n'est plus parfaitement reconnu par la machinerie de traduction cellulaire (Chaudhuri et collab., 2021).

1.3.5.3. Assemblage des structures tertiaire et quaternaire

La formation d'un dimère contenant *KCC3* est un processus en plusieurs étapes qui peut mener à une homodimérisation ou à une hétérodimérisation avec un autre KCC ou même un autre CCC d'après des observations découlant de l'utilisation du système de deux hybride (Simard et collab., 2007) et de coimmunoprécipitation (Ding et collab., 2013). L'existence présumée de différents types de dimères implique que ceux-ci pourraient exhiber des caractéristiques fonctionnelles intermédiaires entre celles des homodimères correspondants et ainsi diversifier la nature du cotransport K^+Cl^- dans différents types cellulaires (Garneau et collab., 2019). Les KCC ont aussi la possibilité d'interagir directement avec d'autres protéines coexprimées. Par exemple, *KCC2* interagit directement dans les neurones avec la protéine *neuropilin and tolloid like-2* (aussi appelée

Neto2), qui est une protéine ancrée à la membrane régulant le trafic vésiculaire ainsi que différentes protéines de transport (Ivakine et collab., 2013).

1.3.5.4. Adressage et incorporation dans la membrane

D'après quelques études, jusqu'à 40 % des exemplaires protéiques de KCC3 sont inactifs, se retrouvent ailleurs qu'à la membrane cytoplasmique et portent des groupements phosphate inhibiteurs (Rinehart et collab., 2009; Sun et collab., 2012). Les exemplaires inactifs se retrouvent notamment dans des organites apparentés à des vésicules comme le phagosome des leucocytes activés (Sun et collab., 2012). Ces observations ne sont pas surprenantes, puisque plusieurs CCC sont régulés par un réseau de circulation des transporteurs entre la membrane cytoplasmique et des vésicules intracellulaires (*trafficking*; Marcoux et collab., 2019). L'accumulation d'un stock de protéines de transport temporairement inopérantes dans des structures intracellulaires est une façon pour la cellule d'augmenter rapidement l'activité de transport membranaire lorsqu'un stimulus d'exocytose se présente. L'export insulinosensible des vésicules de transporteurs de glucose constitue un exemple classique de ce mécanisme de régulation (Leto et Saltiel, 2012).

1.3.5.5. Modulateurs allostériques endogènes ou exogènes

En conditions isotoniques, l'activité de KCC3 semble minimale, voire silencieuse. Par contre, plusieurs conditions cellulaires agissent sur l'activité de KCC3. Notamment, une basse concentration de Cl^- , un rétrécissement du volume ou un pH à l'extérieur de l'intervalle compris entre 6,75 et 7,25 inhibent le transporteur, alors qu'une concentration élevée de Cl^- et un gonflement du volume ont un effet activateur (Garneau et collab., 2017). Différents agents pharmacologiques modulent également l'activité de KCC3 par allostérie. Entre autres, le furosémide et l'acide dihydroindényloxyalcanoïque (DIOA) ont des effets inhibiteurs, alors que le N-éthylmaléimide a un effet activateur. Le DIOA est particulièrement efficace pour inhiber KCC3 (IC_{50} rapporté de 9 μM , inhibition presque complète à 50 μM ; Race et collab., 1999), alors que le furosémide a un effet plus modéré ($\text{K}_{1/2}$ rapporté de 200 à 300 μM , activité résiduelle du transporteur persistante même à 2 mM; Mercado et collab., 2005). Le N-éthylmaléimide active puissamment l'activité de transport de KCC3, la multipliant par plus de 20 à une concentration de 200 μM (Race et collab., 1999). Alors que le bumétanide est un inhibiteur efficace des NKCC qui lui vaut son utilisation répandue comme diurétique en Europe (Malha et Mann, 2016), ce composé est au moins 100 fois moins puissant pour inhiber KCC3 (Race et collab., 1999). Les mécanismes moléculaires

sous-jacents à ces effets ne sont pas tous connus, mais il est admis que le N-éthylmaléimide alkyle les groupements thiol, et il a été proposé que le DIOA se fixe dans la fente centrale d'un dimère de KCC3 (voir la description de la structure protéique à la section 1.3.2; [X. Chi et collab., 2021](#)).

Très récemment, il a été révélé que KCC1 pouvait se lier à l'ADP et à l'ATP via un motif de liaison spécifique dans le domaine C-terminal du transporteur, et que KCC3 dispose d'un motif hautement similaire aux positions homologues ([G. Chi et collab., 2021](#)). Cette découverte pourrait avoir des retombées importantes qui restent toutefois à être étayées, mais elle appelle néanmoins à revisiter le *modus operandi* de la régulation des CCC. Ainsi, KCC3 pourrait être organisé en métabolon, c'est-à-dire un regroupement physique de protéines impliquées dans des étapes séquentielles d'un même processus ([Moraes et Reithmeier, 2012](#)). Dans ce cas-ci, KCC3 pourrait fournir l'ATP ou l'ADP à des kinases ou phosphatases qui elles-mêmes ont pour rôle de modifier l'état de phosphorylation du transporteur. D'autres possibilités seraient un métabolon liant les KCC à la pompe Na^+/K^+ -ATPase, puisque des liens fonctionnels les unissent ([Fujii et collab., 2008](#); [Bowerman et collab., 2017](#)) et une liaison des nucléosides phosphate aux KCC pour alimenter un changement conformationnel important au cours du cycle de transport ([G. Chi et collab., 2021](#)).

1.3.5.6. Modifications posttraductionnelles

Comme il l'a été mentionné au paragraphe précédent, les KCC sont stimulés par le gonflement cellulaire, et, d'après un modèle consensuel ayant émergé dans les années 1990 ([Lytle et Forbush, 1992](#); [O'Donnell et collab., 1995](#)), cette réponse survient en fait via la déphosphorylation du transporteur ([Kahle et collab., 2010](#)). En conditions isotoniques, les KCC sont porteurs de groupements phosphates inhibiteurs (particulièrement aux résidus thréonine 991 et 1048 dans le domaine C-terminal de KCC3; [Rinehart et collab., 2009](#)). Les conditions hypotoniques ont pour effet d'activer des phosphatases qui retirent ces groupements phosphate et favorisent l'activité des KCC. Inversement, les conditions hypertoniques stimulent un système de kinases à l'effet inhibiteur sur les KCC.

La machinerie de phosphorylation et de déphosphorylation de KCC3 inclut les *with-no-lysine* (WNK) kinases, *STE20/SPS1-related proline/alanine-rich kinase* (aussi appelé *oxidative stress-responsive 1*) et probablement un membre de la famille des protéines phosphatases 1. Ces enzymes font également partie de celles impliquées dans la phosphorégulation de la majorité des membres

de la famille des CCC (Gamba, 2005; Alessi et collab., 2014). Compte tenu de la présence d'une centaine de résidus et d'au moins six domaines identifiés comme pouvant vraisemblablement recevoir des modifications posttraductionnelles ou participer à des structures d'ordres supérieurs dans KCC3 (Garneau et collab., 2017), il est probable que de nouveaux mécanismes de régulation continueront à être révélés dans les années à venir.

1.3.6. Fonctions cellulaires

Les fonctions confirmées et présumées de KCC3 peuvent se résumer en trois catégories. D'abord, KCC3 a un impact sur le déplacement de ses substrats de part et d'autre des membranes cellulaires. Cette fonction primaire engendre des implications dans d'autres processus cellulaires, notamment dans la régulation du volume cellulaire. D'après plusieurs lignes d'évidences expérimentales, KCC3 est également soupçonné d'influencer des systèmes de transport ou des mécanismes dépendants des concentrations des substrats qu'il transporte. Quelques fonctions hypothétiques de KCC3 dans la cellule seront également présentées.

1.3.6.1 Cotransport K^+-Cl^-

La fonction primaire de cotransport K^+-Cl^- par KCC3 est attestée par des évidences obtenues dans différents contextes et de multiples équipes de recherche au fil des années. Par exemple, dans des oocytes de grenouille ou des cellules humaines immortalisées rénales embryonnaires, une surexpression de KCC3 se solde par un transport important de rubidiumⁱⁱⁱ, lequel se caractérise par une certaine dépendance à l'ion chlorure (Race et collab., 1999; Bergeron et collab., 2003; Gamba, 2005; Mercado et collab., 2005; Rinehart et collab., 2009). Il est à noter que le système d'expression hétérologue des oocytes de la grenouille *Xenopus laevis* permet une expression robuste des protéines de transport ainsi que de très bonnes estimations des paramètres cinétiques tels qu'on les mesurerait in vivo (Sigel, 1990).

Plusieurs autres expériences ont montré que des mutations perte de fonction dans *KCC3* abolissent son activité de transport dans des modèles d'expression cellulaires (Howard et collab., 2002; Salin-Cantegrel et collab., 2011), alors qu'une mutation gain de fonction (hyperactivité constitutive)

ⁱⁱⁱ Le rubidium est utilisé comme ion substitut puisqu'il mime le K^+ quant à sa charge et son rayon atomique, en plus d'être très peu abondant dans l'environnement, donc non contaminant pour les études de transport (Cheval et Doucet, 1990; Gamba 2005).

permet d'augmenter cette activité dans des cultures primaires de fibroblastes murins, ce qui a été contre-vérifié et confirmé dans des modèles de surexpression cellulaires aigus (Kahle et collab., 2016).

Chez des modèles de souris constitutivement et systémiquement inactivés (KO) pour *Kcc3*, une augmentation de la concentration intracellulaire de Cl^- a aussi été mesurée dans les neurones des ganglions spinaux (modèle^{iv} *HSyst-Kcc3*^{KO}, initialement décrit par Howard et collaborateurs en 2002; Lucas et collab., 2012), les cellules de Purkinje (modèle *BSyst-Kcc3*^{KO}; Boettger et collab., 2003) et les CMLV d'artères résistives (modèle *BSyst-Kcc3*^{KO}; Rust et collab., 2006). Ces résultats obtenus ex vivo dans des tranches de tissus appuient l'idée que KCC3 effectue un export de K^+ et de Cl^- , et que l'inhibition de KCC3 freine ce processus. L'activité des KCC est considérée comme importante dans différents types cellulaires, puisqu'elle contribue à diminuer légèrement la concentration intracellulaire de Cl^- sous son potentiel d'équilibre, établissant ainsi un gradient électrochimique dirigé vers le cytosol (Gamba, 2005).

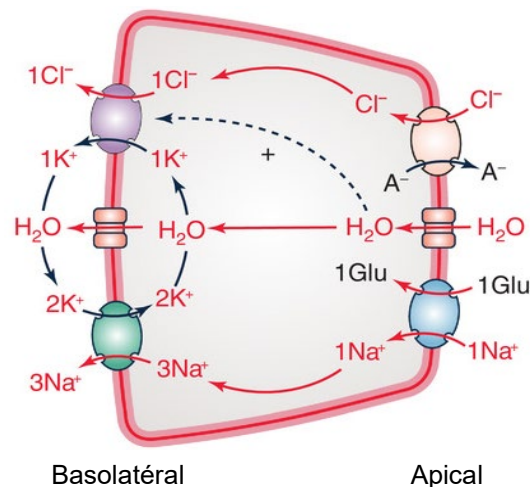
À noter que la concentration intracellulaire de Cl^- dans les neurones est primordialement plus élevée durant le développement embryonnaire et qu'elle diminue de manière importante en cours de route (*chloride switch*). Par contre, ce processus est orchestré notamment par une forte induction de KCC2 (Rivera et collab., 1999) et non de KCC3. En effet, l'inactivation génétique de *Kcc2* dans une sous-population neuronale (cellules de Purkinje) chez la souris compromettrait cette étape du développement, alors que l'inactivation de *Kcc3* dans les mêmes conditions n'avait pas d'effet délétère (Seja et collab., 2012).

^{iv} Les modèles de souris inactivées (KO) sont présentés selon une nomenclature harmonisée d'après une revue par notre groupe (Garneau et collab., 2017). La première lettre du nom du 1^{er} auteur de l'article où le modèle est présenté figure en indice au début de la désignation. Le ciblage de l'inactivation est ensuite indiqué (syst- pour systémique, neuro- pour neurospécifique, ou encore le promoteur utilisé). Le gène et le génotype global figurent à la fin. Par exemple, *gsyst-Kcc3*^{KO} indique qu'il s'agit d'une souris systémiquement inactivée pour *Kcc3* à l'état homozygote, modèle présenté par Garneau et collaborateurs en 2016. Lorsque pertinent, le génotype à chacun des allèles est présenté séparé par une barre oblique. La majorité des modèles présentés sont inactivés constitutivement. Les modèles inductibles sont présentés comme tels dans le texte, avec mention des modalités d'induction.

1.3.6.2 Transport transépithélial

Dans les cellules polarisées, comme les épithéliocytes du rein et du colon, on croit que le coexport K^+ - Cl^- par KCC3 constitue l'étape finale dans l'absorption de ces ions vers le milieu interstitiel (voir la Figure 5 pour un modèle). En effet, après l'import apical des ions K^+ et Cl^- (par des canaux, des CCC, d'autres transporteurs ou des pompes) depuis le milieu externe (urine primaire, chyme, etc.), KCC3 favorise le déplacement de ces ions hors de la cellule au pôle basolatéral opposé (Melo et collab., 2013; Garneau et collab., 2017; Garneau et collab., 2019). Un travail ainsi concerté entre des protéines de transport exprimées à chacun des pôles cellulaires permet un processus appelé transport transépithélial, ou transport vectoriel, dont l'effet net est le déplacement d'un soluté du milieu externe jusqu'au milieu interne (liquide interstitiel, sang, etc.), ou inversement. Le transport transépithélial est particulièrement important pour les fonctions d'excrétion ou d'absorption des épithéliums (Stein et Litman, 2015; Hall, 2016). Dans le cas de KCC3, les ions K^+ et Cl^- feraient l'objet d'une réabsorption nette du milieu externe vers le milieu interne, alors que les solutés NH_4^+ et Cl^- seraient transportés dans le sens inverse (Garneau et collab., 2019).

Figure 5 Transport transépithélial dans une cellule du tubule proximal



Note. Modèle proposé pour la réabsorption des solutés par transport vectoriel transépithélial. KCC3 est représenté en mauve et permet l'export basolatéral de K^+ et de Cl^- . Les déplacements correspondant à une réabsorption nette sont indiqués en rouge. A, anion. Glu, glucose. Adapté de « Physiological roles and molecular mechanisms of K^+ - Cl^- cotransport in the mammalian kidney and cardiovascular system: where are we? », par A. P. Garneau, A. A. Marcoux, S. Slimani, L. E. Tremblay, R. Frenette-Cotton, F. Mac-Way et P. Isenring, 2019, *Journal of Physiology*, 597(6), p. 1457 (<https://doi.org/10.1113/JP276807>). © 2019 par les auteurs, *The Journal of Physiology* et The Physiological Society. Adapté avec permission (rognage et superposition d'une traduction).

1.3.6.3 Régulation du volume cellulaire

Il a été montré qu'à la suite d'un stress hypotonique et du gonflement cellulaire conséquent à l'entrée rapide d'eau, les KCC participent à la diminution régulatrice du volume cellulaire (voir la section 2.1). En effet, l'augmentation du volume cellulaire active des phosphatases qui, à leur tour, activent KCC3 et d'autres KCC (Kahle et collab., 2010). L'efflux de K^+ et de Cl^- est nécessairement couplé à un efflux d'eau, lequel permet un retour du volume cellulaire vers la normale (Gamba, 2005).

1.3.6.4 Implication dans la croissance et la prolifération cellulaires

Dans des modèles cellulaires, il a aussi été montré que l'activation de KCC3 stimule la croissance cellulaire, et que l'inhibition par le DIOA renverse cet effet (Shen et collab., 2001). Il a été proposé que des changements de concentrations ioniques découlant de l'activité de KCC3 (par exemple une baisse de la concentration intracellulaire de Cl^-) activent certaines kinases clés du cycle cellulaire (Shen et collab., 2001). De plus, la stimulation de KCC3 apparaît sensible à certaines cytokines, dont des facteurs de croissance, et ce, parallèlement à la stimulation de la croissance cellulaire (Hiki et collab., 1999; Shen et collab., 2001).

1.3.6.5 Influence sur le potentiel membranaire

Alors que les NKCC contribuent dans certains types cellulaires à maintenir une concentration intracellulaire de Cl^- élevée et un gradient électrochimique dirigé vers le milieu extracellulaire, les KCC jouent vraisemblablement un rôle inverse dans des types cellulaires spécifiques, notamment les neurones (Kakazu et collab., 2000; Flores et collab., 2019). Or, la concentration intracellulaire de Cl^- a un impact important sur l'effet occasionné par l'ouverture de canaux chlorure électrogéniques. Un export de Cl^- amenuise le gradient électrochimique de cet anion ainsi que l'effet dépolarisant qui peut accompagner l'ouverture de canaux chlorure (Sun et collab., 2010; Pedersen et collab., 2016). Or, la dépolarisation membranaire est un processus cellulaire clé qui mène, selon le type cellulaire, à des phénomènes comme l'exocytose, la motilité ou plus particulièrement la contraction (Dulon et collab., 1988; Hansen et collab., 1998; Liang et collab., 2017). Par inférence, il a donc été proposé que la perte de fonction de KCC3 devrait stimuler la dépolarisation cellulaire et les effets qui s'y rattachent, notamment dans la CMLv (Rust et collab., 2006). Inversement, une augmentation de l'activité de KCC3 devrait favoriser les influx électrogéniques de Cl^- aux effets hyperpolarisants.

1.3.6.6 Impact sur d'autres systèmes de transport

Par un export de Cl^- , l'activité de *KCC3* favorise également l'activité d'autres systèmes de transport partageant ce substrat comme les cotransporteurs (antiporteurs) Cl^- /bicarbonate, aussi appelés échangeurs anioniques et pouvant notamment correspondre aux protéines *SLC4A1* ou *SLC26A7* (Saier, 2000). L'accroissement de l'entrée de Cl^- par les antiporteurs Cl^- /bicarbonate est couplé à une sortie accrue de bicarbonate, ce qui pourrait engendrer l'acidification du milieu intracellulaire. Du point de vue d'une CMLv, l'influence acidifiante de *KCC3* pourrait s'ajouter à l'effet hyperpolarisant. Ces deux stimulus sont défavorables à l'ouverture des canaux calciques et à la contraction (Garneau et collab., 2019). Dans une cellule polarisée comme celles des tubules rénaux, une sortie de bicarbonate au pôle basolatéral peut cependant favoriser la réabsorption de cet ion dans le liquide interstitiel et contrer l'acidification des liquides corporels occasionnée par l'alimentation et le métabolisme normaux (Stein et Litman, 2015; Hall, 2016).

1.3.7. Tableau clinique accompagnant les mutations chez l'humain

De manière intéressante, il a été montré chez l'humain que différentes mutations perte ou gain de fonction de *KCC3* sont liées à des pathologies impliquant principalement le système nerveux. Les atteintes motrices et sensitives ne sont pas de la même ampleur dans les deux cas, et d'autres différences plus subtiles ont été rapportées chez les individus affectés selon le type de mutation (Howard et collab., 2002; Kahle et collab., 2016). Il pourrait y exister un spectre de neuropathies découlant d'une activité anormale de *KCC3* durant le développement et affectant à des degrés divers les voies sensitives ou motrices ainsi que les structures centrales ou périphériques.

1.3.7.1. Polyneuropathie sensitivomotrice héréditaire

1.3.7.1.1. Découverte

Dans les années 2000, les efforts conjoints de différentes équipes de recherche ont permis de mettre en cause la perte de fonction du gène *KCC3* dans le développement d'une maladie neurodéveloppementale et neurodégénérative à transmission autosomale récessive appelée PNSMH — aussi dénommée neuropathie périphérique avec agénésie complète ou partielle du corps calleux, ou maladie de Charlevoix-Saguenay, ou encore syndrome d'Andermann. La PNSMH est une maladie rare, officiellement décrite par les neurologues Frederick et Eva Andermann à Montréal en 1972. Sa prévalence est inférieure à un cas par million de naissances mondialement

d'après les bases de données spécialisées en maladies rares (McKusick et collab., 1986; Institut national de la santé et de la recherche médicale, 2004). Une prévalence anormalement élevée est retrouvée dans quelques régions du Québec (voir la section 1.3.7.1.3).

1.3.7.1.2. Spécificité du diagnostic

En raison du tableau clinique complexe et de pénétrance variable, il est possible que la PNSMH soit sous-diagnostiquée dans les pays avec prévalence faible. En effet, les symptômes de la PNSMH peuvent être confondus à divers degrés avec ceux d'autres neuropathies comme la paralysie cérébrale, la diplégie atonique, l'ataxie de Friedreich, la polyneuropathie sensitivomotrice héréditaire de type II, la maladie de Charcot-Marie-Tooth et le syndrome de Werdnig-Hoffman pour ne nommer que les plus similaires (Andermann et collab., 1972; Andermann et collab., 1975; Dyck, 1975; Peyronnard et collab., 1976; Mathieu et collab., 1990). Environ 13 cas familiaux d'agénésie partielle ou complète du corps calleux accompagnée de retard mental et d'atteintes du système nerveux périphérique ont été décrits avant 1972 et montrent un tableau clinique hautement compatible avec un diagnostic de PNSMH (Zellweger, 1952; Naiman et Fraser, 1955; Ziegler, 1958; Menkes et collab., 1964; Andermann et collab., 1975; McKusick et collab., 1986).

1.3.7.1.3. Prévalence régionale

La prévalence de la PNSMH est particulièrement élevée dans le nord-est de la province de Québec, dans les régions de Charlevoix, du Saguenay–Lac-Saint-Jean et de la Haute-Côte-Nord. En 1993, on calculait qu'une personne sur 23 était porteuse d'une mutation pathogène dans *KCC3* et qu'une naissance sur 2117 était touchée par la PNSMH (De Braekeleer et collab., 1993) en raison d'effets fondateurs qui ont fait localement augmenter la probabilité de partager un allèle pathogène de *KCC3* (voir la section 1.3.7.1.4). En effet, l'immense majorité des patients atteints de la PNSMH au Québec ayant été génotypés portent une délétion homozygote tronquante dans l'exon 18 de *KCC3* (2436delG, Thr813fsX813 ou $\Delta 18^*$). Un génotype hétérozygote (HT) composite impliquant la mutation de l'exon 18 et une mutation dans l'exon 11 (1584_1585delCTinsG, Phe529fsX532) ont aussi été détectés à de très rares occasions (Howard et collab., 2002; Lauf et collab., 2006).

1.3.7.1.4. Effets fondateurs

On considère en fait que jusqu'à trois effets fondateurs se sont succédé dans le nord-est québécois depuis les années 1600, ce qui a contribué à la perte de variabilité génétique dans de petites

populations en essor après l'arrivée d'un nombre restreint de colons français (Morissette, 1991), incluant un individu ayant vraisemblablement importé à l'état HT et silencieux l'allèle $KCC3^{\Delta 18^*}$ pathogène (De Braekeleer et collab., 1993). L'isolement géographique de cette région et une natalité plus forte qu'ailleurs en province contribuent à expliquer la prévalence plus élevée de certaines maladies héréditaires rares qu'on y retrouve. La PNSMH fait partie de la liste de ces maladies, à laquelle s'ajoutent l'acidose lactique, l'ataxie de Charlevoix-Saguenay, la fibrose kystique, la tyrosinémie, l'hypercholestérolémie familiale et la dystrophie myotonique de type 1 (Laberge, 2007).

1.3.7.1.5. Tableau clinique principal et désordres sensitivomoteurs

Du point de vue clinique, les principales anomalies associées à la PNSMH touchent le système nerveux central et périphérique. En particulier, un faible tonus musculaire et des réflexes atténués sont notés dès le plus jeune âge. Des anomalies morphologiques — notamment au visage, aux articulations et aux extrémités — sont aussi typiques de la maladie (Andermann et collab., 1972; Andermann et collab., 1975).

La PNSMH est en partie associée à un retard dans le développement moteur, une faiblesse musculaire, une atrophie musculaire, des troubles sensitifs selon une distribution dite « en gants et en chaussettes » (*glove and stocking*; Gauvreau et collab., 2006) et des problèmes de coordination qui sont tous liés à une neuropathie périphérique s'installant progressivement. En fait, la vitesse de conduction dans les neurones moteurs est grandement diminuée, une activité électrique anormale est retrouvée à l'extrémité des membres au repos (fibrillations, décharges pseudomyotoniques, etc.) ou lors des commandes motrices (amplitude et durée des potentiels d'action augmentées), et les potentiels d'actions sensoriels ne sont pas détectables (Larbrisseau et collab., 1984). La faiblesse musculaire et le manque de coordination s'inscrivent aussi dans le cadre d'une atteinte pyramidale, c'est-à-dire du motoneurone supérieur, en ce sens qu'elle inclut une spasticité et des réponses réflexes exagérées (Auer et collab., 2016).

L'atteinte neurologique fait en sorte que plusieurs patients atteints de la PNSMH perdent la capacité de se tenir debout ou de marcher (Larbrisseau et collab., 1984; Mathieu et collab., 1990). L'étude des potentiels d'action composites musculaires chez deux patients a par ailleurs révélé une amplitude électrique très faible, indicative de faiblesse neuromusculaire importante, sans signes

apparents de fatigabilité (Bowerman et collab., 2017). La détérioration de la fonction motrice, combinée à l'éventuel développement d'une scoliose autour de l'âge de 10 ans, nécessite l'utilisation d'aides au déplacement et confine les malades à un fauteuil roulant ou même à l'alitement avant l'âge de 20 ans, parfois même dès l'âge de 3 ans (Auer et collab., 2016). La vaste majorité des muscles striés sont affectés, incluant ceux du visage et du tronc et en particulier les muscles respiratoires. L'incapacité de dégager les voies aériennes entraîne une susceptibilité accrue aux infections portées par l'air, qui, combinée à la faible réserve ventilatoire, mène typiquement au décès dans la vingtaine (Larbrisseau et collab., 1984; Mathieu et collab., 1990; Gauvreau et collab., 2006; Auer et collab., 2016).

1.3.7.1.6. Autres désordres neurologiques

Au surplus, les patients atteints de PNSMH accusent un retard mental de sévérité variable se surimposant aux troubles sensitivomoteurs et dysarthriques (Gauvreau et collab., 2006). Ces patients peuvent aussi souffrir de convulsions, d'hallucinations visuelles ou auditives et d'autres syndromes neuropsychiatriques (Filteau et collab., 1991; Dupré et collab., 2003).

1.3.7.1.7. Anomalies anatomiques du système nerveux central

Le poids du cerveau des patients mesuré à l'autopsie était systématiquement supérieur à la moyenne (de 5 à 25 %; Hartmann et collab., 1994; Auer et collab., 2016). Cette observation est remarquable compte tenu de la petite taille corporelle rapportée (voir la section 1.3.7.1.12).

Des analyses radiologiques ont révélé une agénésie complète du corps calleux chez 58 % des patients, partielle chez environ 9 %, ou indétectable chez près de 33 % (Mathieu et collab., 1990). Lors d'analyses post mortem, des trouvailles similaires ont été faites, mais le degré d'atteinte du corps calleux n'était pas corrélé à la sévérité des symptômes (Auer et collab., 2016). De fait, l'implication précise du corps calleux semble négligeable dans les manifestations de la PNSMH et reste inexplicée, ce qui peut paraître surprenant puisque le rôle de cette structure consiste essentiellement à bonifier l'activité respective de chaque hémisphère cérébral grâce à la communication subconsciente d'informations intégrées provenant de l'hémisphère controlatéral dans le cadre de processus comme la mémoire et le contrôle moteur (Myers, 1965; Auer et collab., 2016; Hall, 2016).

Dans quelques cas de PNSMH, l'hippocampe était légèrement incliné latéralement, mais le néocortex et la moelle épinière ont toutefois été jugés normaux à l'échelle macroscopique (Auer et collab., 2016). Les autopsies ont également révélé que, chez les patients atteints de PNSMH, la taille des pyramides dans le bulbe rachidien est réduite de près de 60 % par rapport aux sujets témoins, et que la taille des pyramides des patients correspond à la capacité locomotrice résiduelle (Auer et collab., 2016).

1.3.7.1.8. Anomalies histologiques du système nerveux

La matière blanche cérébrale et les tractus corticospinaux des patients avec PNSMH portent quelques lésions sous forme de vacuolisations dispersées — certaines d'entre elles remplies de neurofilament — ainsi que des foyers de régénérescence axonale appelés axonomes (Auer et collab., 2016). Dans le système nerveux périphérique, une perte axonale variable peut être observée, en particulier dans les racines nerveuses sensibles, mais surtout motrices. Une fibrose est parfois notée dans l'enveloppe endoneurale (Auer et collab., 2016), la couche de tissu conjonctif entourant les fibres nerveuses. De manière frappante, les axones résiduels dans les racines spinales et les nerfs crâniens peuvent montrer un gonflement massif : leur diamètre atteignait jusqu'à 120 μm en comparaison à 0,1 à 10 μm normalement (Dupré et collab., 2003; Auer et collab., 2016; Costa et collab., 2018). Les axones résiduels sont tout de même entourés d'une gaine de myéline bien organisée quoique souvent amincie, alors que les cellules gliales ne montrent pas d'anomalies histologiques (Dupré et collab., 2003; Auer et collab., 2016). En plus des vacuoles et des axonomes, les nerfs périphériques présentent des dépôts anormaux (densités floconneuses ou *flocculent densities*) superposés aux mitochondries (Auer et collab., 2016). Les lésions histologiques affichées par les neurones sont en toute vraisemblance des manifestations peu spécifiques découlant primitivement du gonflement cellulaire substantiel, particulièrement dans les axones (Auer et collab., 2016).

1.3.7.1.9. Analyses biochimiques dans le système nerveux

Une évaluation chimique du contenu du cerveau a été conduite chez un patient atteint d'agénésie héréditaire du corps calleux (Menkes et collab., 1964) correspondant en toute vraisemblance à un cas de PNSMH. Cette évaluation a révélé une diminution généralisée de la concentration de lipides, en particulier dans les fractions des cérébrosides et du cholestérol des matières blanche et grise, ainsi que des phospholipides de la matière blanche spécifiquement. La distribution des différents

acides gras parmi les cérebrosides était aussi assez différente du patron normal (Menkes et collab., 1964). Le liquide cébrospinal, étudié chez plusieurs patients, renfermait une concentration de protéines et d'acides aminés plus élevée que la normale, tandis que la concentration d'immunoglobulines était systématiquement à la limite supérieure de la normale, voire plus élevée (Menkes et collab., 1964; Mathieu et collab., 1990), ce qui pourrait indiquer une réponse immunitaire active (Hall, 2016).

1.3.7.1.10. Impact de la temporalité de la perte de fonction

Pour mieux comprendre à quel stade du développement l'absence de KCC3 est susceptible d'engendrer la PNSMH, une étude récente par Flores et Delpire (2021) a élégamment mis à profit différentes constructions génétiques temporellement contrôlables pour créer deux modèles de souris distincts. Le premier ($_{F}Pvalb-Kcc3^{KO}$) est un modèle d'inactivation de *Kcc3* spécifique à une sous-population neuronale, où la perte de fonction cible les cellules exprimant le gène de la parvalbumine ou *Pvalb*, par opposition à un modèle systémique, et inductible à l'âge désiré, par opposition à constitutive. Le second ($_{F}syst-Kcc3^{KO}$) est un modèle constitutivement et systématiquement inactivé pour *Kcc3* où l'expression peut être rétablie dans la même sous-population neuronale ciblée (cellules exprimant *Pvalb*). Les différentes interventions ont montré que l'inactivation ciblée de *Kcc3* amorcée aux stades juvénile ou adulte n'a pas d'effet neurologique notable, alors que l'absence constitutive de *Kcc3* durant le développement prénatal engendre une neuropathie qui ne s'estompe pas après un rétablissement de l'expression de *Kcc3* au stade adulte. Ces résultats suggèrent donc que, dans la PNSMH, les atteintes des nerfs centraux et périphériques sont irréversibles.

1.3.7.1.11. Composante développementale

La PNSMH se révèle comme une maladie empreinte d'une importante composante développementale en lien avec un environnement ionique anormal durant le développement prénatal en l'absence de KCC3. Le plein développement de certaines fibres nerveuses apparaît suspendu prématurément (Dupré et collab., 2003; Auer et collab., 2016; Flores et Delpire, 2021). Durant le développement postnatal, l'absence de KCC3 enfreint vraisemblablement la régulation osmotique des axones, particulièrement dans le système nerveux périphérique, ce qui engendre une gamme de lésions cellulaires incluant un gonflement, mais aussi une vacuolisation et une dégénérescence de neurones sévèrement compromis structurellement (Auer et collab., 2016).

1.3.7.1.12. Faibles masse et taille corporelles

Devant le tableau neurologique sévère qui affecte les patients atteints de la PNSMH, peu d'attention a été accordée à d'éventuelles anomalies touchant les autres systèmes physiologiques. Dans un récent rapport clinique au sujet de huit patients québécois porteurs de la mutation $\Delta 18^*$ et de deux cas similaires dans les fratries, des particularités corporelles sont rapportées dans le détail pour la première fois (Auer et collab., 2016). Entre autres, la taille corporelle mesurée au décès entre 26 et 34 ans était entre 1 m 27 et 1 m 40, alors que la masse corporelle se situait entre 22 et 34 kg. De façon intéressante, parmi les poids de naissance disponibles, une grande hétérogénéité existait : notons un cas au 75^e percentile, deux cas près du 50^e et un autre sous le 3^e percentile^v. La patiente au 75^e percentile a développé une « obésité sévère » dès l'âge de 10 ans (Auer et collab., 2016), ce qui suggère chez elle la présence d'une susceptibilité génétique indépendante de *KCC3*.

Le phénotype de faible poids corporel associé à la perte de fonction de *KCC3* ne semble pas anecdotique, puisqu'il a été rapporté chez des chiens d'élevage porteurs de deux mutations perte de fonction de *Kcc3* (Van Poucke et collab., 2019) et dans au moins trois lignées de souris inactivées pour *Kcc3* de manière systémique ou ciblée à la majorité des neurones (modèles *BSyst-Kcc3*^{KO}, *SSyst-Kcc3*^{KO} et *sneuro-Kcc3*^{KO}; Rust et collab., 2007; Shekarabi et collab., 2012). Le poids corporel des modèles murins *Kcc3*^{KO} sera abordé plus en détail à la section 1.3.8.2.3.

1.3.7.1.13. Défauts dans la fonction respiratoire

Quelques rapports cliniques font état d'une détérioration de la fonction respiratoire chez les patients atteints de PNSMH. En outre, leur réserve respiratoire est très fortement réduite et leur susceptibilité aux infections peut être fatale (Larbrisseau et collab., 1984; Mathieu et collab., 1990; Gauvreau et collab., 2006), tel que mentionné plus haut (voir la section 1.3.7.1.5).

1.3.7.1.14. Propriétés des érythrocytes

Les érythrocytes isolés de patients atteints de PNSMH avaient un comportement normal en conditions de base quant au contenu en eau et en ions Na^+ , K^+ et Cl^- , à la fragilité osmotique et au flux potassique (Lauf et collab., 2006). Cependant, les érythrocytes des patients répondaient moins

^v Percentiles calculés d'après des courbes adaptées pour la région et pour le sexe (Groupe canadien d'endocrinologie pédiatrique, 2014).

fortement à la stimulation du cotransport K^+-Cl^- par le N-éthylmaléimide et par la déplétion en magnésium du milieu physiologique, une manœuvre connue pour activer les KCC (Ellory et collab., 1983; Lauf et collab., 1994). Ainsi, chez les patients atteints de PNSMH, les érythrocytes pourraient avoir une déficience d'adaptation au stress oxydatif ou à la régulation par phosphorylation puisque le magnésium est un cofacteur essentiel des enzymes phosphorégulatrices (Lauf et collab., 2006).

1.3.7.2. Neuropathie découlant du gain de fonction

L'importance cellulaire de KCC3 est mise en relief par les effets d'un autre type de mutation dans cette protéine. En effet, un regroupement de chercheurs des États-Unis a rapporté le cas d'un garçon de 10 ans portant une mutation faux-sens HT de novo (c.2971A>G; T991A dans l'exon 22 et dans le domaine C-terminal) menant au remplacement du résidu phosphoaccepteur thréonine 991 par un résidu alanine. Des études *in vitro* ont montré que cette mutation mène à une augmentation de l'activité du transporteur (gain de fonction), puisque la phosphorylation inhibitrice à la position 991 ne peut être exercée sur un résidu alanine. Le tableau clinique de la maladie était caractérisé par une neuropathie à prédominance motrice sans anomalies à l'imagerie cérébrale, ni atteinte cognitive, ni traits dysmorphiques. La conduction nerveuse était légèrement ralentie, alors que l'amplitude des potentiels d'actions était grandement réduite. Des biopsies ont révélé une légère perte axonale ainsi que de nombreuses myofibrilles atrophiées parsemées de quelques myofibrilles hypertrophiques, ce qui laissait supposer une dénervation musculaire. De façon intéressante, le patient présentait également une atrophie musculaire et une accumulation de tissu adipeux sous-cutané, accompagnées d'une diminution de la concentration sérique de créatinine (Kahle et collab., 2016).

Curieusement, chez le modèle animal porteur de l'allèle T991A, les souris type sauvage (*wild type*, WT) et HT étaient pratiquement identiques des points de vue physique, locomoteur, neuroanatomique et neurofonctionnel. La souris KO présentait toutefois la majorité du tableau clinique du patient index ainsi que des défauts structuraux des axones périphériques. Certains axones du nerf sciatique étaient entourés de deux anneaux de myéline, ce qui suggère un défaut de contact entre l'axone et les cellules de Schwann. La gaine de myéline était aussi rompue dans environ 11 % des axones de ce nerf. La souris homozygote avait une réduction de 16 % de masse corporelle par rapport aux souris WT et de 27 % par rapport aux souris HT ($p = 0,14$ et $0,002$,

respectivement). L'âge ou les autres mesures corporelles n'étaient pas précisés (Kahle et collab., 2016).

1.3.8. Fonctions physiologiques

Certains indices sur la pertinence physiologique de KCC3 ont été fournis par l'étude détaillée de différentes lignées de souris génétiquement modifiées pour modéliser la PNSMH. Ces modèles in vivo ont été d'une importance cruciale pour élucider le rôle du cotransporteur dans la fonction neuronale et les bases moléculaires des atteintes neurologiques dans la PNSMH. Ils ont aussi permis de comprendre dans quels processus physiologiques *Kcc3* joue un rôle important, voire essentiel (Gagnon et Delpire, 2013). Il faut toutefois garder en tête que dans les modèles murins d'inactivation génétique, les différences interspécifiques, l'influence du fond génétique et la mise en place de mécanismes de compensation au cours du développement (Eisener-Dorman et collab., 2009) peuvent limiter la portée de l'interprétation des traits phénotypiques observés en relation avec les symptômes décrits chez l'humain.

1.3.8.1. Fonctions dans le système nerveux

1.3.8.1.1 Développement du corps calleux

Chez la souris comme chez l'humain, la pénétrance de l'agénésie du corps calleux est loin d'être absolue lorsqu'aucun allèle sain de *Kcc3* n'est présent. Par exemple, deux lignées homozygotes pour une mutation perte de fonction dans *Kcc3* ne montrent pas de signes d'agénésie du corps calleux (modèles $_{H}^{syst-Kcc3^{KO}}$ et $_{B}^{syst-Kcc3^{KO}}$; Howard et collab., 2002; Boettger et collab., 2003). Un autre groupe ayant suivi le développement de la structure à différents stades embryonnaires ou adultes a noté une hypoplasie du corps calleux dans deux modèles de PNSMH ($_{SS}^{syst-Kcc3^{KO}}$ et $_{S}^{neuro-Kcc3^{KO}}$), un défaut qui a été attribué à une anomalie du maintien des axones du corps calleux plutôt qu'à une lacune développementale (Shekarabi et collab., 2012).

1.3.8.1.2 Activité électrique du système nerveux

Dans les souris $_{B}^{syst-Kcc3^{KO}}$, plusieurs atteintes fonctionnelles ont été décrites dans le système nerveux en plus des anomalies histologiques. De façon remarquable, l'activité électrique cérébrale de ces souris est erratique et ponctuée de complexes de décharges de haute amplitude (Boettger et collab., 2003). Ces souris ne souffrent pas de convulsions spontanées, mais sont plus susceptibles

d'en subir après exposition à un composé étheré lorsque comparées à des souris WT (Boettger et collab., 2003). La conduction nerveuse périphérique est également plus lente dans le modèle $_{H}Syst-Kcc3^{KO}$ en comparaison avec les souris témoins (Sun et collab., 2010). De surcroît, chez des souris WT, l'inhibiteur des KCC DIOA a un effet ralentisseur mais réversible sur la conduction nerveuse (Sun et collab., 2010).

1.3.8.1.3. Posture et démarche

De façon remarquable, toutes les lignées de souris systémiquement inactivées pour *Kcc3* présentent une posture et une démarche anormales : ces animaux sont prostrés, ataxiques et se déplacent souvent en traînant les pattes arrière (modèles $_{H}Syst-Kcc3^{KO}$, $_{B}Syst-Kcc3^{KO}$, $_{J}Syst-Kcc3^{KO}$, $_{SS}Syst-Kcc3^{KO}$, $_{JS}Syst-Kcc3^{KO}$, $_{FS}Syst-Kcc3^{KO}$ et $_{S}Neuro-Kcc3^{KO}$; Howard et collab., 2002; Boettger et collab., 2003; Byun et Delpire, 2007; Jiao et collab., 2008; Sun et collab., 2010; Shekarabi et collab., 2012; Flores et Delpire, 2021). L'ataxie peut être mise en évidence lors d'un test de suspension par la queue, durant lequel test les souris ont des mouvements adducteurs spastiques et atoniques, contrairement au réflexe normal d'abduction. Cette modification du réflexe indique une faiblesse généralisée (motrice et distale)(Sun et collab., 2010). Les souris $_{H}Syst-Kcc3^{KO}$, $_{SS}Syst-Kcc3^{KO}$, $_{FS}Syst-Kcc3^{KO}$ et $_{S}Neuro-Kcc3^{KO}$ ont également une performance médiocre aux tests locomoteurs sur poutre étroite ou tige rotative (*rotarod*; Howard et collab., 2002; Sun et collab., 2010; Shekarabi et collab., 2012; Flores et Delpire, 2021). De manière intéressante, la mauvaise performance de la souris $_{S}Neuro-Kcc3^{KO}$ à l'épreuve de la poutre était stable entre les âges d'un et de six mois, alors que la performance de la souris $_{SS}Syst-Kcc3^{KO}$ s'est davantage détériorée durant la même période (Shekarabi et collab., 2012). Ces résultats suggèrent l'implication de désordres extraneurologiques dans la détérioration de la démarche. Les souris $_{H}Syst-Kcc3^{KO}$ sont également incapables de rester longtemps suspendues en s'agrippant à un grillage, ce qui note un manque de développement de force préhensile (Howard et collab., 2002). Une cyphose (déformation convexe de la colonne vertébrale dorsale) a par ailleurs été notée, autant dans le modèle $_{SS}Syst-Kcc3^{KO}$ que $_{S}Neuro-Kcc3^{KO}$ (Shekarabi et collab., 2012).

Afin de déterminer quel type cellulaire est à l'origine du développement des troubles sensorimoteurs de la PNSMH, Ding et Delpire (2014) ont comparé les phénotypes sensitifs et locomoteurs de lignées de souris constitutivement inactivées pour *Kcc3* en utilisant quatre

promoteurs différents pour cibler l'inactivation à certaines sous-populations neuronales ou gliales. Les résultats obtenus ont varié en fonction du promoteur utilisé.

Tel que mentionné plus haut, l'inactivation ciblant les cellules *Pvalb*⁺ était suffisante pour générer un phénotype de posture et de démarche anormales (modèle *D_{Pvalb}-Kcc3*^{KO}; [Ding et Delpire, 2014](#)). Dans le système nerveux, deux types de neurones expriment le gène *Pvalb* : (1°) les interneurons GABAergiques à décharge rapide dans le cerveau et (2°) les neurones afférents proprioceptifs de type Ia dont les noyaux sont logés dans les ganglions spinaux et qui font synapse avec des interneurons de la matière grise spinale ainsi qu'avec des motoneurons de la corne ventrale ([Ding et Delpire, 2014](#)). Encore faut-il noter que *Pvalb* est exprimé à des niveaux significatifs à l'extérieur du système nerveux (notamment dans les tissus endocriniens, le muscle et le rein; [Ecob-Prince et Leberer, 1989](#); [The Jackson Laboratory, s. d.-a](#)). Ainsi, l'utilisation de ce promoteur étend à priori l'inactivation de *Kcc3* à des structures extraneurologiques.

Dans l'étude de [Ding et Delpire \(2014\)](#), aucun phénotype neurologique n'a été détecté dans les modèles où la perte de fonction de *Kcc3* était constitutive et ciblée aux cellules exprimant l'énolase 2 (ou *Eno2*, neurones matures), le canal Na_v1.8 (ou *Scn10a*, neurones responsables de la transmission de la perception de chaleur, de pression mécanique et de douleur), le médiateur signalétique *desert hedgehog* (ou *Dhh*, neurolemmocytes formant la gaine de myéline autour des neurones périphériques). Le même constat a été fait pour un modèle où le promoteur utilisé était la protéine 2 des cellules de Purkinje (ou *Pcp2/L7*, neurones dans le cervelet; [Seja et collab., 2012](#)).

En revanche, dans le modèle *sneuro-Kcc3*^{KO} avec atteintes posturales et locomotrices décrit plus haut, l'inactivation ciblait les cellules exprimant la synapsine 1 (ou *Syn1*, majorité des neurones; [Shekarabi et collab., 2012](#)). Il est important de noter qu'en raison de la haute spécificité de l'expression des promoteurs *Dhh*, *Eno2*, *Pcp2/L7*, *Pvalb* et *Scn10a*, ceux-ci ne peuvent pas être facilement comparés aux modèles d'inactivation touchant la majorité des neurones (*neuro-Kcc3*^{KO}). En outre, alors que le promoteur de *Syn1* est activé durant le développement embryonnaire et postnatal, le promoteur de *Eno2* est induit spécifiquement lors de la synaptogenèse et permet donc de cibler les neurones matures, ce qui a probablement empêché d'engendrer un modèle d'inactivation génétique touchant le développement neuronal ([Forss-Petter et collab., 1990](#); [Schoch et collab., 1996](#); [Ding et Delpire, 2014](#)).

1.3.8.1.4. Activité locomotrice

De manière surprenante, lorsque le phénotype locomoteur a été observé durant des périodes de 90 minutes chez les modèles de souris *ssyst-Kcc3^{KO}* et *sneuro-Kcc3^{KO}* à l'âge de 5 mois, la distance ambulatoire parcourue était supérieure à celle des souris témoins, tout comme l'activité stéréotypique (Shekarabi et collab., 2012), cette dernière correspondant aux mouvements répétés sur place ou dans l'axe vertical comme le toilettage, des tremblements ou des sauts répétés (Lewis et collab., 2007). L'ampleur de l'augmentation de l'activité stéréotypique par rapport aux témoins était encore plus importante chez les souris *ssyst-Kcc3^{KO}* que chez les souris *sneuro-Kcc3^{KO}*. L'hyperactivité globale dans les lignées *ssyst-Kcc3^{KO}* et *sneuro-Kcc3^{KO}* a été jugée comme inattendue par les auteurs et a été suggérée comme un trait transitoire avant que ne s'installe une infirmité sévère, puisque l'aspect des souris au repos à l'âge de 12 mois suggère une faiblesse prononcée des membres arrière et des mouvements désorganisés (Shekarabi et collab., 2012).

1.3.8.1.5. Audition

La perte d'audition est un autre phénotype à pénétrance partielle chez les souris *Kcc3^{KO}*. En effet, deux lignées systémiquement inactivées montraient des signes de défauts auditifs (modèles *BSyst-Kcc3^{KO}* et *SSyst-Kcc3^{KO}*; Boettger et collab., 2003; Shekarabi et collab., 2012), alors que la lignée *ssyst-Kcc3^{KO}* avait une audition jugée normale (Shekarabi et collab., 2012). Ces résultats indiquent que le défaut d'audition provient de l'absence de KCC3 dans des cellules autres que des neurones, probablement dans des épithéliocytes de l'organe de Corti (Boettger et collab., 2003; Garneau et collab., 2017).

1.3.8.1.6. Nociception

La composante sensitive de la PNSMH a également été évaluée dans les modèles murins par la détection de défauts nociceptifs. Ces expériences ont montré que les modèles *ssyst-Kcc3^{KO}* et *sneuro-Kcc3^{KO}* ont une élévation du seuil de la douleur chimique, lequel était plus prononcé chez le modèle *sneuro-Kcc3^{KO}* (Shekarabi et collab., 2012). Une autre équipe a évalué la perception thermique et a montré une élévation du seuil de douleur dans le modèle *HSyst-Kcc3^{KO}* (Byun et Delpire, 2007). Ces résultats indiquent notamment que des neurones nociceptifs non myélinisés seraient affectés dans les modèles de PNSMH (Byun et Delpire, 2007).

1.3.8.1.7. Comportement exploratoire

Lorsque testé, le comportement exploratoire de la lignée $_{H}^{syst-Kcc3^{KO}}$ s'est montré réduit en comparaison avec les souris WT, que ce soit chez les souris porteuses de l'allèle muté à l'état HT ou homozygote (Howard et collab., 2002). Les auteurs ont associé ce trait au retard mental noté chez les patients atteints de PNSMH et ont exclu la possibilité de comportements anxieux chez les souris mutées puisqu'elles ont passé une quantité normale de temps dans la périphérie de l'enceinte expérimentale (Howard et collab., 2002). La recherche en comportement du rongeur a effectivement montré que lors des premières minutes d'exploration d'un nouvel environnement restreint, ces animaux ont tendance à demeurer en périphérie pour en faire une cartographie mentale, alors que l'exploration du centre est associée à un comportement plus téméraire (Prut et Belzung, 2003). L'administration de drogues anxiogènes aux rongeurs a d'ailleurs pour effet de faire augmenter le temps qu'ils passent en périphérie d'une enceinte de test (Simon et collab., 1994).

1.3.8.1.8. Anatomie et fonction de la plaque motrice

Chez les souris $_{SS}^{syst-Kcc3^{KO}}$ et $_{S}^{neuro-Kcc3^{KO}}$, la plaque motrice est partiellement dénervée et anatomiquement désorganisée dès le stade juvénile, et ce, avant tout signe de perte axonale. De façon intéressante, l'administration de l'anticonvulsant carbamazépine durant 20 jours a un effet bénéfique sur l'innervation et l'organisation cellulaire de la plaque motrice des souris $_{SS}^{syst-Kcc3^{KO}}$. Ce résultat suggère qu'une fréquence d'activité spontanée anormalement élevée des motoneurons peut contribuer aux anomalies de la plaque motrice chez le modèle (Bowerman et collab., 2017).

1.3.8.2. Fonctions extraneurologiques

Lors de la recherche des mécanismes causant la PNSMH, différentes équipes ont aussi rapporté des anomalies extraneurologiques. Ces anomalies ont été révélées dans certains des modèles présentés plus haut pour leurs anomalies neurologiques. Un sommaire des trouvailles d'intérêt est suggéré dans la *Discussion* au Tableau 3.

1.3.8.2.1. Transport rénal de solutés et polydipsie

Une polydipsie (+22 % de quantité consommée) a aussi été observée dans la lignée $_{BS}^{syst-Kcc3^{KO}}$, laquelle présentait également une élévation de la PA (Adragna et collab., 2004), comme il le sera

discuté en détail ci-dessous. Puisque l'osmolalité plasmatique et l'hématocrite étaient normaux, les auteurs ont conclu que l'apport en eau était équilibré en fonction de l'excrétion rénale et ont avancé que l'angiotensine (Ang) pourrait être impliquée dans la polydipsie sans fournir de résultats en ce sens, ni de discussion étayée (Adragna et collab., 2004). L'histologie du tubule proximal et les paramètres urinaires de la souris *BSyst-Kcc3^{KO}* étaient par ailleurs rapportés comme étant normaux (Boettger et collab., 2003). Dans un abrégé à un congrès scientifique en 2003, Wang et collaborateurs faisaient toutefois état d'un défaut rénal tubulaire proximal chez des souris *HSyst-Kcc3^{KO}* grâce à des études de microperfusion *in vivo*. Ils avaient aussi observé une diminution de 3,4 mM de la bicarbonatémie en comparaison avec les témoins (ou -13 %), une acidification du pH sanguin (7,28 contre 7,34 chez les témoins), une polyurie et une polydipsie, mais aucune anomalie dans les autres électrolytes plasmatiques ni dans l'excrétion rénale de Na⁺ ou de K⁺.

1.3.8.2.2. Pression artérielle

Deux lignées indépendantes d'inactivation systémique et constitutive de *Kcc3* ont été caractérisées du point de vue hémodynamique. Une première équipe a rapporté des résultats de ce point de vue à deux reprises avec le même modèle animal, et une deuxième équipe l'a fait une seule fois.

La première équipe (composée initialement de Boettger et collaborateurs) faisait état en 2003 d'une PA moyenne diurne de 118 mmHg chez les souris *BSyst-Kcc3^{KO}* (contre 100 mmHg chez les témoins), telle que mesurée durant une heure, deux ou trois jours après l'implantation d'un cathéter fémoral sous anesthésie selon un protocole décrit précédemment par certains membres de l'équipe de recherche (Just et collab., 2000). Cette équipe (composée ensuite de Rust et collaborateurs) faisait état en 2006 de trouvailles similaires dans leur modèle grâce au même protocole — valeurs de PA moyenne plus élevées chez les animaux KO en comparaison avec les animaux WT, c'est-à-dire, 116 contre 103 mmHg —, mais cela dans le cadre d'une évaluation cardiovasculaire plus détaillée.

L'hypothèse de départ de Rust et collaborateurs (2006) voulait que l'absence de KCC3 dans les CMLv favorise la dépolarisation cellulaire et l'influx de Ca²⁺ secondairement, engendrant une élévation de résistance périphérique par vasoconstriction des artérioles. Toutefois, cette hypothèse vasculogénique ne s'est pas vue supportée puisque, malgré une hausse de la concentration

intracellulaire de Cl^- mesurée dans les CMLv de l'artère saphène des souris KO en comparaison avec les témoins, la réactivité et la réponse myogénique d'artères saphènes de 1^{er} ou de 3^e ordre étaient normales, y compris la réponse au NO. Les auteurs ont suggéré que des mécanismes neurogéniques expliquaient donc l'hypertension artérielle (HTA) de leur modèle, d'autant plus que celui-ci affichait des taux légèrement élevés de catécholamines urinaires (33 à 57 % plus que les témoins) et que l'inhibition des récepteurs adrénergiques α_1 et de la transmission ganglionnaire in vivo normalisait la PA. Par contre, le taux d'aldostérone circulante était lui aussi plus élevé que chez les témoins (> 125 %), mais les auteurs ont écarté une implication de la glande corticosurrénale, puisqu'ils n'y ont pas détecté l'expression de KCC3 et que, globalement, la morphologie et la modulation du Ca^{2+} intracellulaire étaient normales dans la glande surrénale en réponse à l'acétylcholine et à l'acide γ -aminobutyrique.

La deuxième équipe de recherche (composée d'Adragna et collaborateurs) a rapporté en 2004 une PA moyenne de 138 mmHg le jour et 152 mmHg la nuit chez la lignée $\text{HSyst-Kcc3}^{\text{KO}}$, contre respectivement 103 et 117 mmHg chez les souris témoins. Les mesures étaient faites par radiotélémétrie durant 24 heures, sept à dix jours après l'implantation de la sonde via l'artère carotide. Tel que mentionné plus haut, ce modèle présentait également une polydipsie sans signes de défauts de régulation du volume extracellulaire (osmolalité plasmatique et hémocrite normaux). Les auteurs ont avancé différentes explications pour justifier le phénotype de la souris $\text{HSyst-Kcc3}^{\text{KO}}$, sans toutefois s'avancer dans des hypothèses mécanistiques en lien avec leurs résultats : le système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA) pourrait être hyperactif et les vaisseaux sanguins pourraient avoir une déficience dans la réponse vasorelaxante au NO ou un tonus musculaire lisse accru (Adragna et collab., 2004). L'étude de Rust (2006) indiquait toutefois une fonction vasculaire normale.

1.3.8.2.3. Masse corporelle

L'équipe de Howard (2002) a observé une masse corporelle normale dans le modèle $\text{HSyst-Kcc3}^{\text{KO}}$ aux âges de 3 et 8 semaines, malgré des groupes de tailles importantes ($n = 132$ et 39 aux âges respectifs). La neurodégénérescence dans ce modèle était limitée au système nerveux périphérique et le corps calleux était normal.

L'équipe d'Adragna (2004) a également étudié ce modèle et publié des différences non significatives de masse corporelle entre les souris $HSyst-Kcc3^{KO}$ mâles et leurs témoins, soit +10,5 % à 4 semaines et -12,2 % à 16 mois ($n = 10$ et 6 aux âges respectifs). Dans cette dernière étude, il n'est pas possible de savoir dans quelle mesure les souris pesées à 4 semaines ont été conservées pour la pesée à 16 mois. Quoi qu'il en soit, les différences n'étaient pas significatives, probablement par manque de puissance statistique ou pour cause d'une grande variabilité interindividuelle (les ratios SEM/moyenne atteignaient jusqu'à 19,3 %).

En 2007, Rust a rapporté des diminutions significatives de 11,7 % et de 8,4 % aux âges respectifs de 4 et 8 semaines dans la lignée $BSyst-Kcc3^{KO}$ en comparaison avec des souris WT. Cette lignée avait initialement été présentée par Boettger (2003) pour sa neurodégénérescence centrale et périphérique sans anomalie du corps calleux, mais sa masse corporelle n'avait pas été mentionnée.

De son côté, Shekarabi (2012) a rapporté, à un âge de 2 mois, des diminutions de masse corporelle de 14,1 % et de 8,7 % dans des lignées $SSyst-Kcc3^{KO}$ et $sneuro-Kcc3^{KO}$, respectivement, toutes deux présentant une neurodégénérescence restreinte au système nerveux périphérique, mais accompagnée d'hypoplasie du corps calleux.

1.3.8.2.4. Espérance de vie

De manière intéressante, l'espérance de vie était réduite dans la lignée $SSyst-Kcc3^{KO}$ en comparaison avec les souris $sneuro-Kcc3^{KO}$. De fait, moins de 36 % des souris $SSyst-Kcc3^{KO}$ avaient survécu après 12 mois, alors que ce pourcentage était d'environ 50 pour les souris $sneuro-Kcc3^{KO}$, ce qui correspond à une réduction rapportée de l'espérance de vie de 2,6 mois ou de 29 %; (Shekarabi et collab., 2012)^{vi}. À titre de comparaison, des cohortes de souris établies dans les mêmes fonds génétiques montrent plus de 90 % de survie après 12 mois (Flurkey et collab., 2007; Anisimov et collab., 2015; Baumann et collab., 2018; Yanai et Endo, 2021).

Dans l'ensemble, les résultats disponibles laissent présager que l'inactivation systémique de $Kcc3$ cause une variété d'atteintes qui restent à identifier dans leur totalité. Cela expliquerait pourquoi le

^{vi} L'étude de Shekarabi parue en 2012 ne rapportait pas l'espérance de vie de souris témoins dans les mêmes conditions d'hébergement.

vieillessement apparaît moins bien toléré chez les souris *ssyst-Kcc3^{KO}* en comparaison avec les souris *sneuro-Kcc3^{KO}* ([Shekarabi et collab., 2012](#)) et avec la norme.

2. Régulation hydrominérale

Le contenu de l'organisme est majoritairement formé par des solutions aqueuses qui servent de milieu pour le déroulement des réactions chimiques et des diverses fonctions physiologiques. Des compartiments sont toutefois formés et délimités par des membranes de perméabilité variable à l'eau et aux différents solutés. Il est possible de catégoriser les fluides corporels en deux catégories : (1°) les fluides intracellulaires, correspondant au cytosol de chacune des cellules de l'organisme, et (2°) les fluides extracellulaires, regroupant les autres fluides endogènes, c'est-à-dire le liquide interstitiel entourant les cellules, le plasma sanguin, la lymphe, le liquide cébrospinal et d'autres fluides retrouvés dans des cavités corporelles (notamment les humeurs aqueuse et vitrée de l'œil ainsi que les fluides synovial, pleural, péricardique et péritonéal). Grâce à des processus de transport passif ou actif, les différents compartiments liquidiens maintiennent des compositions qui varient considérablement selon leur emplacement. Ces processus et ces compositions variées sont essentiels pour permettre aux différentes structures d'assurer leurs rôles respectifs, et ce, dans la limite d'intervalles compatibles avec leurs fonctions propres ([Cassimeris et collab., 2011](#)). Chaque compartiment doit également occuper un volume particulier afin de mener à bien ces fonctions. En particulier, le volume plasmatique fait l'objet d'une régulation multipartite directement liée aux paramètres hémodynamiques comme la PA ([Mecawi et collab., 2015](#)).

Une régulation neuroendocrinienne complexe permet d'ajuster autant l'apport que l'excrétion de l'eau et de solutés afin de stabiliser le volume et la composition optimale de chacun des compartiments liquidiens corporels. Cette section a pour but de présenter les acteurs majeurs dans la régulation neuroendocrinienne de l'équilibre hydrosodé, tout en mettant en relief le rôle confirmé ou potentiel de KCC3 ou de ses interacteurs à ce chapitre. De fait, plusieurs membres de la famille des CCC sont considérés comme des joueurs importants dans la régulation du volume cellulaire et extracellulaire. En particulier, KCC3 pourrait jouer un rôle dans la régulation hydrominérale en raison de son expression dans certaines cellules des systèmes excréteur, cardiovasculaire et nerveux ainsi que dans certaines glandes (revu dans [Gamba, 2005](#); [Gagnon et Delpire, 2013](#); [Garneau et collab., 2017](#); [Garneau et collab., 2019](#)).

2.1. Régulation du volume cellulaire

Tel que mentionné dans des sections précédentes, les membranes cellulaires sont caractérisées par des degrés de perméabilité variables à l'eau et à une variété de solutés. En particulier, des quantités appréciables d'eau et de petits solutés non polaires peuvent traverser ces membranes par diffusion simple (Alberts et collab., 2008). Il existe également une grande diversité de protéines de transport pouvant accélérer le transport membranaire de substances par diffusion facilitée ou par transport actif (Stein et Litman, 2015). Face à différents paramètres environnementaux comme un apport fluctuant en eau ou en ions ou molécules dissoutes, après une activité métabolique importante ou l'exposition à différents stress (thermique, par exemple), l'organisme fait face à différentes contraintes hypo- ou hyperosmotiques locales ou plus généralisées (Kültz et Csonka, 1999; Danziger et Zeidel, 2015; Delpire et Gagnon, 2018). Ces stress de tonicité engendrent notamment des réponses cellulaires opposées visant à stabiliser le volume intracellulaire (Hoffmann et collab., 2009; Danziger et Zeidel, 2015).

Lors de l'exposition à une contrainte hypotonique où le liquide interstitiel est plus dilué que le cytosol, une pression osmotique est dirigée vers l'intérieur de la cellule et cause instantanément une certaine expansion liquidienne du volume cellulaire. Le gonflement cellulaire active des protéines de transport permettant l'efflux de solutés, notamment les KCC, différents canaux à K^+ , à Cl^- et à osmolytes organiques non essentiels, ce qui s'accompagne d'une sortie d'eau et d'un rétablissement partiel du volume cellulaire (Hoffmann et collab., 2009). Ce processus est appelé diminution régulatrice du volume cellulaire (*regulatory volume decrease*).

À l'inverse, en réponse à une contrainte hypertonique, les cellules ont tendance à rétrécir spontanément, ce qui active les NKCC, des échangeurs Na^+/H^+ et des canaux cationiques peu sélectifs. L'influx de solutés qui en résulte est suivi d'une entrée d'eau par osmose, ce qui permet de restaurer presque parfaitement le volume initial (Hoffmann et collab., 2009). Ce processus porte le nom d'augmentation régulatrice du volume cellulaire (*regulatory volume increase*).

Il est intéressant de noter que les KCC et les NKCC jouent des rôles majeurs, mais opposés, dans la régulation du volume cellulaire (Gamba, 2005; Hoffmann et collab., 2009). Tel que mentionné dans la section 1, les KCC et les NKCC ont aussi des propriétés et des fonctions typiquement réciproques quant au pôle cellulaire qui les accueille, au sens de transport et à l'effet respectivement

inhibiteur ou activateur de la phosphorylation comme mode majeur de régulation allostérique (Gamba, 2005; Kahle et collab., 2010; Alessi et collab., 2014).

2.2. Excrétion d'eau et de sel par l'organisme

Les mammifères subissent une perte d'eau et de solutés obligatoire à tout moment. En premier lieu, l'excrétion de différents déchets métaboliques portés par le plasma sanguin s'effectue par le biais de l'urine (Stanhewicz et Kenney, 2015). Bien que le rein dispose d'une habilité exceptionnelle à concentrer ou à diluer l'urine (variable selon les espèces, voir plus bas), une certaine quantité d'eau minimale doit accompagner les déchets azotés et d'autres métabolites (Hall, 2016). Deuxièmement, les fèces contiennent des quantités variables d'eau que le colon ne réabsorbe jamais complètement. Troisièmement, les glandes sudoripares permettent une sécrétion composée d'eau et de sels dissipant la chaleur corporelle selon les besoins de thermorégulation (Mecawi et collab., 2015; Hall, 2016). Ce mécanisme présent chez l'humain n'est cependant pas utilisé de manière significative chez la souris et chez d'autres mammifères (Randall et collab., 2002; Hall, 2016; Škop et collab., 2020). Enfin, des pertes insensibles d'eau surviennent par évaporation à la surface de la peau, mais surtout via la vapeur d'eau contenue dans l'air expiré puisque celui-ci a été conditionné dans les poumons (Hall, 2016).

De nombreux mécanismes agissent sur le rein selon les contextes et permettent d'éliminer jusqu'à 25 litres d'eau par jour chez l'humain, si nécessaire, mais un volume minimal d'urine correspondant à la diurèse obligatoire est produit chaque jour, autour de 500 mL (Mecawi et collab., 2015; Stanhewicz et Kenney, 2015). De la même façon, le rein humain peut concentrer l'urine jusqu'à environ $1\,400 \text{ mosmol} \cdot \text{kg}^{-1}$, mais ne peut pas la diluer à une concentration inférieure à $40 \text{ mosmol} \cdot \text{kg}^{-1}$, ce qui implique également une perte obligatoire de solutés (Mecawi et collab., 2015; Stanhewicz et Kenney, 2015). Selon la demande physiologique, le volume urinaire peut varier jusqu'à un facteur 50, alors que la concentration de l'urine est légèrement moins adaptable et peut varier d'un facteur 35. Bien que les processus de réabsorption hydrosodée des tubules rénaux soient en effet hautement performants et soumis à une régulation fine (voir la section 2.4.3), ceux-ci s'appuient sur des systèmes de transport opérant selon une cinétique de type Michaelis-Menten, c'est-à-dire qu'ils sont saturables même s'ils peuvent afficher des capacités de transport très élevées (Alberts et collab., 2008; Stein et Litman, 2015; Hall, 2016). En outre, au terme d'une réabsorption extensive d'un substrat, l'extinction du gradient électrochimique freine

inévitablement le processus de réabsorption, et ce, même dans le cas de protéines de transport affichant de très hautes affinités. Par conséquent, aucun des systèmes de transport biologiques n'a la capacité de réabsorber la totalité des solutés se présentant dans la lumière des tubules rénaux (Hall, 2016). La réabsorption incomplète de l'eau permet d'ailleurs l'excrétion des toxines à des concentrations raisonnables pour le tractus urinaire (Pizzorno, 2015; Hall, 2016).

2.3. Apport en eau et en solutés

Du côté des intrants hydrosodés, il existe également une composante obligatoire, puisque la production d'eau métabolique accompagne l'anabolisme des nutriments (synthèse par condensation ou déshydratation) et la dégradation de polymères hydratés comme le glycogène (Voet et Voet, 2016). Ces intrants sont toutefois insuffisants pour combler les pertes obligatoires (Stanhewicz et Kenney, 2015).

C'est l'apport entéral en eau et en solutés qui sert à compenser les pertes obligatoires, les déficits causés par les activités de l'organisme ou la redirection de fluides et solutés vers l'extérieur du compartiment vasculaire (Stanhewicz et Kenney, 2015; Delpire et Gagnon, 2018). En outre, la soif est puissamment stimulée par une augmentation de l'osmolalité plasmatique (aussi faible que $6 \text{ mosmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ ou 2 %) telle que détectée par les osmorécepteurs centraux. La soif peut également être induite après une diminution importante du volume extracellulaire (de l'ordre de 10 %) qui est détectée par les barorécepteurs dits à basse pression situés dans les parois des oreillettes et des veines caves (voir la section 3.2.2; Kaplan et Victor, 2015; Stanhewicz et Kenney, 2015). Ces deux stimulus indicateurs d'un déficit hydrique entraînent en effet la libération de l'hormone antidiurétique (*antidiuretic hormone*, ADH, aussi désignée sous le nom d'arginine-vasopressine, AVP, ou simplement vasopressine) en circulation, ce qui d'une part conditionne la consommation d'eau et d'autre part favorise la rétention d'eau dans le rein (Danziger et Zeidel, 2015; Hall, 2016; Bichet, 2019) tel que décrit plus bas. Une diminution de la PA détectée dans le rein peut également mener à une stimulation de la soif via l'activation du SRAA (voir la section 2.4.3.2; Stanhewicz et Kenney, 2015). Ainsi, la régulation hydrosodée est étroitement liée à celle de la PA (Kaplan et Victor, 2015).

2.3.1. Appétit pour le sel

Il est à noter que les apports hydrosodés peuvent dépasser les besoins physiologiques, notamment en raison d'influences comportementales sur la consommation (Maughan et collab., 2015; Stanhewicz et Kenney, 2015). Une composante hédonique peut aussi être associée à la consommation de certains solutés comme le Na^+ dans certains contextes ou chez certaines espèces. Dans ce cas, les processus excréteurs sont activés par mesure de compensation (Stanhewicz et Kenney, 2015) et s'ensuit une natriurèse accrue (voir la section 2.4.3). Plus encore, des déficits physiologiques peuvent stimuler la consommation de Na^+ ou d'autres solutés.

Un test de préférence de consommation peut révéler un choix d'apport plus satisfaisant ou encore un besoin physiologique chez un individu (Stone et Pangborn, 1990; Mattes, 1997). Le cas des besoins à pourvoir est illustré par le cas d'individus affectés par des syndromes de fuite rénale en Na^+ ou une insuffisance surrénalienne et qui préfèrent les aliments salés aux aliments sucrés (O'Shaughnessy et Karet, 2004; Kochli et collab., 2005).

2.3.2. Surcharge sodée et expansion volémique

Tel que mentionné plus haut, un néphron normalement constitué — et sous l'influence de voies de régulation pleinement fonctionnelles — a la capacité de traiter des charges de sel très importantes (plus de cinq fois la quantité normale; Hall, 2016). Des défauts légers dans la capacité d'excrétion sodée peuvent être présents (mais à l'état silencieux) lorsque l'apport hydrosodé est modéré. Ces défauts prennent la forme de prédispositions génétiques qui affectent plusieurs processus cellulaires ou homéostatiques, les plus évidents se rattachant probablement aux protéines de transport ionique dans le rein, au tonus sympathique, à la sensibilité aux hormones de régulation hydrominérale, à l'inflammation et au stress oxydatif (Rodriguez-Iturbe et collab., 2007; Kaplan et Victor, 2015). Dans un contexte où la charge en Na^+ est accrue sur une longue période de temps, certains défauts peuvent voir leurs effets s'additionner et compromettre l'excrétion compensatrice du Na^+ . Dans ce cas, une HTA sensible au sel peut survenir (Sanada et collab., 2011).

La physiopathologie de l'HTA sensible au sel est hétérogène et peut faire intervenir des mécanismes dépendants aussi bien qu'indépendants du volume extracellulaire (Sanada et collab., 2011). Puisque le Na^+ est le principal osmolyte extracellulaire, il est aussi un important déterminant du volume extracellulaire : une rétention sodée entraîne une rétention de fluide conséquente. Il est

souvent admis qu'une légère expansion volémique joue un rôle instigateur dans l'HTA sensible au sel en augmentant le débit cardiaque et en forçant les vaisseaux sanguins périphériques à se contracter pour rajuster à la baisse le débit local par autorégulation pour pourvoir aux besoins réels (Kaplan et Victor, 2015; Hall, 2016). La hausse de RP associée contribue alors à l'HTA.

Un autre phénomène dépendant du volume extracellulaire est considéré comme important dans l'HTA sensible au sel : une charge sodée circulante accrue stimule la production de glycosides cardiaques par la glande corticosurrénale. Ces substances ont un effet analogue à la ouabaïne et inhibent la pompe Na^+/K^+ -ATPase, affectant ainsi la fonction des cardiomyocytes et des CMLv (Kaplan et Victor, 2015). La diminution de l'export de Na^+ par la Na^+/K^+ -ATPase a pour effet de stimuler l'action de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ et d'augmenter la concentration intracellulaire de Ca^{2+} , ce qui favorise simultanément la contractilité cardiaque et la vasoconstriction périphérique (Kaplan et Victor, 2015; Stein et Litman, 2015). Différentes évidences appuient ce modèle chez les individus avec HTA sensible au sel, notamment les augmentations notées dans les concentrations circulantes de ces glycosides (Schoner et Scheiner-Bobis, 2007) et l'effet hypotenseur des inhibiteurs de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Iwamoto et collab., 2007).

Aux explications précédentes s'ajoutent également des mécanismes indépendants du volume. Il semble qu'une charge sodée accrue dans les fluides extracellulaires exerce une variété d'effets hypertenseurs dont les mieux décrits sont : (1°) un accroissement du tonus sympathique (de Wardener et collab., 2004), (2°) la libération de cytokines engendrant un état chronique d'inflammation rénale (Rodriguez-Iturbe et collab., 2007), (3°) l'induction d'un remodelage vasculaire pathologique (Zacchigna et collab., 2006) et (4°) une augmentation de l'expression des récepteurs AT_1 de l'Ang II dans le rein (voir la section 2.4.3.2; Gu et collab., 1998).

Puisque KCC3 est un transporteur de sel, il est possible qu'il soit impliqué dans les réponses hémodynamique ou hydrominérale lors de la consommation d'une diète riche en sel. Il n'est toutefois pas possible à ce point-ci de savoir quelle est son implication précise ni quels seraient les effets de son inactivation dans ce contexte. D'un côté, puisque l'activité de KCC3 semble favoriser une hyperpolarisation cellulaire (voir la section 1.3.6.5), il se pourrait que l'inactivation du transporteur ajoute à l'augmentation de la PA en conditions de surcharge sodée par une dépolarisation accrue des cardiomyocytes et des CMLv. D'un autre côté, si l'absence de KCC3

dans le rein compromet effectivement la réabsorption rénale de certains solutés, il se pourrait aussi que l'inactivation du transporteur soit bénéfique pour éviter les effets hypertenseurs d'une surcharge sodée.

2.4. Réabsorption et excrétion de l'eau et des solutés

Tel que mentionné plus haut, le rein peut adapter ses activités de réabsorption et d'excrétion d'eau et de solutés de manière très flexible selon l'état hydrominéral qui prévaut. Les principaux mécanismes régulateurs impliqués sont hormonaux et impliquent la vasopressine ainsi que le SRAA. Avant de décrire ces mécanismes, il convient de rappeler sommairement le mode d'opération du rein dans ses fonctions de filtration, de réabsorption et d'excrétion.

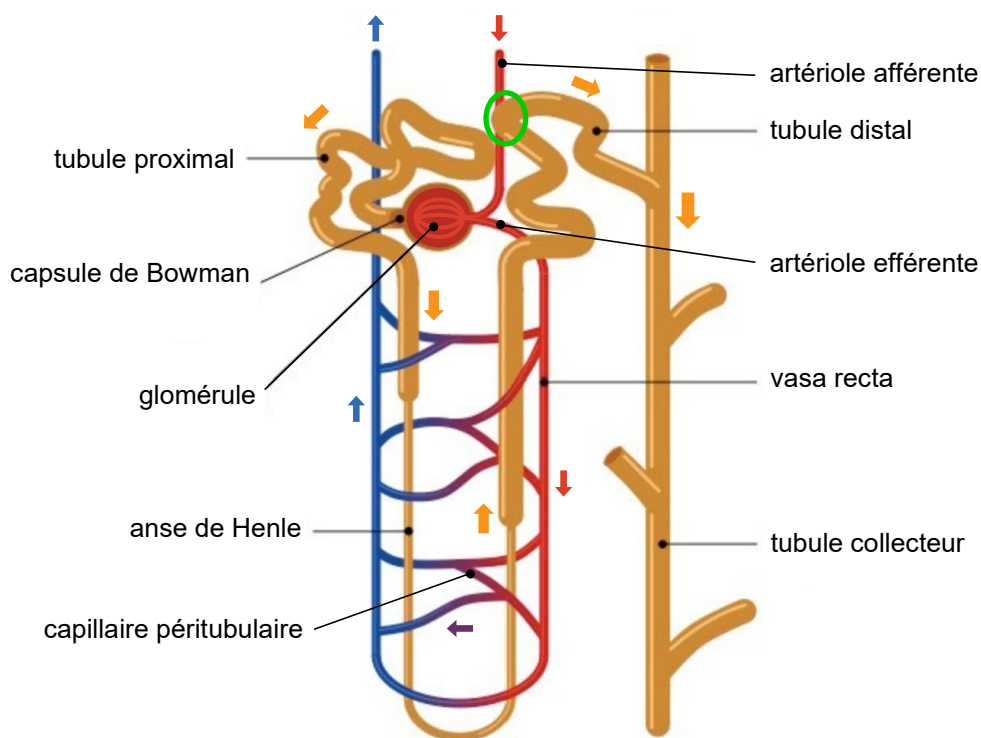
2.4.1. Anatomophysiologie du néphron

L'unité fonctionnelle de base du rein, appelée néphron, est en fait une structure complexe combinant une fonction de filtration massive et peu sélective du sang à une fonction de réabsorption hautement sélective des éléments filtrés ainsi qu'à une fonction d'excrétion de déchets. Chez l'homme, chacun des reins renferme plusieurs centaines de milliers de néphrons (Kaplan et Victor, 2015), alors que chez la souris, chacun en renferme environ 20 000 (Murawski et collab., 2010). L'anatomie typique de cette structure est présentée à la Figure 6.

D'un point de vue anatomique, chaque néphron chez les mammifères est composé d'une structure de filtration appelée glomérule connectée à une structure tubulaire. Le glomérule comprend un réseau capillaire entouré par un espace sphéroïde (la capsule de Bowman) qui reçoit le filtrat primaire et qui se raccorde à une série de tubules aux propriétés variables faisant contact avec le milieu extérieur par l'intermédiaire des voies urinaires (Hall, 2016).

Le glomérule reçoit le sang systémique via une artériole afférente et le retourne à la circulation systémique par une artériole efférente. Ces deux artérioles sont séparées par le bouquet glomérulaire qui est constitué de capillaires dont la paroi est semiperméable. Un gradient de pression hydrostatique sanguine est créé par le diamètre supérieur de l'artériole afférente par rapport à celui de l'artère efférente, ce qui favorise une ultrafiltration, c'est-à-dire une sortie nette d'eau et de petits solutés à travers les parois du bouquet glomérulaire et vers la capsule de Bowman (Hall, 2016).

Figure 6 Anatomie du néphron



Note. Structures anatomiques d'un néphron typique et vaisseaux sanguins associés. Les flèches colorées indiquent le sens de circulation du sang, du filtrat ou de l'urine. L'emplacement de l'appareil juxtaglomérulaire est encerclé en vert. Adapté de *Nephrons*, par B. Cornell, 2016, BioNinja (<http://ib.bioninja.com.au>). Contenu destiné à des fins éducatives. Adapté avec permission (ajout de symboles et de texte).

Les structures tubulaires prennent ensuite naissance dans la capsule de Bowman. Leur paroi est formée d'une variété d'épithélioctes spécialisés responsables d'échanges de solutés à leur pôle apical entre le filtrat et le milieu intracellulaire. Le milieu intracellulaire peut à son tour échanger des solutés avec le milieu extracellulaire moyennant le passage de la membrane basolatérale de ces mêmes épithélioctes. L'artériole efférente donne naissance à un autre réseau de capillaires sanguins, celui-ci qualifié de péri-tubulaire puisqu'il entoure les tubules rénaux. À cet endroit, le sang capillaire peut lui aussi faire des échanges de solutés afin de réabsorber vers le milieu interne des solutés tirés du filtrat ou encore d'excréter des substances vers l'urine en formation. L'extrémité veineuse du lit capillaire péri-tubulaire se déverse ultimement dans l'une des veines rénales, lesquelles retourneront le sang vers le cœur droit (Hall, 2016).

Chacun des segments successifs des tubules rénaux est associé à une fonction principale. Le tubule proximal est un site de réabsorption massive d'eau et de solutés. L'anse de Henle est spécialisée dans la concentration de l'urine grâce à un système impliquant la disposition unique de canaux transportant l'eau à la membrane cytoplasmique de certaines portions de la structure, un arrangement en « U » se prolongeant dans une zone hyperosmotique du rein et une circulation à contrecourant de l'urine en formation par rapport au sang des vaisseaux péri-tubulaires. Le tubule distal contribue fortement à l'équilibre acidobasique de l'organisme et assure une régulation fine de la réabsorption ou de l'excrétion de plusieurs solutés. Enfin, le tubule collecteur reçoit l'urine en formation depuis les tubules distaux de plusieurs néphrons et est responsable de la réabsorption ou de l'excrétion de l'eau et de certains ions sous un important contrôle endocrinien. Plusieurs tubules collecteurs fusionnent progressivement vers des tubules plus larges convergeant d'abord vers l'un des uretères pour drainer chaque rein, puis vers la vessie (Hall, 2016).

Le rôle de certains CCC comme NKCC2, le cotransporteur $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ (NCC) et KCC4 dans la réabsorption des ions Na^+ , K^+ et Cl^- le long du néphron est bien connu. Les NKCC et NCC réalisent un import apical, et les KCC, un export basolatéral (Bazúa-Valenti et collab., 2016). Tel que mentionné à la section 1.3.6, KCC3 est soupçonné de contribuer à la réabsorption primaire de K^+ et de Cl^- dans le tubule proximal, de même qu'au mouvement secondaire d'autres solutés favorisés par un export $\text{K}^+\text{-Cl}^-$.

Il est important de rappeler que l'export d'un soluté au pôle basolatéral d'un épithéliocyte tubulaire a pour effet de diluer le cytosol en solutés, ce qui engendre instantanément une augmentation de pression osmotique dirigée vers le liquide interstitiel et entraîne naturellement une sortie d'eau par diffusion simple ou facilitée. Cette sortie d'eau a pour effet de concentrer tous les solutés du cytosol, c'est-à-dire qu'elle accentue leurs gradients électrochimiques et favorise ensuite leur export si les voies de perméation présentes le permettent. De plus, immédiatement après l'export basolatéral d'un soluté, un subtil déséquilibre se forme dans le gradient électrochimique de celui-ci en faveur d'un import subséquent, ce qui peut avoir lieu au pôle apical, toujours si les voies de perméation le permettent. Ces principes s'appliquent également à la pression osmotique et expliquent comment le transport transépithélial agit comme mécanisme primordial dans le processus de réabsorption (Stein et Litman, 2015; Bazúa-Valenti et collab., 2016; Hall, 2016).

2.4.2. Rôle de KCC3 dans le rein

Dans le rein, l'implication de KCC3 semble restreinte au tubule proximal, où l'isoforme KCC3b (voir la Figure 3 pour une description des différentes isoformes) est exprimée à la membrane basolatérale dans chacun des sous-segments (Boettger et collab., 2003). Concrètement, l'action de KCC3 permet d'exporter dans le liquide interstitiel les ions K^+ et Cl^- . Ces ions ont d'abord été importés au pôle apical (voir la Figure 5 pour un exemple) grâce au concours de systèmes de transport comme des échangeurs anioniques, le cotransporteur Na^+ -glucose de type 2 (*sodium-glucose transporter-2*, SGLT-2) et différents canaux ioniques puisqu'ils sont abondants dans le filtrat primaire (Hall, 2016; Garneau et collab., 2019). KCC3 ne transporte pas directement le Na^+ , mais par son implication dans la réabsorption de K^+ et de Cl^- au pôle basolatéral dans le tubule proximal, il favorise l'import de pratiquement tous les solutés, incluant le Na^+ , par l'effet osmotique décrit ci-dessus. De plus, il a été suggéré que, via sa fonction d'export basolatéral de K^+ , KCC3 pourrait permettre d'alimenter la pompe Na^+/K^+ -ATPase coexprimée au pôle basolatéral, c'est-à-dire d'importer le K^+ en échange d'un export de Na^+ . En permettant ainsi le recyclage du K^+ , KCC3 stimulerait la réabsorption de Na^+ vers le liquide interstitiel (Garneau et collab., 2019). Il a également été proposé que le rôle auxiliaire de KCC3 dans les cellules du tubule proximal puisse être de prévenir le gonflement cellulaire qui risque d'accompagner l'import apical quantitativement important d'osmolytes incluant le glucose (Melo et collab., 2013). Cette proposition est supportée par l'observation ex vivo d'un défaut de diminution régulatrice du volume cellulaire en conditions hypotoniques dans les tubules proximaux isolés de la souris (Boettger et collab., 2003).

Dans un autre ordre d'idées, si l'activité de coimport basolatéral $NH_4^+-Cl^-$ par KCC3 identifiée dans des modèles cellulaires (voir la section 1.3.4) s'effectue réellement in vivo, KCC3 pourrait réaliser l'une des étapes permettant la sécrétion rénale d'ammonium par le tubule proximal pour le contrôle acidobasique de l'organisme. Le transport transépithélial de l'ammonium (ou des ions H^+ associés) pourrait être complété grâce à une protéine de transport apicale en mode export comme un échangeur Na^+/H^+ (Saier, 2000; Bergeron et collab., 2003; Stein et Litman, 2015). La contribution de KCC3 à la régulation acidobasique par le rein pourrait tout de même être modeste puisque cette régulation implique de nombreux processus tout au long des tubules rénaux (Hall, 2016), alors que KCC3 n'a été détecté que dans le tubule proximal (Boettger et collab., 2003).

Tout compte fait, d'après l'abondance des voies de perméation pour le K^+ et le Cl^- dans le néphron proximal, il est peu probable qu'en conditions normales l'export basolatéral réalisé par KCC3 représente une étape limitante dans la réabsorption primaire des ions K^+ et Cl^- ou dans la réabsorption secondaire d'autres substrats. Par contre, il est possible que dans certaines conditions où la régulation hydrominérale est plus critique, comme durant ou après un effort physique ou en réponse à une charge hydrique ou sodée extrêmement basse ou élevée (McArdle et collab., 2015; Hall, 2016), KCC3 se révèle particulièrement important pour la réabsorption d'eau, de solutés ou même pour la régulation acidobasique.

2.4.3. Modulation de la filtration, de la réabsorption et de la sécrétion rénales

Tel que mentionné plus haut, le rein dispose d'une capacité remarquable à sélectivement retenir ou éliminer l'eau et plusieurs solutés. Cette capacité repose en partie sur des mécanismes internes permettant une autorégulation de la quantité d'urine produite de manière à optimiser le volume des différents fluides corporels. Des processus additionnels sous contrôle neurohormonal augmentent l'adaptabilité du rein et, par le biais d'ajustements dans le volume des compartiments liquidiens incluant le plasma sanguin, rendent très robuste la régulation à moyen ou long terme de la PA (Hall, 2016). Les mécanismes de régulation les plus significatifs sont ceux assurés par le SRAA, la vasopressine et les facteurs natriurétiques. Ces mécanismes sont décrits sommairement ci-dessous.

2.4.3.1. Mécanismes rénaux intrinsèques

Puisque le rein filtre en continu le sang artériel, de faibles différences dans le flot sanguin rénal ont le potentiel de produire quotidiennement des quantités d'urine bien supérieures au volume sanguin. Par contre, la filtration glomérulaire et l'excrétion hydrosodée demeurent relativement stables, même lors de fluctuations instantanées de PA associées aux changements d'activités normales d'un individu. Cette stabilité est rendue possible en partie grâce à plusieurs mécanismes intrinsèques — qui ont pu être mis en évidence dans des reins isolés —, lesquels interagissent avec des mécanismes extrinsèques de régulation de la fonction rénale (voir plus loin) dans l'exécution de fonctions intégrées comme le contrôle de la PA et de la composition des fluides corporels (Hall, 2016).

2.4.3.1.1. Natriurèse de pression

Toutes autres variables étant constantes, une augmentation du volume de plasma sanguin s'accompagne d'une élévation de PA transitoire qui est équilibrée en quelques heures par une production accrue d'urine sans intervention directe d'organes extrarénaux. En outre, la réabsorption tubulaire est dépendante des paramètres de la circulation dans les capillaires péri-tubulaires et de contraintes hydrostatiques. Une élévation de PA systémique s'accompagne ainsi d'une élévation de pression hydrostatique dans ces capillaires, élévation qui s'oppose à la captation de liquide vers l'espace intravasculaire. Il en résulte une réabsorption limitée d'eau, une augmentation du volume urinaire et un rétablissement à la baisse la PA (Randall et collab., 2002; Hall, 2016). Puisque l'eau est accompagnée par le sel (en particulier le Na^+), y compris dans ses mouvements transépithéliaux (tel que décrit à la section 2.4.1), la diurèse croissante associée à des valeurs croissantes de PA s'accompagne d'une natriurèse conséquente (Hall, 2016).

2.4.3.1.2. Rétroinhibition tubuloglomérulaire

La vitesse de production de l'ultrafiltrat primaire par le glomérule est un autre paramètre finement régulé. La différence de pression de part et d'autre du bouquet glomérulaire détermine le taux de filtration glomérulaire. Les caractéristiques du filtrat sont ensuite détectées dans une structure spécialisée du néphron jouxtant le tubule distal et l'artériole afférente qui se nomme appareil juxtaglomérulaire. Un fort débit d'écoulement de filtrat a pour effet de diminuer par vasomodulation sélective la différence de pression entre les artérioles efférente et afférente du néphron, ce qui diminue le taux de filtration et rétablit le débit d'écoulement par rétroinhibition. De façon plus explicite, de faibles concentrations de Na^+ et de Cl^- dans le filtrat causent la dilatation de l'artériole afférente et la libération de rénine, laquelle mène à la formation d'Ang II et à la contraction de l'artériole efférente (voir la section 2.4.3.2; Randall et collab., 2002; Hall, 2016), ce qui augmente le taux de filtration. L'accélération de la livraison du filtrat vers les segments distaux limite la possibilité de réabsorption hydrosodée et rétablit à la hausse les concentrations de Na^+ et de Cl^- dans l'urine en formation, ce qui clôt la boucle de rétroinhibition et s'accompagne d'une natriurèse accrue. Le transporteur NKCC2 joue d'ailleurs un rôle de premier plan dans la détection de la tonicité du filtrat par les cellules à rénine de l'appareil juxtaglomérulaire (Schlatter et collab., 1989; Lapointe et collab., 1990).

2.4.3.1.3. Équilibre glomérulotubulaire

La fonction tubulaire rénale fait elle aussi l'objet d'un contrôle intrinsèque. Le néphron a en fait la capacité de répondre à un changement du taux de filtration glomérulaire par un changement équivalent dans l'activité de réabsorption tubulaire, de manière à stabiliser la charge sodée se présentant aux tubules distaux et, conséquemment, la quantité d'eau et de sels excrétés (Wesson et collab., 1948; Thomson et Blantz, 2008; Hall, 2016). Cette réponse est rendue possible principalement grâce à un ajustement de la quantité et de l'activité de protéines de transport à la membrane cytoplasmique des tubules rénaux (Hall, 2016; Wang et collab., 2017). Puisque KCC3 est exprimé dans le tubule proximal (Boettger et collab., 2003) — siège d'environ les deux tiers de la réabsorption sodée rénale (Hall, 2016) —, il est raisonnable de penser que ce transporteur puisse être impliqué dans le phénomène d'équilibre glomérulotubulaire. D'autres mécanismes liés à la pression hydrostatique et l'environnement extracellulaire des tubules rénaux sont aussi soupçonnés de contribuer au phénomène (Häberle et von Baeyer, 1983).

2.4.3.2. Système rénine-angiotensine-aldostérone

La régulation hydrosodée sous la gouverne du SRAA rénal est initiée via la détection par l'appareil juxtaglomérulaire d'un changement de perfusion dans l'artériole afférente. Par exemple, une diminution de perfusion est indicative d'une diminution de la volémie. En cas de baisse de perfusion, les cellules granulaires au centre de l'appareil juxtaglomérulaire libèrent la rénine, qui s'avère être une enzyme catalysant le clivage d'un précurseur hormonal peptidique d'origine hépatique qui porte le nom d'angiotensinogène. Le produit de la réaction de la rénine est l'Ang I, un décapeptide n'étant pas pourvu d'une fonction biologique connue, si ce n'est que celle de substrat pour l'enzyme de conversion de l'angiotensine dans une réaction qui survient lors du contact avec des cellules endothéliales et qui produit l'Ang II, un octapeptide (Hall, 2016).

Plusieurs organes ont la machinerie cellulaire nécessaires à la production locale d'Ang II localement dans leurs endothéliums. C'est de cette manière que la libération de rénine par l'appareil juxtaglomérulaire permet de jouer un rôle prompt et contrôlé dans la rétroinhibition tubuloglomérulaire. Toutefois, une large proportion de la rénine produite par l'appareil juxtaglomérulaire se retrouve en circulation où elle mène à la production d'Ang II suivant le contact de l'Ang I avec l'endothélium pulmonaire. De fait, le rein est la principale source de rénine (Kaplan et Victor, 2015; Hall, 2016; Herring et Paterson, 2018). L'Ang II produite localement ou

systemiquement est l'effecteur principal du SRAA et il induit plusieurs réponses cardiovasculaires et rénales via l'activation des récepteurs AT_1 . La réponse à l'Ang II a une composante cardiovasculaire comprenant une vasoconstriction des artérioles systémiques incluant celles du rein. Cette réponse entraîne une augmentation de la réabsorption hydrosodée rénale, à laquelle s'ajoute un effet de stimulation directe des récepteurs AT_1 sur des systèmes de transport rénaux réabsorbant le Na^+ et d'autres solutés. Enfin, l'Ang II stimule la libération d'aldostérone par la glande corticosurrénale, ce qui stimule d'une part la réabsorption de Na^+ et d'eau, et d'autre part l'excrétion de K^+ par le tubule collecteur en particulier. Une haute concentration extracellulaire de K^+ peut également stimuler la libération d'aldostérone. La réponse coordonnée du SRAA permet globalement de rétablir à la hausse la PA et la perfusion rénale selon une boucle de rétroinhibition typique (Hall, 2016).

2.4.3.3. Vasopressine

Parmi les autres mécanismes principaux impliqués dans l'homéostasie hydrominérale via l'activation de la réabsorption rénale de fluides, il existe celui qui est régi par la vasopressine et dont le centre régulateur se situe dans l'hypothalamus. Les osmorécepteurs de la neurohypophyse sont sensibles à l'élévation de l'osmolalité plasmatique (généralement directement liée à une hypernatrémie), et les osmorécepteurs des noyaux paraventriculaires hypothalamiques, à une diminution du volume circulant efficace. Ces stimulus entraînent libération de vasopressine dans la circulation. La liaison de la vasopressine aux récepteurs V_2 du tubule collecteur entraîne la relocalisation des aquaporines d'un stock vésiculaire vers la membrane apicale, ce qui augmente la réabsorption d'eau, freine la diurèse, rétablit l'osmolalité plasmatique et contribue à rétablir à la hausse le volume extracellulaire par rétroinhibition. La liaison de la vasopressine aux récepteurs V_1 des vaisseaux splanchniques entraîne également une vasoconstriction locale qui a pour effet de rediriger le sang vers la circulation centrale et de rajuster le débit sanguin (Hall, 2016; Herring et Paterson, 2018).

2.4.3.4. Peptides natriurétiques

Du côté des hormones ayant, elles, pour effet de diminuer le volume extracellulaire, les plus notables sont les peptides natriurétiques. Le membre le mieux décrit de ce groupe est le facteur natriurétique auriculaire, produit par les cardiomyocytes des oreillettes. Le cerveau et les endothéliocytes sont aussi connus pour en produire d'autres sous-types. Une volémie élevée est

détectée par son effet tenseur sur les oreillettes, effet agissant comme stimulus pour la libération du facteur natriurétique auriculaire par la paroi de ces structures. La réponse effectrice du facteur natriurétique auriculaire comprend une relaxation de l'artériole afférente du néphron, une inhibition de la libération de vasopressine et de rénine, ainsi qu'une baisse de la réabsorption de Na^+ par le tubule collecteur. Ensemble, ces effets causent une augmentation du taux de filtration glomérulaire et une diminution de réabsorption sodée, ce qui augmente la natriurèse et permet de rétablir à la baisse le volume extracellulaire, incluant le volume sanguin (Kaplan et Victor, 2015; Hall, 2016; Herring et Paterson, 2018).

3. Régulation de la pression artérielle

Afin de soutenir l'organisme dans ses fonctions normales et lui permettre de répondre à différents stress, le système circulatoire dispose de plusieurs mécanismes visant à adapter le flot sanguin de chaque organe pour satisfaire à des besoins spécifiques et instantanés. Étant donné que le réseau vasculaire est un système fermé composé d'une pompe pulsatile et de vaisseaux dotés d'une élasticité modulable et variable selon leur localisation, une pression hydrostatique hétérogène et dynamique est présente à différents points de l'arbre vasculaire et les différents organes peuvent recevoir un débit sanguin adapté à leurs circonstances de manière relativement indépendante par rapport à d'autres territoires vasculaires (Kaplan et Victor, 2015; Herring et Paterson, 2018).

La pression présente dans les artères — en particulier à la sortie du cœur — est un indicateur important de l'état d'activation du système cardiovasculaire et de l'état de sollicitation de ce même système pour fournir un apport accru en oxygène et nutriments aux cellules périphériques qu'il dessert (Herring et Paterson, 2018). La PA est proportionnelle au débit cardiaque (DC) et à la résistance périphérique (RP) imposée par l'ensemble des vaisseaux (voir l'*Annexe I*).

Le DC est le volume total de sang quittant le cœur chaque minute. Dans le contexte d'un système fermé, il s'agit également du volume de sang arrivant au cœur durant cette même période, et donc du volume ayant circulé dans le réseau vasculaire. Une exception peut s'appliquer à cette équivalence lors de changements rapides du retour veineux ou de la contractilité cardiaque, mais l'équilibre se rétablit en quelques secondes (Young, 2010). À son tour, le DC est proportionnel à la fréquence cardiaque (FC) et au volume de sang éjecté par le cœur à chaque battement (volume d'éjection systolique, VES; voir l'*Annexe I*).

La RP, elle, correspond au degré d'opposition que les petits vaisseaux, en particulier les artérioles, imposent à la circulation du sang de par leur faible diamètre. Effectivement, l'écoulement d'un liquide visqueux dans un tube élastique étroit engendre des degrés variables de friction pouvant être modélisés d'après d'autres équations (Poiseuille, 1844; Herring et Paterson, 2018).

Dans cette section, l'étendue normale des valeurs de PA seront présentées, de même que les mécanismes principaux permettant de la moduler. À la fin de cette section seront présentées les

différentes techniques utilisées dans l'étude de la PA, notamment chez le rongeur, en mettant l'accent sur les forces et les limites de chacune d'entre elles.

3.1. Zones cibles et désordres de la pression artérielle

Afin de fournir l'oxygène et les nutriments en quantité adéquate, mais sans endommager les structures de l'organisme, la PA de repos se situe habituellement dans un intervalle de valeurs considérées normales. Chez l'humain, la pression à la sortie du cœur fluctue typiquement entre environ 120 et 80 mmHg (120/80 mmHg) en suivant le déroulement du cycle de contraction cardiaque (Hall, 2016; Herring et Paterson, 2018). La pression maximale est atteinte immédiatement après la contraction des ventricules ou systole (PA systolique), tandis que la pression minimale est celle qui s'observe lorsque les ventricules sont relâchés durant la phase de diastole (PA diastolique). Les valeurs chez la souris sont essentiellement les mêmes (Wilde et collab., 2017). Il est à noter que la position du corps ainsi que l'activité physique ont des effets instantanés sur les valeurs de PA. Typiquement, les paramètres hémodynamiques peuvent mettre plusieurs dizaines de minutes à se rétablir après une perturbation (Leonard et collab., 2006; Sheward et collab., 2010; Hall, 2016; Wilde et collab., 2017). Toutes les autres variables restant stables, la pressurisation du sang dans le réseau artériel diminue en fonction de l'éloignement par rapport au cœur à cause de la RP croissante imposée jusqu'au site des capillaires sanguins. À cet endroit, la pression atteint moins de 10 mmHg, même dans la circulation systémique (Hall, 2016; Herring et Paterson, 2018). La pressurisation du sang demeure basse dans le réseau veineux jusqu'au moment où un ventricule cardiaque appliquera à nouveau une force pour propulser le sang (Hall, 2016).

3.1.1. Hypertension artérielle

L'HTA est une pathologie relativement fréquente caractérisée par des valeurs de PA de repos supérieures à la norme (par exemple 140/90 mmHg; Rabi et collab., 2020). En effet, des données récentes (jusqu'à 2017) indiquent que plus d'un Canadien adulte sur cinq est affecté par cette condition (Leung et collab., 2009). L'HTA est souvent due à une rigidification, une contraction excessive ou encore un déficit dans la fonction de dilatation des artéioles, ce qui les amène à opposer davantage de résistance au passage du sang (Kaplan et Victor, 2015; Herring et Paterson, 2018). L'HTA peut aussi être due à des anomalies neurologiques, hormonales ou rénales comme un défaut d'excrétion du Na^+ ou des dérèglements hormonaux qui augmentent

disproportionnellement le DC (Lifton et collab., 2001). Les médicaments ou traitements contre l'HTA agissent ultimement sur le cœur, les vaisseaux ou les reins de manière à diminuer la contractilité cardiaque, dilater les artérioles ou diminuer la réabsorption d'eau et de minéraux par le rein (Kaplan et Victor, 2015). Le rétablissement d'une PA plus basse s'obtient donc par la réduction du DC ou de la RP, ou les deux.

Une élévation chronique de la PA impose un stress physique aux organes. Effectivement, les microvaisseaux nourriciers ont une structure délicate et intolérante à la pression, et ils risquent de s'endommager sous le passage prolongé de sang hautement pressurisé (Lifton et collab., 2001). De plus, la circulation de sang hautement pressurisé et les effets hémodynamiques qui s'en suivent peuvent perturber des dépôts acellulaires préalablement présents contre la paroi interne de certains vaisseaux. Alors que ces dépôts (par exemple des plaques lipidiques athéromateuses) peuvent persister sans conséquence à la paroi vasculaire, leur épaissement, leur perturbation et particulièrement leur détachement peut bloquer un vaisseau tributaire et bloquer l'apport sanguin du territoire en aval (embolie vasculaire et ischémie). En fait, l'HTA constitue un facteur de risque important d'infarctus, d'insuffisance cardiaque, d'accident vasculaire cérébral et d'insuffisance rénale (Kaplan et Victor, 2015; Hall, 2016; Herring et Paterson, 2018).

Typiquement, plusieurs facteurs sont à l'origine du développement de l'HTA chez un individu. En particulier, puisque l'organisme dispose d'une variété de mécanismes de régulation de la PA, un phénotype hypertensif survient lorsqu'une modification initiale de la PA échappe à différents mécanismes contrerégulateurs. Par exemple, une augmentation de DC est contrebalancée par une diminution de RP et vice versa afin de maintenir la PA dans l'intervalle de valeurs cibles. Une augmentation soutenue de PA survient donc lorsque les mécanismes normotenseurs impliquant le contrôle du DC et ceux impliquant le contrôle de la RP sont simultanément compromis ou insuffisants devant l'ampleur du désordre hémodynamique (Kaplan et Victor, 2015; Hall, 2016; Herring et Paterson, 2018). Ce principe a particulièrement été mis de l'avant par le physiologiste Arthur C. Guyton (1990) en mettant en valeur la capacité considérable (« infinie ») du rein à rétablir la PA sur le long terme.

Une ou plusieurs prédispositions génétiques, de même que l'exposition à des facteurs environnementaux peuvent interagir et occasionner des dérèglements de PA qui échappent à la

régulation par les mécanismes normotenseurs ([Herring et Paterson, 2018](#)). Un exemple typique de cette situation, appelée l'HTA sensible au sel (voir la section 2.3.2), survient chez des individus atteints de défauts héréditaires dans le transport membranaire du Na^+ s'ils adoptent une alimentation riche en sel, ce qui cause notamment une augmentation de DC qui ne peut être complètement contrebalancée par une réduction conséquente de RP ou de volume extracellulaire et cause donc une élévation de la PA ([Lifton et collab., 2001](#)).

Il existe aussi quelques formes d'HTA dites monogéniques, puisqu'elles sont reliées à une mutation dans un seul gène. En suivant le principe selon lequel un désordre hypertensif se développe à condition qu'une augmentation de DC ne puisse être compensée par une réduction de RP (ou réciproquement), il est permis de suspecter que chacun des gènes associés à des formes monogéniques d'HTA soit impliqué à la fois dans le contrôle du DC et dans celui de la RP au sens large. Il est à noter que plusieurs des gènes responsables de formes monogéniques d'HTA codent pour des protéines impliquées dans le transport des sels par le rein. En particulier, différentes protéines de transport exprimées dans les tubules rénaux (notamment des CCC) ainsi que des régulateurs de leur activité sont connus pour influencer directement la PA ([Lifton et collab., 2001](#)). Par exemple, une hausse d'expression de NKCC1 d'origine épigénétique a été identifiée chez les rats spontanément hypertendus ([Lee et collab., 2010](#)). De plus, des mutations gain de fonction dans les modulateurs positifs de NCC (par exemple des WNK kinases) augmentent la réabsorption hydrosodée rénale dans le désordre hypertensif appelé syndrome de Gordon (aussi appelé pseudohypoaldostéronisme de type II ou hypertension familiale hyperkaliémique; [Wilson et collab., 2001](#); [Wilson et collab., 2003](#); [Vidal-Petiot et collab., 2013](#); [Ferdous et collab., 2017](#)). Inversement, des mutations perte de fonction dans NKCC2 font diminuer la réabsorption hydrosodée dans l'anse ascendante de Henle causent le désordre hypotensif appelé syndrome de Bartter de type 1 ([Bartter et collab., 1962](#); [Simon et collab., 1996](#)). De manière intéressante, des mutations perte de fonction dans NCC, elles, causent le syndrome de Gitelman, lequel est aussi associé à des défauts de réabsorption hydrosodée menant à des PA normales ou basses ([Shaer, 2001](#); [Reissinger et collab., 2002](#); [Lin et collab., 2004](#)).

3.1.2. Hypotension artérielle

Alors que l'HTA est une condition médicale connue du grand public en raison de ses effets sérieux à long terme, l'hypotension artérielle l'est moins, mais elle peut aussi s'associer à des effets sur la

santé. L'hypotension artérielle chronique est définie par une PA inférieure à 90/60 mmHg (Sharma et collab., 2021) et elle peut être associée à des pertes liquidiennes excessives, à une insuffisance cardiaque, à une dysfonction du système nerveux autonome ou à la prise de certains médicaments, par exemple. Ses symptômes sont souvent peu spécifiques, incluant des étourdissements, des malaises musculosquelettiques et de la fatigue (Rosengren et collab., 1993; Pilgrim, 1994; Duschek et collab., 2017). Dans des cas plus graves, l'hypotension artérielle peut entraîner un état de choc et compromettre l'approvisionnement en oxygène et en nutriments pour certains organes. Elle peut alors causer une perte de conscience ou encore des dommages ischémiques avec possibilité de nécrose tissulaire (Hall, 2016; Herring et Paterson, 2018; Sharma et collab., 2021).

3.2. Mécanismes de modification de la pression artérielle

Les mécanismes de régulation de la PA agissent à différentes échelles temporelles et ont des capacités d'influence variables, que ce soit localement ou systémiquement. Certains mécanismes ont par exemple pour rôle de prévenir une chute de la PA en cas d'hémorragie, alors que d'autres adaptent l'organisme à la consommation de sel (Hall, 2016).

3.2.1. Mécanismes vasculaires intrinsèques

Une régulation locale du flot sanguin est assurée des phénomènes orchestrés directement par la paroi vasculaire de manière à réagir aux besoins des tissus environnants. Certains de ces phénomènes vasculaires sont très dynamiques, alors que d'autres agissent sur le long terme.

3.2.1.1. Tonus vasomoteur

Un premier mécanisme vasculaire, qui en est un de nature universelle, implique le tonus vasomoteur, c'est-à-dire la faculté qu'ont les métartéριοles et les sphincters précapillaires d'alterner de manière dynamique entre des stades de vasoconstriction et de vasorelaxation. Ces structures permettent respectivement de court-circuiter ou de régir le débit de circulation dans un lit capillaire donné, en fonction de l'opposition qu'ils offrent à la circulation par leur état de contraction (Herring et Paterson, 2018). Même lorsque le corps est au repos, les CMLv de ces structures affichent une contraction rythmée plus ou moins régulière de manière à fournir le flot sanguin local minimum pouvant soutenir les besoins tissulaires, ce qui limite la charge de travail au cœur. Lorsque l'activité métabolique locale varie, l'équilibre est déplacé vers l'un ou l'autre des deux états contractiles et

c'est précisément l'activité métabolique qui conditionnerait la position de l'équilibre du tonus vasculaire local (Hall, 2016).

Pour expliquer ce phénomène régulateur, un premier modèle, celui de la substance vasorelaxante, stipule que certains produits émanant de cellules métaboliquement actives — connus (comme l'adénosine ou le dioxyde de carbone) ou encore à identifier — engendrent une signalisation vasorelaxante locale dans les CMLv des sphincters précapillaires. Selon un second modèle, celui de la dette en oxygène, l'épuisement du dioxygène découlant de l'activité métabolique empêche la vasoconstriction complète. Les deux modèles ne sont pas mutuellement exclusifs et tous deux visent à expliquer comment l'intensification de l'activité métabolique locale fait dilater les vaisseaux de manière à fournir davantage d'oxygène et de nutriments dans une réponse adaptative (Hall, 2016; Herring et Paterson, 2018). Il est à noter qu'un paradigme différent semble à l'œuvre dans la circulation pulmonaire, dont le rôle n'est pas de livrer le dioxygène, mais bien de le capter. Dans les artères pulmonaires, un tarissement de l'oxygène engendre plutôt une vasoconstriction locale, ce qui semble bénéfique au couplage entre la ventilation et la perfusion alvéolaire (Sommer et collab., 2016).

3.2.1.2. Autorégulation, compliance et tonus myogénique

Un deuxième mécanisme vasculaire intrinsèque de régulation de PA implique la capacité d'autorégulation que possèdent les artères, veines et vaisseaux lymphatiques de petit calibre (15 à 300 μm selon les espèces; Feihl et collab., 2006). Ces vaisseaux ont une paroi élastique, dite compliant (voir la section 3.3.2.1 et l'Annexe I) puisqu'ils sont capables d'accommoder une augmentation de débit sanguin moyennant une expansion radiale, au même titre que d'autres vaisseaux de plus grand calibre d'ailleurs.

À la suite d'une augmentation de débit sanguin, bon nombre de petits vaisseaux sont en fait pourvus d'une capacité à rétablir promptement le débit près de sa valeur initiale grâce à l'intervention du tonus myogénique, ce qui permet l'autorégulation du débit sanguin. En effet, la paroi de ces vaisseaux, qui est relativement épaisse, permet une réponse intégrée aux variations de volume vasculaire. La CMLv est informée de l'état d'étirement vasculaire grâce à des mécanorécepteurs situés à la paroi vasculaire. La CMLv répond à une expansion de volume en lui opposant une vasoconstriction rendue possible par différentes cascades de signalisation et une dépolarisation

cellulaire, ce qui contre l'augmentation du flot sanguin. L'identité moléculaire des transducteurs d'étirement n'est toujours pas connue en détail, mais elle inclut des protéines comme le récepteur AT₁ (de l'Ang II), lequel s'engagerait dans une signalisation de forces mécaniques sans être nécessairement activé par son ligand canonique (Sharif-Naeini et collab., 2010).

Le tonus myogénique pourrait également être en partie sous-tendu par des facteurs agissant à courte portée via des signalisations locales autocrines ou paracrines. En effet, il est connu que les forces de cisaillement appliquées à la paroi vasculaire induisent la libération de nucléotides en circulation, et que ces derniers sont impliqués dans des cascades de signalisation provoquant la contraction des CMLv via des récepteurs couplés à une protéine G inhibitrice. Un autre facteur paracrine largement étudié en physiologie vasculaire est le NO. Cette substance est typiquement produite en réponse à la vasoconstriction et à l'augmentation de la résistance au flot sanguin, ce qui intensifie les forces de cisaillement. En réponse à cette stimulation de l'endothélium, la NO synthase endothéliale se voit activée. Le NO produit diffuse rapidement vers la CMLv et engendre une vasorelaxation permettant de contrebalancer la réduction de flot sanguin. Les défauts dans la signalisation vasorelaxante du NO sont la caractéristique principale du désordre nommé dysfonction endothéliale (Kaplan et Victor, 2015; Herring et Paterson, 2018). Il a d'ailleurs été montré que le NO est un inducteur de l'expression de KCC3 dans les CMLv primaires d'aorte de rat in vitro (Di Fulvio et collab., 2003), et d'aucuns ont posé l'hypothèse que KCC3 puisse être impliqué dans la réponse vasorelaxante du NO (Adragna et collab., 2000).

3.2.1.3. Angiogenèse et remodelage vasculaire

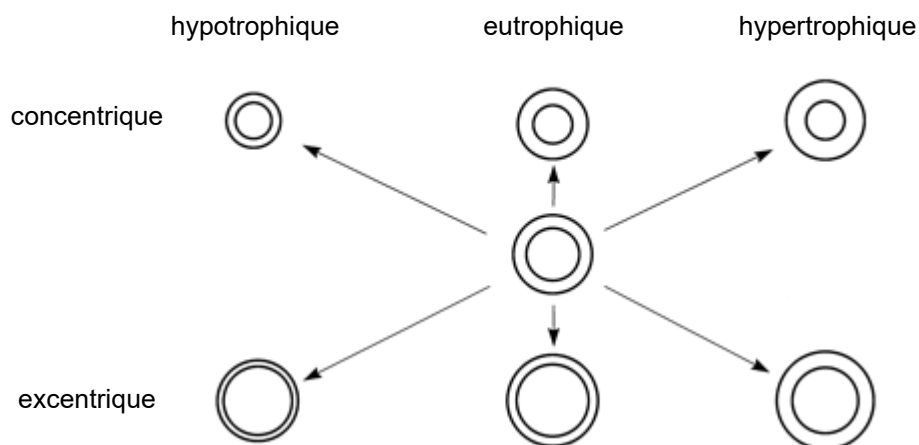
À plus long terme, les modifications soutenues de flot sanguin dans différents territoires vasculaires ont pour effet de créer de nouveaux vaisseaux et de remanier la composition de la paroi vasculaire pour adapter cette dernière aux besoins circulatoires locaux. Cette réponse s'appelle le remodelage vasculaire. En guise d'exemple, des tissus sollicités de manière soutenue verront une densification de leur microcirculation se mettre en place par des processus angiogéniques, notamment (Hall, 2016; Herring et Paterson, 2018). L'ajout de voies alternatives pour la circulation sanguine permet de diminuer la résistance et la pression dans chacune de ces voies parallèles au repos et permet de démultiplier la perfusion d'un organe comme le muscle squelettique lors d'un effort physique, par exemple (McArdle et collab., 2015). De façon intéressante, une raréfaction des microvaisseaux touche les individus prédisposés à l'HTA ou vivant avec l'HTA, laquelle reflète une capacité

angiogénique réduite (Noon et collab., 1997). Le remodelage vasculaire peut aussi être induit par des processus inflammatoires ou des modifications biochimiques de l'entourage d'un vaisseau.

Le remodelage vasculaire peut avoir lieu dans la microcirculation comme dans les plus grands vaisseaux et implique au moins quatre phénomènes cellulaires : la croissance, l'apoptose, la migration ainsi que la synthèse et la dégradation de la matrice extracellulaire (Gibbons et Dzau, 1994; Renna et collab., 2013). Par exemple, chez les patients atteints d'HTA essentielle primaire avec suractivation du SRAA (voir les sections 2.4.3.2 et 3.2.3), l'imposition chronique de PA élevées à une artère de petit calibre lui commande de renforcer sa paroi en réorganisant ses CMLv dans une média plus épaisse autour d'une lumière légèrement rétrécie. Il s'agit d'un des cas de remodelage possibles (voir la Figure 7); celui-ci dit eutrophique et concentrique puisque l'aire sectionnelle de la média (la biomasse contractile) est inchangée par rapport à la normale et puisque la lumière est rétrécie. Ce type de remodelage est associé à un ratio accru entre la paroi médiale et le diamètre de la lumière (média/lumière), ce qui engendre une augmentation de réactivité vasculaire (Gibbons et Dzau, 1994). Il s'agit avant tout d'un processus permettant de mieux normaliser ou répartir le stress s'exerçant sur la paroi vasculaire aussi désigné sous le terme de tension pariétale (voir la section 3.3.2.1 et l'Annexe I) et de protéger l'intégrité de la structure (Schiffirin, 2004). Le remodelage eutrophique joue un rôle dans la pathogenèse de l'HTA et joue également un rôle amplificateur des symptômes de la maladie (Gibbons et Dzau, 1994; Renna et collab., 2013).

Dans les artères conductives de plus grand calibre, l'imposition d'une PA élevée stimule l'expression de gènes du programme hyperplasique des CMLv et de facteurs inflammatoires, ce qui mène à un remodelage hypertrophique excentrique, une augmentation du ratio média/lumière et une accumulation de protéines rigidifiantes dans la matrice extracellulaire (collagène et fibronectine). Il n'est pas surprenant que des artères de calibre différent adoptent une réponse différente face à un même état pathologique. Les artères conductives servent à acheminer de grandes quantités de sang à des territoires diversifiés et leur programme fonctionnel n'inclut pas des rétrécissements rythmés de diamètre (Mulvany, 1999).

Figure 7 Catégories de remodelage vasculaire



Note. Le vaisseau au centre constitue le point de départ. Un axe vertical concentrique-excentrique définit la direction du développement de la média, alors qu'un axe horizontal hypotrophique-hypertrophique définit le changement relatif dans l'aire sectionnelle de la média. Adapté de « Vascular remodelling of resistance vessels: Can we define this? », par M. J. Mulvany, 1999, *Cardiovascular Research*, 41(1), p. 10 ([https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(98\)00289-2](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(98)00289-2)). © 1999 par Oxford University Press. Adapté avec permission (superposition d'une traduction).

3.2.2. Mécanismes nerveux

Le système nerveux, en particulier sa division autonome et les réflexes, joue un rôle majeur dans la régulation à court terme de la PA. Dans le tronc cérébral est logé le centre cardiovasculaire, lequel est divisé en trois aires. L'aire sensitive reçoit les afférences sensibles du système cardiovasculaire en plus de contrôler les réponses réflexes. L'aire vasoconstrictrice émet des signaux sympathiques empruntant la moelle spinale et les nerfs périphériques pour libérer de la norépinéphrine à proximité des artères et des veines (menant à une réponse rapide) en plus de stimuler la glande médullosurrénale à libérer de l'épinéphrine et de la norépinéphrine en circulation sanguine (menant à une réponse plus lente, mais très étendue; voir la section 3.2.3). L'aire vasorelaxante projette des neurones inhibiteurs sur l'aire vasoconstrictrice (Kaplan et Victor, 2015; Hall, 2016).

Un tonus sympathique constitutif maintient un état de contraction partiel de l'arbre vasculaire engendré par des décharges spontanées et régulières (1 à 2 Hz) d'impulsions par les fibres vasoconstrictrices. En réponse à un stress ou à un effort, l'état d'activation sympathique entraîne une vague de vasoconstriction sélective en réponse à la libération de norépinéphrine. En effet, le

type de récepteur exprimé par une cellule cible conditionne la réponse à la stimulation sympathique : les vaisseaux superficiels cutanés et ceux de l'appareil digestif y répondent par une vasoconstriction qui limite la perfusion, alors que les vaisseaux des organes utiles à la lutte ou à la fuite comme les muscles squelettiques y répondent par une vasorelaxation qui soutient une intensification du métabolisme. Les catécholamines stimulent d'ailleurs fortement le métabolisme énergétique, notamment via la signalisation propre aux récepteurs β -adrénergiques hépatiques et adipeux (Herring et Paterson, 2018). Un portrait d'intérêt cardiovasculaire et rénal de la distribution corporelle des récepteurs adrénergiques est présenté dans l'*Annexe 2*.

Le mécanisme réflexe le plus important concernant les paramètres hémodynamiques est le baroréflexe. Celui-ci permet de stabiliser la PA et d'éliminer environ les deux tiers des variations de PA qui sont générées par les activités normales en opposant une bradycardie et une vasorelaxation périphérique à une hausse de PA, et vice versa (Kaplan et Victor, 2015). Des barorécepteurs particulièrement sensibles aux élévations de PA se trouvent dans la paroi des sinus carotidiens et de l'arc aortique, alors que des barorécepteurs sensibles aux distensions volémiques, dits à basse pression, se trouvent dans la paroi auriculaire et celle des grandes veines (Kaplan et Victor, 2015; Stanhewicz et Kenney, 2015; Hall, 2016).

D'autres mécanismes réflexes de moindre importance pour le contrôle de la PA existent également. Parmi ceux-ci, citons en premier lieu les réponses vasoconstrictive et tachycardique suivant l'activation des chimiorécepteurs des corps aortiques et carotidiens en conditions d'hypoxie, d'hypercapnie et d'acidose. Ces chimiorécepteurs sont toutefois plus fortement engagés dans le contrôle respiratoire (Kaplan et Victor, 2015; Hall, 2016). En second lieu, citons la réponse cardiovasculaire anticipatoire à un effort, permise par les chimiorécepteurs des muscles squelettiques en présence des changements chimiques locaux caractéristiques de la contraction musculaire. Cette réponse inclut une élévation de la PA centrale et du DC de manière à accélérer le renouvellement du sang irriguant les muscles (McArdle et collab., 2015).

3.2.3. Mécanismes hormonaux

Les facteurs agissant à longue portée et libérés à l'intérieur de l'arbre vasculaire ont le potentiel d'atteindre une multitude de sites corporels impliqués dans la régulation de la PA. Ces sites incluent notamment la paroi vasculaire de plusieurs organes et les tubules rénaux.

Tel que mentionné plus haut, la norépinéphrine libérée par les fibres nerveuses sympathiques dans la paroi des grands vaisseaux ou à proximité des plus petits vaisseaux a un effet vasoconstricteur rapide sur l'arbre vasculaire. La stimulation sympathique face à un stress inclut une sollicitation de la glande médullosurrénale pour libérer des catécholamines destinées à tous les territoires vasculaires du corps, y compris celles qui sont éloignées des projections du système nerveux sympathique, et moins rapidement dégradées — elles agissent de 10 à 15 fois plus longtemps en comparaison avec celles sécrétées par les varicosités des neurones adrénergiques. Certains territoires corporels bénéficient à la fois des mécanismes nerveux et hormonaux, ce qui assure une réponse appropriée à un stress même en défaut de fonctionnement de l'une des deux composantes (Hall, 2016).

Plusieurs voies de régulation de la PA ne nécessitent pas l'activation du système nerveux, mais misent plutôt sur des mécanismes hormonaux sollicitant la fonction rénale pour réguler le volume extracellulaire et la PA à plus long terme. Tel que présenté à la section 2.4.3.2, le SRAA est l'un des plus puissants systèmes de cette nature et sa stimulation a un effet hypertenseur attribuable à différents mécanismes. À l'inverse, les peptides natriurétiques, présentés à la section 2.4.3.4, sont stimulés lors d'une expansion volémique et ont un effet hypotenseur largement attribuable à une implication du rein.

En plus de son rôle dans le rein, la vasopressine est un puissant vasoconstricteur (voir la section 2.4.3.3). Dans les conditions habituelles, sa concentration circulante est beaucoup trop faible pour exercer cet effet (Hall, 2016). Cette hormone intervient typiquement dans le cas d'une abrupte diminution de volume sanguin ou de PA.

Parmi les nombreux autres facteurs circulants agissant à distance sur la PA, les endothélines sont un autre groupe de peptides d'importance. Ces molécules sont libérées spécialement en cas de lésion chimique ou de déchirure de l'endothélium. Elles ont pour rôle général de bloquer localement un territoire vasculaire, par exemple pour limiter la propagation d'un agent délétère ou la perte volémique. Les endothélines contribuent aussi au tonus de base des artères résistives (Kaplan et Victor, 2015). Dans plusieurs formes d'HTA, la signalisation de l'endothéline peut être accrue (Rautureau et Schiffrin, 2012).

3.3. Étude de la fonction cardiovasculaire chez le rongeur

La souris est un animal largement utilisé pour modéliser les maladies humaines puisqu'elle présente plusieurs avantages en comparaison avec d'autres espèces. En outre, le génome de la souris est très bien caractérisé et des milliers de modèles de souris génétiquement modifiées sont disponibles pour les équipes de recherche (Grimm, 2006; Hall et collab., 2009; Gurumurthy et Lloyd, 2019). De plus, la petite taille de l'animal, son court cycle de vie et ses caractéristiques reproductrices permettent de générer des sujets expérimentaux en plus grande quantité, en moins de temps, dans un espace plus restreint et à moindre coût en comparaison avec d'autres animaux utilisés en recherche cardiovasculaire comme le rat ou le chien (The Jackson Laboratory, 1966).

En revanche, la petite taille et le comportement de la souris posent des défis techniques pour recueillir et analyser certaines données relatives aux paramètres physiologiques. Par exemple, la mesure de la PA centrale est techniquement difficile chez la souris en raison de sa petite taille et du haut degré de nervosité chez l'espèce. Ces défis sont toutefois progressivement surmontés grâce au développement de nouvelles microtechniques de pointe et un contrôle des conditions environnementales (Wilde et collab., 2017). Les techniques de mesure de la PA à différents sites artériels chez la souris ont évolué dans la dernière vingtaine d'années et plusieurs approches sont maintenant disponibles. Cette section présentera certains aspects techniques dans la mesure de la PA et des propriétés des artères résistives.

3.3.1. Monitoring de la pression artérielle chez le rongeur

3.3.1.1. Mesure indirecte

Une technique disponible depuis les années 1930 et qui ne demande aucune habileté technique particulière consiste en la mesure indirecte par sphygmomanométrie (Byrom et Wilson, 1938), qui est analogue à la technique du brassard chez l'humain. Cette technique évalue la circulation dans une artère périphérique et enregistre la pression compressive devant être exercée sur cette artère afin de l'occlure en égalisant la pression sanguine (Krege et collab., 1995).

Concrètement, il s'agit d'immobiliser la souris dans une boîte de contention opaque sur une plaque chauffante et d'enfiler sa queue dans un brassard gonflable (*tail cuff*) tout en effectuant une lecture de l'amplitude du flot sanguin par un dispositif lumineux, acoustique, photoélectrique,

oscillométrique ou autre. Par extension, le nom anglais de cet instrument est couramment utilisé pour désigner la technique de sphygmomanométrie chez le rongeur. L'application de chaleur via la plateforme de mesure (33 à 38 °C) amène une vasorelaxation qui facilite la détection du flot sanguin caudal (Wilde et collab., 2017). Lors d'un cycle de mesure, l'analyse du flot sanguin de base permet de déterminer son amplitude normale ainsi que la fréquence cardiaque. Le brassard est ensuite progressivement gonflé jusqu'à une valeur prédéterminée et la PA systolique retenue correspond à la pression appliquée par l'appareil au moment où le flot se retrouve presque complètement bloqué à un niveau stable. Différentes techniques sont employées pour estimer la PA diastolique. Par exemple, le système BP-2000 de la compagnie Visitech Systems, inc.^{vii} (s. d.), qui utilise la photopléthysmographie par transmission lumineuse, détermine la PA diastolique comme la pression appliquée au moment où l'amplitude du flot oscillatoire commence à diminuer significativement de l'amplitude de départ. D'autres systèmes calculent la PA diastolique comme un certain pourcentage de la PA systolique déterminée, ce qui ne constitue donc pas une mesure fiable de la PA diastolique réelle. Typiquement, au moins 8 cycles de mesure sont effectués à chaque point expérimental (Krege et collab., 1995; Wilde et collab., 2017).

Les principales forces de la sphygmomanométrie sont sa facilité d'utilisation et son faible coût. Cette technique permet l'analyse de grands groupes de souris en une courte période de temps et à peu de frais afin de détecter des écarts de PA flagrants entre les groupes étudiés (Van Vliet et collab., 2000; Zhao et collab., 2011; Wilde et collab., 2017).

Cette technique fait cependant l'objet de certaines critiques. En particulier, la fenêtre temporelle de mesure est très restreinte par rapport à la variabilité quotidienne de la PA. Le plus souvent, les mesures sont faites pour une trentaine de minutes durant la période diurne. La PA déterminée est aussi influencée par les conditions thermiques et d'immobilisation nécessaires à la mesure. Il est donc habituel d'exposer les animaux à la procédure durant plusieurs jours avant de procéder à la collecte des résultats à retenir pour analyse. De plus, il est possible que la PA mesurée indirectement dans les artères de la queue ayant subi une certaine vasorelaxation en condition d'immobilisation ne soit pas représentative de la PA centrale ni soumise aux mêmes régulations face aux changements environnementaux. Cette technique est donc plutôt adaptée pour détecter

^{vii} La compagnie Visitech Systems, inc. a son siège social dans la ville d'Apex (NC, É.-U.).

des phénotypes d'HTA franche ou pour évaluer par criblage les différences de PA entre plusieurs groupes expérimentaux. Toutefois, elle n'est pas bien adaptée aux protocoles longitudinaux, ni aux détections de phénotypes plus subtils, ni dans le but de fournir une valeur représentative de PA pour comparaison avec la littérature ou avec des valeurs obtenues dans des expériences indépendantes (Van Vliet et collab., 2000; Van Vliet et collab., 2006; Zhao et collab., 2011).

3.3.1.2. Mesure directe par cathétérisme aigu

Il est possible, dans le cadre d'une intervention terminale nécessitant un certain degré d'habiletés techniques, de mesurer directement la PA en implantant un cathéter dans une artère chez une souris anesthésiée. Le cathéter est relié à un appareil transformant le signal de PA en signal électrique (transducteur), puis ce signal doit être amplifié, éventuellement converti en signal numérique, et enfin enregistré. À la fin de l'enregistrement, l'animal est euthanasié, donc il n'y a aucun risque de complications postchirurgicales (Van Vliet et collab., 2000).

L'utilisation d'appareils externes permet de bénéficier d'une calibration toujours optimale avant une lecture pour maximiser l'exactitude des résultats. Il est possible de mesurer la PA à la sortie du cœur via la carotide, ou encore dans l'aorte via une artère majeure, comme l'artère fémorale, et de vérifier l'effet hémodynamique instantané de différents agents pharmacologiques. L'utilisation des cathéters avec transducteur externe est peu coûteuse une fois que les appareils d'enregistrement sont acquis (Van Vliet et collab., 2000). Par contre, cette technique permet seulement de mesurer une PA sous anesthésie, donc diminuée par rapport au repos (Zhao et collab., 2011), et durant quelques heures durant la phase diurne : elle ne permet pas de mesurer la PA à l'état éveillé ni de vérifier l'effet d'un traitement prolongé.

3.3.1.3. Mesure directe par cathétérisme chronique et transducteur externe

Très souvent, la mesure directe présentée ci-dessus est utilisée pour en faire un système de mesure à plus long terme. Dans ce cas, le cathéter est implanté dans le cadre d'une chirurgie aseptique, après quoi il est fixé aux structures voisines puis externalisé de manière à le rendre beaucoup mieux accessible à l'expérimentateur qu'à l'animal. Le plus souvent, le cathéter refermable est apporté au dos de l'animal dans un harnais. Après une période de récupération postchirurgicale, les mesures peuvent se faire en connectant le cathéter au transducteur externe de pression (Van Vliet et collab., 2000).

Les cathéters implantés de manière chronique avec transducteur externe permettent à priori de mesurer directement la PA en continu et pour plusieurs jours chez l'animal éveillé, mais en occasionnant un degré variable de restriction à la locomotion normale de l'animal en raison de la connexion avec les appareils. Il est possible d'utiliser un système d'attachement avec pivot (*tether-swivel*) afin de limiter l'encombrement du cathéter. Cependant, l'expérience démontre que même en prenant les précautions appropriées, la réutilisation du cathéter est limitée à quelques jours avant qu'un blocage ne survienne. De plus, certains rongeurs tolèrent difficilement les dispositifs implantés sur plus de quelques jours, ce qui limite la possibilité de protocoles prolongés. Le plus souvent, cette technique est utilisée en présence de l'expérimentateur pour déterminer la PA durant des portions de la période diurne (Van Vliet et collab., 2000; Zhao et collab., 2011).

L'utilisation d'un cathéter externalisé permet certains avantages : il est par exemple possible de vérifier et d'ajuster en cours de protocole la calibration des appareils, ce qui évite des problèmes de dérive du niveau de base ou de changement dans la sensibilité de la mesure. En revanche, l'intervention chirurgicale nécessite un entraînement technique en plus des investissements de temps et de ressources pour les soins péri-chirurgicaux. Elle s'accompagne également de risques quant à l'intégrité du matériel et à la récupération postopératoire (Van Vliet et collab., 2000; Zhao et collab., 2011).

3.3.1.4. Mesure directe par cathétérisme chronique et transducteur externe

Une autre technique plus récente de mesure directe s'est perfectionnée au cours des ans et établie comme référence pour la mesure de la PA chez le rongeur. Il s'agit de la mesure par cathéter intraartériel couplé à un émetteur radiotéléométrique complètement implantable, une technique couramment désignée sous le nom de télémétrie (Mills et collab., 2000). Pour utiliser cette méthode, il faut d'abord implanter chirurgicalement un transducteur de pression miniaturisé dans une poche sous-cutanée. Cet implant est alimenté par batterie et relié à un cathéter rempli de fluides. Ce cathéter doit être introduit dans une artère : le plus souvent chez la souris, il est introduit dans l'artère carotide gauche de sorte que son extrémité se loge dans la crosse aortique pour mesurer la PA centrale. Après récupération complète des sujets opérés (environ 10 jours), il devient possible de mesurer à tout moment la PA (Lavoie, 2006; Huetteman et Bogie, 2009). Une fois activé par le passage d'un aimant, le transducteur transmet la PA sous forme d'onde radio lue par une plateforme réceptrice placée sous la cage de l'animal. L'interface informatique décode le signal et peut afficher

en temps réel la PA, puis analyse l'onde de pouls afin d'obtenir les différents paramètres hémodynamiques (PA systolique, diastolique, moyenne, pulsée et fréquence cardiaque; [Mills et collab., 2000](#); [Alam et collab., 2016](#)).

Typiquement, les paramètres hémodynamiques sont échantillonnés régulièrement durant au moins 24 heures. L'échantillonnage se fait sous forme de segments de 10 secondes espacés de quelques minutes, ce qui génère une grande quantité de mesures ponctuelles. La moyenne pour chaque paramètre est ensuite calculée séparément pour les phases diurne et nocturne ou sur des périodes de temps plus courtes si nécessaire ([Lavoie, 2006](#); [Van Vliet et collab., 2006](#); [Falcao et collab., 2009](#)).

Les avantages de la mesure de PA par émetteur radiotéléométrique sont multiples. Cette technique permet en outre de mesurer la PA d'un sujet expérimental complètement libre en conditions d'hébergement normales et sans aucune intervention après l'activation de l'implant. De plus, elle rend possible la mesure des valeurs de PA à toute heure de la journée et sur des périodes prolongées, ce qui permet l'analyse longitudinale lors d'un processus (vieillesse, grossesse ou autre) ou en réponse à un traitement expérimental (modification diététique, administration de drogue, stress d'immobilisation, etc.; [Van Vliet et collab., 2006](#); [Falcao et collab., 2009](#); [Wilde et collab., 2017](#)).

Outre des complications chirurgicales et des investissements considérables de temps et de ressources, il existe quelques limites spécifiques à l'utilisation de la mesure de pression par émetteur radiotéléométrique. Par exemple, le processus d'implantation du cathéter est techniquement difficile à réaliser, en particulier chez la souris. Le dispositif pourrait être trop gros pour de très petits sujets expérimentaux (< 18 g), ce qui limite l'utilisation chez les souris juvéniles ou celles qui auraient un phénotype de très petite taille corporelle. La capacité de la batterie (45 jours) est limitante dans le contexte d'un protocole de longue durée ([Mills et collab., 2000](#)). Cependant, il est possible de préserver la capacité de la batterie en espaçant les moments où la PA est échantillonnée. Puisque l'implant téléométrique est un corps étranger, son cathéter peut éventuellement se boucher au bout de plusieurs semaines et cesser de transmettre un signal valide. La durée maximale sur laquelle une acquisition de PA peut être faite est difficile à prévoir et dépend de plusieurs variables expérimentales inhérentes aux modèles et devis retenus. Plusieurs indicateurs dans la forme du tracé de PA permettent de déterminer si les mesures sont valides ou

potentiellement contaminées (Van Vliet et collab., 2006). Comme il n'est pas possible d'accéder à l'appareil de mesure durant le protocole expérimental, il est important de s'assurer après le retrait de l'implant que le signal n'a pas subi de déviation en comparaison avec le signal préimplantation (Van Vliet et collab., 2000; Leonard et collab., 2006; Van Vliet et collab., 2006; Huetteman et Bogie, 2009).

3.3.2. Évaluation des propriétés des artérioles

Les propriétés réactives de la paroi vasculaire sont déterminantes pour la régulation de la circulation sanguine. En effet, la sensibilité que les cellules médiales et intimes présentent aux agents vasomodulateurs a un impact majeur sur la régulation du tonus vasculaire et sur le développement éventuel de dérèglements de la PA. En utilisant les modèles murins, il est notamment possible après sacrifice d'étudier ex vivo la fonction de différents vaisseaux. Les techniques artériographiques filaires permettent de mesurer la force développée par un anneau vasculaire en conditions isométriques, ce qui donne des indices sur le comportement des CMLv (Schiffirin et Hayoz, 1997). Puisque le vaisseau n'est pas perfusé, sa réponse peut s'éloigner passablement des réponses habituelles du vaisseau in vivo.

Grâce à un artériographe où des capillaires permettent d'enfiler un vaisseau et de le perfuser, il est possible en revanche d'observer les changements de diamètre vasculaire et d'obtenir une grande quantité d'informations notamment au sujet des petites artères déterminantes dans la RP. Les propriétés déterminées grâce à cette technique permettent de mettre au jour des prédispositions aux maladies cardiovasculaires aussi bien que de quantifier la sévérité d'atteintes vasculaires associées à un désordre comme l'HTA ou l'obésité (Schiffirin et Hayoz, 1997).

3.3.2.1. Caractéristiques structurales et mécaniques passives

En plaçant une artère résistive en conditions où la contraction de la CMLv est impossible (par exemple dans un milieu sans Ca^{2+}), il est possible d'établir les courbes de diamètres interne et externe en fonction de la pression. À une pression représentative des conditions physiologiques (par exemple 40 mmHg), la morphologie peut être déduite à partir des dimensions en assumant une forme cylindrique idéale. En plus du diamètre de la lumière, les paramètres dérivés les plus informatifs sont l'épaisseur et l'aire sectionnelle de la paroi, lesquels permettent de déterminer si un remodelage a pu avoir lieu en comparaison avec une autre condition. Le ratio entre la paroi

médiale et le diamètre de la lumière donne un indice de la capacité théorique du vaisseau d'effectuer une forte vasoconstriction (Gibbons et Dzau, 1994; Laurant et collab., 1997; Mulvany, 1999). D'autres propriétés mécaniques passives peuvent être évaluées (voir l'*Annexe 1*).

3.3.2.2. Réactivité aux agents vasomodulateurs

Grâce au même système artériographique, mais en mimant les conditions physiologiques en présence de Ca^{2+} sous une pression de perfusion stable, il est possible de dresser le profil de sensibilité d'un vaisseau à différents agents modulateurs. Pour ce faire, il s'agit de mesurer le diamètre interne du vaisseau lors d'une exposition à des concentrations cumulatives croissantes de différents agents d'intérêt. Les équations permettant de modéliser la réactivité vasculaire à des agents pharmacologiques sont présentées à l'*Annexe 1*.

4. Métabolisme énergétique

Sachant que la perte de fonction de *Kcc3* est liée à des atteintes métaboliques comme une faible masse corporelle, il est nécessaire d'aborder quelques notions de métabolisme énergétique. Plusieurs considérations quant à l'utilisation des nutriments comme sources d'énergie pour l'organisme seront abordées afin de mettre en évidence les implications potentielles du cotransporteur dans certains processus cellulaires ou physiologiques pertinents pour la fonction métabolique.

La seule source d'énergie réellement utilisable dans la cellule est celle contenue dans les liaisons à haut potentiel énergétique des nucléosides phosphate, en particulier de l'ATP (Hall, 2016; Voet et Voet, 2016). L'ATP est continuellement dégradée pour libérer de l'énergie à investir dans un processus énergivore, puis resynthétisé à partir d'autres processus libérant l'énergie chimique d'autres molécules. L'ATP est la forme sous laquelle l'énergie est entreposée ou échangée dans l'organisme : on dit qu'elle est la monnaie énergétique cellulaire. Il existe différents systèmes permettant de régénérer l'ATP selon des débits et des capacités variables à partir de l'énergie entrée dans l'organisme par l'alimentation via des nutriments porteurs de liaisons chimiques énergétiquement moins denses (McArdle et collab., 2015). Chacun de ces systèmes est caractérisé par des exigences chimiques particulières et l'implication de voies enzymatiques spécifiques, ce qui constitue autant de points de régulation potentiels dans leur activité.

Le bassin de nucléosides phosphate cellulaires ne doit jamais être complètement épuisé pour que la cellule puisse survivre, et ainsi différents systèmes producteurs d'énergie sont en place selon les types cellulaires. Le système le plus rapide et universel d'entre eux est celui des phosphagènes (enzymes : créatine kinase et adénylate kinase). Il prend une importance variable selon le type cellulaire et le statut de nutrition et d'entraînement des individus, mais il dispose dans tous les cas d'une capacité très limitée. Il est donc surtout important lors d'efforts maximaux très brefs. Le système des phosphagènes agit en fait comme système tampon pour rétablir rapidement les stocks d'ATP cellulaires et alimenter des processus hautement énergivores comme la contraction musculaire (McArdle et collab., 2015). Parmi les autres systèmes producteurs d'énergie, ceux disposant des capacités totales supérieures incluent, dans l'ordre croissant, ceux de la dégradation anaérobie des glucides ainsi que ceux de l'oxydation des glucides et des lipides. L'utilisation des

lipides pose certaines contraintes qui ralentissent la livraison vers la machinerie enzymatique, mais les quantités stockées sont rarement un enjeu limitant (Poortmans et Boisseau, 2017).

4.1. Métabolisme des lipides

Les lipides constituent une source d'énergie très dense pour l'organisme en comparaison avec d'autres nutriments comme les glucides. En outre, l'utilisation de 1 g de lipide comme carburant cellulaire permet de fournir 2,3 fois plus d'énergie que 1 g de glucides (9,4 contre 4,1 kcal; McArdle et collab., 2015). Cependant, à cause de la nature hydrophobe des molécules lipidiques, ces dernières doivent être stockées à l'écart du milieu aqueux, c'est-à-dire de manière anhydre (Poortmans et Boisseau, 2017). Autant chez les plantes que chez l'animal, les lipides dotés d'un potentiel énergétique sont stockés sous forme de triacylglycérols (TAG), c'est-à-dire trois acides gras liés à une molécule de glycérol par des liaisons de type ester (Voet et Voet, 2016). Même chez un sujet à faible adiposité corporelle, les réserves sous forme de lipides sont largement plus abondantes que celles stockées sous toutes les autres formes de substrats énergétiques combinées (McArdle et collab., 2015). Cependant, la mobilisation de ces réserves est associée à certaines contraintes physiologiques et à des processus plus lents en comparaison avec les autres réserves, comme il le sera décrit plus loin.

4.1.1. Mise en réserve des lipides

Lorsque l'énergie est disponible en excès, comme à la suite de la consommation de lipides, un programme métabolique de stockage des TAG appelé lipogénèse est activé. D'autres nutriments comme les glucides peuvent également être convertis en lipides (Hall, 2016; Salway, 2017). En effet, les molécules d'acétyl-CoA issues notamment de la métabolisation des glucides peuvent servir de précurseurs pour la formation d'acides gras, surtout dans le foie et le tissu adipeux, sous l'action de l'acide gras synthase (*fatty acid synthase*, FAS, codée par le gène *FASN*). Une autre enzyme, l'acétyl-CoA carboxylase, contribue à l'initiation de l'élongation des acides gras et subséquemment à l'inhibition du catabolisme lipidique (Tong, 2005). Au cours de la lipogénèse, les acides gras synthétisés *de novo* ou obtenus d'une lipoprotéine sont adjoints par estérification à une molécule de glycérol sous l'action de différentes enzymes, notamment des monoacylglycérol acyltransférases (MGAT, codée par quelques gènes) et les diacylglycérol O-acyltransférases (DGAT, codées par au moins deux gènes; Zhang et collab., 2014). Ces réactions se produisent à

l'intérieur des cellules comme les adipocytes, ce qui entraîne l'expansion de leur gouttelette lipidique (Hall, 2016; Voet et Voet, 2016; Salway, 2017).

Les dépôts adipeux sous-cutanés sont les sites privilégiés d'accumulation de lipides et sont même associés à de meilleurs marqueurs de santé cardiometabolique en comparaison avec d'autres sites corporels comme la cavité abdominale (Koster et collab., 2010). D'autres sites corporels peuvent également accumuler des quantités variables de TAG dans des adipocytes, les muscles squelettiques et certains organes viscéraux (foie, pancréas, cœur, etc.). L'expansion de ces dépôts ectopiques de lipides est toutefois corrélée avec des complications métaboliques (Shulman, 2014). Le gras entourant les organes doit être distingué de certains stocks de TAG dans des cellules non adipocytaires, comme les rhabdomyocytes, puisque les TAG musculaires peuvent jouer des rôles bénéfiques pour la fonction cardiometabolique et la génération d'énergie à l'effort (Addison et collab., 2014).

4.1.2. Utilisation des lipides

Les cellules périphériques comme les rhabdomyocytes et les cardiomyocytes peuvent métaboliser les acides gras obtenus de la circulation sanguine dans un processus échelonné sur de nombreuses étapes. L'activation sympathique, l'intensification de la demande énergétique et la diminution des concentrations plasmatiques de nutriments ont pour effet d'activer, dans les adipocytes des dépôts adipeux, (1°) des enzymes lipolytiques comme la lipase du tissu adipeux (*adipose triglyceride lipase*, officiellement désignée sous le nom de *patatin-like phospholipase domain containing 2*, codée par le gène *PNPLA2*) et la lipase hormonosensible (*hormone-sensitive lipase*, officiellement désignée sous le nom de lipase E, codée par le gène *LIPE*). Les acides gras libérés (2°) se lient à l'albumine dans le sang (van der Vusse, 2009; Voet et Voet, 2016) et peuvent ainsi atteindre les différents territoires corporels pour agir comme substrat énergétique. La lipoprotéine lipase, qui est une enzyme extracellulaire ancrée aux cellules endothéliales, peut également être impliquée à des degrés variables dans la dissociation des TAG complexés dans les lipoprotéines circulantes pour soutenir l'activité cellulaire dans des organes comme le muscle et le cœur (Wang et Eckel, 2009).

Avant d'être utilisé comme substrat énergétique, un acide gras doit ensuite (3°) franchir la membrane cytoplasmique par diffusion simple ou facilitée (Saier, 2000; Alberts et collab., 2008; Stein et Litman, 2015; Salway, 2017) avant d'être (4°) transformé en acyl-CoA dans le cytoplasme.

Ainsi activé, l'acyl-CoA est par la suite acheminé jusqu'au site intracellulaire de sa métabolisation : la mitochondrie. Les enzymes du catabolisme des acides gras sont en fait présentes dans la matrice mitochondriale, laquelle est entourée par deux bicouches lipidiques concentriques. Le passage de ces membranes constitue des étapes additionnelles nécessitant le concours d'une (5^o) navette moléculaire appelée la carnitine et de (6^o) protéines de translocation enchâssées dans chacune des deux bicouches lipidiques (Salway, 2017).

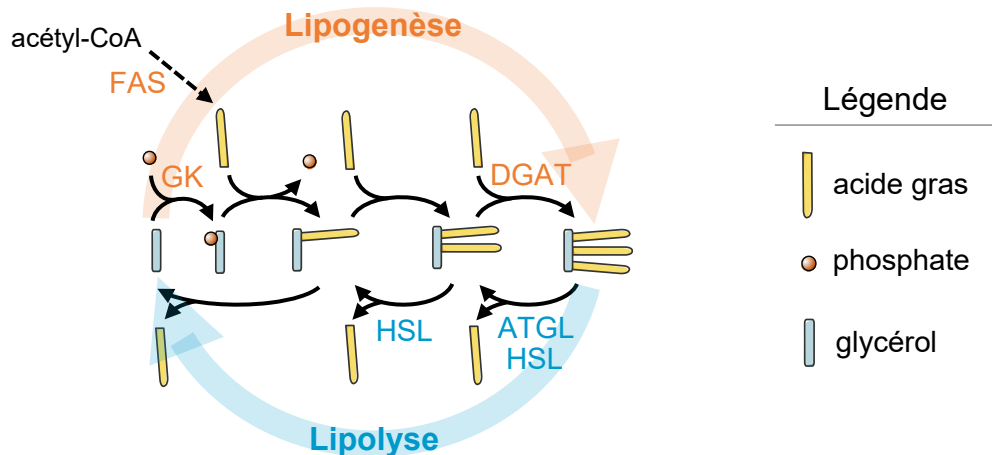
Arrivé dans la matrice mitochondriale, l'acyl-CoA peut entrer dans une spirale métabolique appelée (7^o) β -oxydation, laquelle permet de former des coenzymes réduites (FADH₂ et NADH + H⁺) et de raccourcir l'acyl-CoA par retranchements successifs d'un métabolite à deux atomes de carbone. Ce métabolite est l'acétyl-CoA et il peut joindre une autre voie métabolique d'importance appelée le (8^o) cycle de Krebs (ou cycle des acides tricarboxyliques). La disponibilité des intermédiaires du cycle de Krebs est par ailleurs essentielle à la poursuite de l'oxydation des lipides. Différentes voies anaplérotiques et une oxydation concomitante du glucose permettent d'approvisionner le cycle de Krebs (Voet et Voet, 2016; Salway, 2017). Certains physiologistes modélisent ce phénomène et le résumant en affirmant que « les lipides brûlent au feu du glucose » (Rosenfeld, 1906; McArdle et collab., 2015, p. 158).

Au cours des réactions du cycle de Krebs, une molécule d'acétyl-CoA est utilisée pour libérer de l'énergie sous forme de guanosine triphosphate et de coenzymes réduites alors que de l'eau est consommée et que du dioxyde de carbone est produit. De manière importante, les coenzymes réduites produites au cours de la β -oxydation (à l'étape 7^o) et du cycle de Krebs sont porteurs d'électrons dont le haut potentiel de transfert énergétique est mis à profit via une autre voie métabolique de la mitochondrie, celle de la (9^o) chaîne respiratoire. En bref, ces électrons circulent progressivement parmi plusieurs complexes protéiques dotés d'activités oxydoréductrices ou d'une fonction d'export protonique. Ensuite, (10^o) l'ATP synthétase utilise le gradient de protons intermembranaire établi pour les ramener dans la matrice mitochondriale et, ce faisant, adopte des transitions conformationnelles permettant l'ajout de phosphate inorganique sur l'ADP pour former l'ATP. Les électrons transportés durant ce processus doivent se lier à l'oxygène comme accepteur final, ce qui produit de l'eau métabolique, dans un processus appelé phosphorylation oxydative (Voet et Voet, 2016; Salway, 2017).

4.1.3. Cycle de substrats glycérolipides-acides gras

Le statut énergétique corporel, c'est-à-dire le bilan entre la demande en énergie et la disponibilité des substrats énergétiques, est un déterminant important de la régulation des voies du métabolisme énergétique (Poortmans et Boisseau, 2017; Salway, 2017). Or, il existe des situations où des voies métaboliques antagonistes sont simultanément activées, ce qui ne permet pas à première vue d'orchestrer une réponse métabolique coordonnée ni dirigée, mais plutôt de successivement synthétiser puis dégrader des molécules apparentées. Un tel phénomène est appelé cycle de substrat et est parfois qualifié de « futile » puisqu'il utilise de l'énergie sans fournir un travail apparent. Un tel cycle impliquant les glycérolipides^{viii} et les acides gras a notamment été décrit en détail (voir la Figure 8; Newsholme et Crabtree, 1976; Prentki et Madiraju, 2008). L'activation de ce cycle glycérolipides-acides gras a d'ailleurs déjà été observée dans le contexte d'une augmentation de dépense énergétique (Tan et collab., 2016; Worsch et collab., 2018; Poursharifi et collab., 2020). Ce cycle en apparence futile pourrait en fait devoir son existence à sa production de métabolites signalétiques ou son implication dans la thermogénèse (Newsholme et Crabtree, 1976; Prentki et Madiraju, 2008).

Figure 8 Schéma d'un cycle de substrats glycérolipides-acides gras



Note. Exemple de réactions impliquées dans le cycle glycérolipides-acides gras. Certaines enzymes clés ont été identifiées. ATGL, lipase du tissu adipeux. DGAT, diacylglycérol O-acyltransférase. FAS, acide gras synthase. GK, glycérol kinase. HSL, lipase E (hormonosensible). Images tirées de *Servier Medical Art*, par Les Laboratoires Servier, s. d. (<https://smart.servier.com>). CC BY 3.0. Reproduites avec permission. Travail original.

^{viii} Les glycérolipides englobent les acylglycérols (monoacylglycérols, diacylglycérols et triacylglycérols) ainsi que les phosphoglycérolipides.

4.2. Métabolisme des glucides

Si les lipides constituent une réserve importante d'énergie en termes de calories disponibles, les glucides, eux, constituent une source d'énergie beaucoup plus rapidement accessible pour l'organisme (McArdle et collab., 2015; Poortmans et Boisseau, 2017). En effet, du glucose en circulation sanguine peut être très rapidement mobilisé en réaction à une soudaine demande énergétique. De plus, les enzymes responsables des premières réactions cataboliques du glucose sont cytosoliques (Voet et Voet, 2016). Plusieurs organes disposent de réserves glucidiques sous forme de glycogène, un polymère hydrosoluble dont le clivage permet de libérer du glucose dans le cytosol et éventuellement dans la circulation sanguine (Salway, 2017). Le poids de l'eau devant obligatoirement accompagner les réserves de glucides constitue toutefois une limitation aux quantités pouvant être stockées (Poortmans et Boisseau, 2017).

4.2.1. Mécanismes assurant l'homéostasie du glucose

Le glucose est un carburant cellulaire universel, et il est dans certains cas l'un des rares carburants réellement disponibles pour des raisons liées aux enzymes présentes, à la perméabilité des structures cellulaires aux substrats ou même à l'intensité de l'effort (McArdle et collab., 2015; Hall, 2016; Poortmans et Boisseau, 2017). Le glucose est une trop grosse molécule pour pouvoir diffuser passivement à travers les membranes cellulaires, et il emprunte donc différents transporteurs membranaires qui permettent sa diffusion facilitée. Quelques-uns des transporteurs de glucose sont régulés par liaison avec un ligand, par couplage biomécanique ou par des mécanismes de trafic vésiculaire (Saier, 2000; Alberts et collab., 2008; Stein et Litman, 2015). Il est essentiel pour la santé métabolique que les cellules puissent utiliser le glucose efficacement lorsque nécessaire, mais certaines prédispositions génétiques et habitudes de vie délétères peuvent compromettre l'utilisation du glucose et causer des formes de diabète de sévérité variables. Le diabète est en fait une incapacité à utiliser le glucose sanguin, laquelle se répercute sur l'utilisation des autres substrats énergétiques potentiels, c'est-à-dire les lipides et les protéines (Hall, 2016).

Puisque le glucose est un carburant cellulaire universel, sa concentration dans le sang (glycémie) est étroitement régulée de manière à éviter qu'elle n'atteigne des niveaux trop bas pour soutenir l'activité des organes vitaux comme le cerveau (McArdle et collab., 2015; Hall, 2016). En phase postprandiale, la glycémie peut momentanément être plutôt élevée avant de redescendre au niveau de base après que les cellules périphériques aient utilisé le glucose comme carburant et comme

monomère pour constituer des réserves. Au contraire, au cours d'un jeûne, le foie produit du glucose par deux mécanismes pour éviter que l'utilisation continue de glucose n'entraîne une hypoglycémie. Pour ce faire, les hépatocytes peuvent lyser leur polymère de réserve, le glycogène, ou encore former de nouvelles molécules de glucose à partir de précurseurs néoglucogéniques (McArdle et collab., 2015). Il est à noter que le muscle accumule lui aussi des réserves de glycogène qui lui restent toutefois dédiées, et que d'autres organes comme le rein et l'intestin peuvent aussi contribuer à la néoglucogenèse (Hall, 2016).

Deux hormones pancréatiques aux actions réciproques assurent des rôles primordiaux dans l'homéostasie du glucose corporel. D'un côté, le glucagon est une hormone libérée lorsque la glycémie diminue sous une valeur de consigne. Son action principale est d'activer la mise en circulation de substrats énergétiques grâce à la stimulation de la production de glucose hépatique et de la lipolyse (Hall, 2016; Voet et Voet, 2016).

De l'autre côté, l'insuline est l'hormone libérée lorsque les concentrations sanguines de glucose — mais aussi d'acides gras et d'acides aminés — sont élevées, signalant ainsi l'abondance énergétique. Cette hormone favorise l'absorption cellulaire et la métabolisation du glucose en plus de favoriser l'anabolisme protéique. Dans ce contexte hyperglycémique, elle inhibe la production de glucose hépatique de même que la lipolyse (Hall, 2016; Salway, 2017).

La sécrétion d'insuline est réalisée par les cellules β du pancréas. Dans le modèle le plus simplifié, le glucose plasmatique favorise son propre import dans ces cellules par le transporteur de glucose de type 2 (GLUT-2 ou SLC2A2) en fonction de son abondance, ce qui entraîne la production d'une quantité d'ATP corrélée positivement à la glycémie. L'ATP intracellulaire agit comme ligand sur des canaux potassiques et entraîne leur fermeture. La diminution de l'export de K^+ a un effet dépolarisant sur la cellule β et entraîne l'ouverture de canaux calciques tensiodépendants, ce qui mène à l'activation de la machinerie d'exocytose de l'insuline. L'insuline est en effet accumulée dans des granules intracellulaires où elle est accompagnée du peptide C, un produit de dégradation de la proinsuline. Le peptide C y est présent en quantités équimolaires par rapport à l'insuline et n'a pas de fonction connue. Au contraire de l'insuline, le peptide C n'est pas sujet à une dégradation aussi rapide et sa concentration circulante fournit même un indice de la sécrétion insulinaire (Hall, 2016).

4.2.2. Implication des cotransporteurs cation-chlorure dans la fonction pancréatique endocrine

D'autres mécanismes peuvent également mener à la dépolarisation de la cellule β pancréatique et à la sécrétion d'insuline. Du nombre, l'efflux de Cl^- par des systèmes électrogéniques a aussi un effet dépolarisant sans intervention de l'ATP. En fait, la cellule β maintient naturellement une concentration intracellulaire élevée de Cl^- en comparaison avec d'autres types cellulaires, et les NKCC font partie des protéines membranaires responsables dans la cellule β du maintien d'une concentration intracellulaire de Cl^- bien au-delà de son potentiel d'équilibre (Best, 2005; Di Fulvio et Aguilar-Bryan, 2019). À l'opposé, il a été suggéré que les KCC contribuent à limiter l'augmentation de la concentration intracellulaire de Cl^- dans ces cellules. La composante indépendante de l'ATP dans la sécrétion de l'insuline s'explique donc par un gradient électrochimique de Cl^- favorable à son export si des voies de perméation pour cet ion s'ouvrent. Les systèmes alors impliqués sont typiquement électrogéniques (canaux chlorure de types CLC, anoctamine, VRAC et CFTR; Di Fulvio et Aguilar-Bryan, 2019), ce qui favorise une dépolarisation de la cellule β et occasionne les mêmes étapes subséquentes que dans le mécanisme canonique de sécrétion de l'insuline décrit plus haut.

Le rôle des KCC dans l'homéostasie du glucose *in vivo* n'a pas été rapporté jusqu'à maintenant. En revanche, alors que NKCC1 et NKCC2 devraient jouer des rôles très similaires à ce chapitre, des phénotypes très contrastés ont été observés chez les souris inactivées pour l'un ou l'autre de ces transporteurs.

Pour ce qui est du phénotype métabolique associé à l'inactivation de *Nkcc1*, il a été rapporté dans un même modèle pour les individus inactivés à l'état homozygote ainsi qu'à l'état HT. La souris $\text{FSyst-Nkcc1}^{\text{KO}}$ — initialement décrite par Flagella et collaborateurs en 2009 — montre une très forte diminution de masse corporelle. Elle affiche également une tolérance au glucose améliorée semblant provenir d'une augmentation de la réserve pancréatique en insuline via une expansion hyperplasique, et ce, sans augmentation de sensibilité périphérique à l'insuline. Chez ce modèle, la sécrétion d'insuline *in vivo* en réponse à une injection de glucose est accrue, tout comme la sécrétion par les îlots stimulés *ex vivo*, îlots qui renferment en fait un contenu accru en cellules β (Alshahrani et Di Fulvio, 2012). Quant à la souris $\text{FSyst-Nkcc1}^{\text{HT}}$, elle affiche un phénotype moins prononcé, mais qui inclut également une amélioration de la tolérance au glucose attribué à une

augmentation de l'expression de NKCC2 dans la cellule β pancréatique (Alshahrani et collab., 2015).

Quant à la souris $\tau\text{syst-Nkcc2}^{\text{KO}}$, elle n'est pas viable (Takahashi et collab., 2000). En revanche, la souris inactivée seulement pour l'isoforme spécifique aux îlots pancréatiques — $\text{o}\text{syst-Nkcc2a}^{\text{KO}}$, initialement décrite par Oppermann et collaborateurs en 2007 — présente un phénotype complexe d'intolérance au glucose associée à une sensibilité globale accrue à l'insuline, une augmentation de production de glucose hépatique ainsi qu'un défaut de modulation des concentrations circulantes de glucagon et d'insuline lors du jeûne. La souris $\text{o}\text{syst-Nkcc2a}^{\text{KO}}$ présente aussi une expansion hyperplasique et hypertrophique des cellules α et β pancréatiques, ce qui pourrait refléter, selon les auteurs, une stimulation accrue des unités endocrines du pancréas. Chez ce modèle, la sécrétion d'insuline *in vivo* en réponse à une injection de glucose est réduite, mais la stimulation des îlots *ex vivo* engendre une réponse sécrétrice normale (Kelly et collab., 2019).

Les phénotypes rapportés chez les souris $\text{f}\text{syst-Nkcc1}^{\text{KO}}$, $\text{f}\text{syst-Nkcc1}^{\text{HT}}$, $\tau\text{syst-Nkcc2}^{\text{KO}}$ et $\text{o}\text{syst-Nkcc2a}^{\text{KO}}$ sont non concordants, ce qui peut indiquer que les deux NKCC auraient des contributions quantitativement très différentes au transport d'ions dans les cellules pancréatiques. Plus encore, NKCC1 et NKCC2 pourraient également se localiser différemment parmi des microdomaines membranaires dans ces cellules, interagir avec des partenaires propres à chacun d'eux ou être différentiellement exprimés dans les autres structures qui régulent l'homéostasie glucidique. Il appert également que plusieurs mécanismes de contrerégulation sont en place dans ces lignées de souris comme dans les autres modèles constitutivement inactivés génétiquement (Eisener-Dorman et collab., 2009), en l'occurrence des changements ont été révélés dans l'expression d'autres membres de la famille des CCC dans le pancréas (Alshahrani et Di Fulvio, 2012; Alshahrani et collab., 2015; Kelly et collab., 2019) et possiblement dans d'autres organes clés pour le contrôle métabolique.

L'implication des KCC dans l'homéostasie du glucose n'a été rapportée jusqu'à maintenant que dans des modèles en culture. La stimulation aiguë des KCC a pour effet d'inhiber la sécrétion d'insuline dans les cellules immortalisées MIN6 d'insulinome murin, alors que l'inhibition aiguë dans les mêmes cellules a l'effet inverse (Kursan et collab., 2017). Dans les îlots pancréatiques *ex vivo*, l'inhibition aiguë des KCC a également un effet stimulant sur la sécrétion d'insuline, mais

l'effet de l'inhibition n'a pas été rapporté (Kursan et collab., 2017). Malgré tout, il n'est pas clair que KCC3 soit important pour la fonction de la cellule β . Bien que KCC3 soit exprimé dans le pancréas endocrine chez le rat (cellules α et β), l'abolition de la fonction des KCC empêche la diminution régulatrice du volume cellulaire dans les cellules α , mais pas dans les cellules β (Davies et collab., 2004).

4.3. Bioénergétique

Chaque organisme vivant peut être vu comme un système transformateur d'énergie, ouvert aux intrants comme aux extrants énergétiques, et doté d'une capacité de stockage d'énergie. Les intrants énergétiques chez les mammifères correspondent aux calories obtenues dans la diète. Les extrants énergétiques sont variés et sont en lien avec les activités de l'organisme. Le stockage d'énergie est favorisé chez l'humain et chez les rongeurs puisque, d'un point de vue évolutif, cette possibilité permet de mieux survivre et d'assurer sa descendance même face à un accès discontinu à la nourriture (Neel, 1962).

4.3.1. Intrants énergétiques

L'organisme obtient, notamment grâce au système digestif et au volet anabolique du métabolisme énergétique, l'énergie chimique contenue dans les nutriments et la transforme en une forme plus simple pour usage immédiat (phosphagènes) ou pour stockage dans des modalités appropriées au contexte physiologique (glycogène ou TAG par exemple). Toutefois, environ 35 % seulement de l'énergie tirée des substrats lipidiques et glucidiques se retrouve réinvestie dans les liaisons phosphodiester de l'ATP. L'inefficacité de certains processus et les lois de la thermodynamique font en sorte qu'environ 65 % de l'énergie est perdue sous forme de chaleur au gré de ces transformations (McArdle et collab., 2015; Hall, 2016). Les désordres malabsorptifs peuvent introduire une modulation supplémentaire du côté des intrants énergétiques. Par exemple, des défauts de fonction cellulaire, d'activité enzymatique, ou de motilité intestinale peuvent causer différents patrons de malabsorption et des déficits variables dans l'extraction de l'énergie depuis les sources alimentaires (Peretti et collab., 2005; Keller et Layer, 2014; Javed et Broer, 2019; Wang et collab., 2016).

L'apport énergétique fait l'objet d'une régulation par le système nerveux central, ce qui permet de stimuler la prise alimentaire à la hauteur des besoins de l'organisme. Cette régulation fait appel à

des populations neuronales distinctes et impliquées dans différents circuits hypothalamiques sensibles aux nutriments (Berthoud et collab., 2021). D'un côté, des neurones dits orexigènes, exprimant notamment le neuropeptide Y et la protéine nommée *agouti-related protein*, sont impliqués dans la stimulation de l'appétit. D'un autre côté, des neurones dits anorexigènes, exprimant le propeptide proopiomélanocortine, ont un effet suppresseur sur l'appétit et font partie d'une voie impliquant l'hormone α stimulante de la mélanocortine et d'autres neuropeptides (Sohn, 2015). La prise alimentaire est également influencée dans une large mesure par des mécanismes complexes incluant le système de récompense et des considérations comportementales. Une description détaillée de ces voies dépasse les objectifs de cette thèse, mais peut être retrouvée dans plusieurs revues de littératures récentes (de Araujo et collab., 2020; Décarie-Spain et Kanoski, 2021).

4.3.2. Extrants énergétiques et calorimétrie

4.3.2.1. Ventilation de la dépense énergétique

L'organisme utilise l'énergie disponible pour la réalisation de travail dans le cadre de ses opérations d'entretien, pour répondre à différents stress et éventuellement pour s'engager dans des activités plus complexes impliquant la locomotion. La dépense en énergie chez les espèces comme l'homme et la souris peut être partitionnée en un nombre variable de composantes selon les modèles adoptés. Les composantes incontournables sont le métabolisme basal, l'action dynamique spécifique des aliments, la thermorégulation et l'activité physique (Speakman, 2013).

Les trois premières composantes sont, dans une large mesure, incompressibles, c'est-à-dire qu'elles occasionnent une utilisation d'énergie inévitable même sous les conditions les plus favorables. Le métabolisme basal correspond à tout le travail chimique et mécanique que le corps doit effectuer afin de rester en vie et alerte. Une partie de ce poste de dépense énergétique inclut le maintien, via l'activation de certains muscles, d'une posture spécifiée, ainsi que toutes les fonctions vitales comme la circulation sanguine, la fonction rénale et l'état d'éveil — pour n'en nommer que quelques-unes —, mais pas la digestion (McArdle et collab., 2015). L'action dynamique spécifique des aliments (ou thermogénèse alimentaire postprandiale) est la dépense en énergie qui s'ajoute au métabolisme basal pour permettre la digestion tout en ne changeant pas l'état d'activation corporel. En effet, les processus digestifs ont un coût énergétique variable selon la nature des aliments

consommés, et celui-ci se manifeste sous forme d'une production de chaleur dite postprandiale qui n'est pas nécessairement utilisable pour le maintien de la température corporelle (Hall, 2016). Les différents mécanismes de thermorégulation correspondent à une troisième composante obligatoire de la dépense énergétique totale et permettent la stabilisation constante de la température du noyau thermique. Le maintien de la température chez les mammifères est associé à une dépense énergétique considérable à température ambiante, et des mécanismes additionnels de thermogenèse avec ou sans frisson peuvent s'activer lors d'une exposition à des températures décroissantes. À l'opposé, l'exposition à des températures supérieures à la zone de thermoneutralité ou l'engagement dans une activité physique activent des mécanismes de thermolyse ou de dissipation de chaleur énergivores (Chung et collab., 2018).

Contrairement aux portions de la dépense énergétique décrites ci-dessus, celle qui est associée à l'activité physique est hautement variable et directement reliée au comportement individuel durant la période d'intérêt. Elle correspond ultimement au coût de renouvellement des phosphagènes utilisés dans la contraction musculaire ainsi qu'au travail supplémentaire effectué par différents organes qui supportent la fonction musculaire, comme le cœur. La chaleur émanant des muscles lors d'une contraction peut contribuer à diminuer la thermogenèse dans certains contextes (Speakman, 2013). Il est parfois utile de décomposer l'activité physique totale en ses composantes ambulatoire, associée à un déplacement net, et stéréotypique, regroupant des mouvements considérés stationnaires selon des paramètres établis. L'activité stéréotypique est habituellement insignifiante chez l'humain, mais peut prendre une importance accrue dans des contextes de nervosité, chez des sujets atteints de spasticité ou de désordres psychiatriques (Maltête, 2016) et chez des espèces animales caractérisés par des patrons comportementaux innés spécifiques comme les rongeurs (Novak et collab., 2016). Bien que les deux types d'activité puissent être caractérisés par des coûts énergétiques variables, toute contraction musculaire utilise des quantités considérables d'énergie (Cabib et collab., 1985; Almundarij et collab., 2016).

Une composante supplémentaire peut être ajoutée aux catégories de dépense énergétique variables si l'on considère les processus énergivores que représentent la croissance et le développement. À différents moments de la vie, la vitesse de ces processus est toutefois changeante, notamment en fonction de la disponibilité de l'énergie (Millward et Garlick, 1976). La dépense énergétique associée aux réactions anaboliques peut aussi prendre une importance variable dans le cadre de

certaines maladies développementales ou lors de désordres de la prolifération cellulaire impliquant notamment la croissance tumorale (Friesen et collab., 2015; Neri et collab., 2019).

4.3.2.2. Quantifications énergétiques et calorimétrie directe

Tel que mentionné plus haut, les intertransformations de formes énergétiques ne sont pas parfaitement efficaces et toute énergie peut être convertie en chaleur. Pour cette raison, les quantités d'énergies sont communément exprimées en termes de capacité à réchauffer l'eau, le plus souvent en kilocalories^{ix}. La dépense énergétique peut conséquemment être estimée d'après la quantité de chaleur libérée par un organisme, grâce à une technique appelée la calorimétrie directe. Bien que cette technique soit très fiable, elle est peu utilisée puisqu'elle nécessite l'utilisation d'une enceinte restreinte pouvant poser plusieurs contraintes. Par exemple, elle nécessite éventuellement certaines corrections pour la perte de chaleur par conduction, convection, radiation ou évaporation (Battley, 1995) et elle fournit moins d'informations que d'autres techniques disponibles, notamment que la calorimétrie indirecte (McArdle et collab., 2015).

4.3.2.3. Calorimétrie indirecte

La calorimétrie indirecte est une technique qui estime la dépense énergétique d'un organisme en se basant sur ses échanges respiratoires. En effet, puisque le sang ne stocke que très peu d'oxygène, les quantités consommées de ce gaz au niveau cellulaire correspondent presque exactement aux quantités prélevées aux poumons (McArdle et collab., 2015; Hall, 2016). Il est possible, grâce à des coefficients établis empiriquement, de déduire l'énergie consommée d'après la mesure des pressions partielles en oxygène de l'air expiré versus inspiré, donc d'après le débit de captation de l'oxygène. La technique peut également incorporer une mesure de production de dioxyde de carbone de manière à raffiner le calcul de la consommation instantanée d'énergie en fournissant des renseignements sur les substrats énergétiques qui sont oxydés (McArdle et collab., 2015; Lighton, 2018).

Tel que mentionné plus haut, les lipides et les glucides ne nécessitent pas la même consommation d'oxygène pour mener à leur oxydation complète en dioxyde de carbone. De fait, le ratio molaire

^{ix} Une (1) kcal permet de réchauffer 1 kg d'eau de 1 °C et équivaut à 4,2 kJ dans le Système international d'unités (Bureau international des poids et mesures, 2019).

ou volumique^x entre le dioxyde de carbone produit et le dioxygène consommé au niveau cellulaire est un concept important en calorimétrie portant le nom de quotient respiratoire (QR). Le plus souvent, les déterminations des échanges gazeux sont faites par respirométrie à partir de l'air inspiré et expiré par un organisme entier, ce qui permet en fait de calculer en termes stricts le ratio d'échange respiratoire (RER; [Lighton, 2018](#)). Toutefois, le RER demeure une excellente estimation du QR, si bien que les deux termes sont largement utilisés de manière interchangeable à l'extérieur du domaine de la calorimétrie spécialisée.

D'après l'équation chimique de l'oxydation complète d'un substrat énergétique, il est possible de calculer la valeur théorique du QR associé à l'oxydation du substrat en question en divisant le coefficient stœchiométrique du dioxyde de carbone consommé par celui du dioxygène consommé. L'oxydation des lipides est typiquement associée à un QR de 0,7, alors que l'oxydation des glucides est associée à un QR de 1 (voir l'*Annexe 3* pour plus de détails).

En conditions physiologiques, et spécialement à l'état nourri, il est rare que l'organisme n'utilise qu'un seul nutriment ou même un seul groupe de nutriments comme carburant cellulaire. En fonction de l'intensité de l'activité métabolique, une proportion variable de lipides et de glucides alimentera les processus cellulaires ([McArdle et collab., 2015](#)). Au repos et à l'état nourri, de même que lors d'un effort correspondant à une intensité relative faible par rapport à la capacité aérobie individuelle (35 % de la consommation d'oxygène maximale), une majorité de l'énergie sera dérivée des lipides, mais inclura une contribution remarquable du glucose sanguin. Cette situation est associée à des RER faibles, légèrement supérieurs à 0,7. Lors d'un jeûne prolongé et en conditions de faible activité, il est possible que la vaste majorité de l'énergie générée soit tirée des réserves de lipides et que le RER ait une valeur de 0,7. Par contre, comme la fourniture d'énergie à partir des lipides est un processus lent et de faible débit, une intensification des activités métaboliques vers des intensités relatives moyennes ou élevées (plus de 40 % de la capacité aérobie) entraîne une mobilisation croissante des glucides pour assurer un taux de régénération de l'ATP qui soit comparable au taux de l'hydrolyse du nucléotide. Cette situation est associée à des RER élevés, se rapprochant de 1 ([McArdle et collab., 2015](#); [Poortmans et Boisseau, 2017](#)).

^x En vertu de la loi d'Avogadro-Ampère, le volume occupé par une mole de gaz est indépendant de la nature du gaz en conditions de pression et de température identiques ([Avogadro, 1811](#); [Ampère, 1814](#)).

Des valeurs de RER supérieures à 1 sont parfois mesurées empiriquement, et elles peuvent s'expliquer par trois phénomènes : une activité anabolique significative, un métabolisme majoritairement anaérobie (sur de très courtes durées) ou une hyperventilation visant le rétablissement acidobasique corporel lors d'un effort de haute intensité ou dans la période de récupération subséquente (Issekutz et Rodahl, 1961). Dans ce dernier cas précis, le dioxyde de carbone provenant du système tampon bicarbonate s'ajoute au dioxyde de carbone provenant de l'oxydation de substrats énergétiques, ce qui empêche l'identification par calorimétrie indirecte des types de substrats énergétiques alimentant un effort d'intensité maximale. En d'autres termes, du dioxyde de carbone libéré depuis le compartiment sanguin contamine la mesure de RER et révèle la différence fondamentale entre le RER et le QR.

En plus du QR et du RER, d'autres coefficients utilisés en calorimétrie ont été obtenus empiriquement durant le perfectionnement des techniques et permettent de raffiner l'estimation de la dépense énergétique en fonction de la proportion précise de lipides et de glucides qui fournissent l'énergie à chaque occurrence de l'échantillonnage de gaz respiratoires. En outre, il a été établi que lorsque le RER vaut 1, chaque litre de dioxygène consommé est associé à une dépense de 5,05 kcal. Si le RER est à sa valeur minimale, c'est-à-dire autour de 0,7, 1 litre de dioxygène est consommé à l'occasion d'une dépense de 4,69 kcal (Weir, 1949; Lighton, 2018).

La calorimétrie indirecte présente des avantages pratiques : elle est facile à installer et à réaliser, peu coûteuse et ne nécessite pas de corrections pour les pertes de chaleur. Il demeure toutefois que cette technique fournit une approximation de la dépense énergétique réelle (Battley, 1995). Son application à des mesures ponctuelles sur de brèves périodes peut donc être imprécise. Toutefois, lors d'une activité en régime stable et sur au moins quelques dizaines de minutes, elle fournit des estimations valides et fiables. Sans mesures concomitantes d'excrétion corporelle d'azote, il est à noter que la calorimétrie indirecte fait abstraction de la contribution des protéines à la génération d'énergie (Weir, 1949; Lighton, 2018). En conditions normales, et surtout chez un individu bien nourri si aucun effort prolongé n'est effectué, l'oxydation des protéines est considérée comme négligeable, mais peut toutefois être prise en compte par certains algorithmes (Lighton, 2018). Puisque la calorimétrie indirecte se base notamment sur la consommation d'oxygène, elle ne peut pas tenir compte de la contribution des mécanismes anaérobies à la génération d'énergie. Toutefois, les réactions anaérobies sont sollicitées appréciablement surtout lors d'un effort de haute intensité

ou à l'initiation d'un effort d'intensité inférieure ([McArdle et collab., 2015](#)). Il est alors possible d'ajuster le protocole de mesure calorimétrique de manière à limiter l'interférence posée par le métabolisme anaérobie en allongeant la période de mesure ou en incluant la phase de récupération après un effort, par exemple.

Objectifs et méthodologie

Comme il l'a été abordé tout au long de l'*Introduction*, la protéine de transport KCC3 est exprimée à la membrane cytoplasmique de nombreux types cellulaires jouant des rôles importants dans le développement et la fonction neurologique, la régulation hydrosodée et cardiovasculaire ainsi que dans le métabolisme énergétique. Chez les individus avec une perte de fonction homozygote dans *KCC3* atteints de PNSMH, certaines anomalies concernant les dimensions corporelles et la croissance accompagnent le lourd tableau neurologique. Le portrait métabolique, cardiovasculaire et rénal de ces patients n'a toutefois jamais été caractérisé dans le détail.

Chez l'homme comme chez les modèles animaux, le rôle physiologique précis de KCC3 à l'extérieur du système nerveux n'a été décrit que de manière parcellaire jusqu'à maintenant. Des évidences indirectes laissent présager que KCC3 pourrait être nécessaire pour la fonction d'organes comme le rein, les vaisseaux sanguins, le muscle, le tissu adipeux et d'autres structures impliquées dans la régulation neuroendocrinienne de l'homéostasie énergétique, cardiovasculaire et hydrominérale. En effet, des protéines de transport apparentées à KCC3 du point de vue homologue ou fonctionnel ont été liées de multiples façons à la fonction de ces structures, tel qu'exposé dans la section *Introduction*. Nous posons l'hypothèse que des mécanismes périphériques contribuent de manière substantielle à la physiopathologie de la PNSMH et des anomalies phénotypiques observées chez les modèles animaux inactivés pour *Kcc3* (à l'exception des modèles exclusivement neurospécifiques).

Le but de ce travail était d'abord de caractériser les traits extraneurologiques, plus particulièrement ceux en lien avec la physiologie cardiométabolique et rénale, dans un modèle murin constitutivement inactivé pour *Kcc3* modélisant la PNSMH. Nous avons utilisé différentes approches observationnelles et fonctionnelles *in vivo* et *ex vivo*, et les avons complétées par des analyses histologiques, biochimiques et moléculaires afin de caractériser en détail la physiologie de ce modèle à l'état de base et en réponse à différents stress environnementaux.

Une considération cruciale lors l'élaboration de la méthodologie des travaux a été de permettre une acclimatation complète des animaux aux conditions expérimentales. En effet, avec l'expérience et au fil de la collecte des données, nous avons fréquemment observé que les mesures ponctuelles sur

une brève fenêtre de temps (ou sans répétition sur différentes journées) pouvaient complètement différer des mesures effectuées à plus long terme, et que les différences entre génotypes pouvaient même différer complètement après acclimatation. Ainsi, sauf lors de l'étude spécifique de certaines réponses aiguës, les données expérimentales ont été obtenues après des périodes prolongées d'acclimatation. Dans la section *Discussion*, la question de l'acclimatation dans les études citées de la littérature sera abordée. Quelques points techniques sont abordés en *Introduction* à la section 3.3 et dans les *Annexes 1* et *3*, mais le détail des méthodes que nous avons utilisées se trouve dans les sous-sections *Material and methods* des différents articles insérés dans la section *Résultats*.

Résultats

Article 1 : Ablation of potassium-chloride cotransporter type 3 (*Kcc3*) in mouse causes multiple cardiovascular defects and isosmotic polyuria

GARNEAU, A. P., MARCOUX, A. A., NOËL, M., FRENETTE-COTTON, R., DROLET, M. C., COUET, J., LARIVIÈRE, R. et ISENRING P. (2016). Ablation of potassium-chloride cotransporter type 3 (*Kcc3*) in mouse causes multiple cardiovascular defects and isosmotic polyuria. *PLOS One*, 11(5), e0154398.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154398>

Contributions des auteurs :

Conception des expériences : APG, MN, MCD, JC, RL & PI

Réalisation des expériences : APG, AAM, MN, RFC & MCD

Analyse des résultats : APG, MN, MCD, JC, RL & PI

Obtention de financement et de matériel : JC, RL & PI

Rédaction du manuscrit : APG & PI

Révision critique du manuscrit : AAM, MN, RFC, MCD & JC

Relecture et approbation du manuscrit : APG, AAM, MN, RFC, MCD, JC, RL & PI

Ablation of potassium-chloride cotransporter type 3 (*Kcc3*) in mouse causes multiple cardiovascular defects and isosmotic polyuria

Alexandre P. Garneau^{1,3}, Andrée-Anne Marcoux^{1,3}, Micheline Noël^{1,3}, Rachelle Frenette-Cotton^{1,3}, Marie-Claude Drolet^{2,3}, Jacques Couet^{2,3}, Richard Larivière^{1,3}, Paul Isenring^{1,3*}

¹Nephrology Research Group, Centre de recherche L'Hôtel-Dieu de Québec, Centre hospitalier universitaire de Québec, Québec City, Canada

²Valvulopathy Research Group, Centre de recherche de l'Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec, Québec City, Canada

³Department of Medicine, Université Laval, Québec City, Canada

* Corresponding author:

E-mail: paul.isenring@crhdq.ulaval.ca (PI)

Abstract

Inactivation of *Kcc3* in a mixed 129/Sv×C57BL/6 mouse background has been previously found to increase systemic blood pressure (BP) through presumed neurogenic mechanisms. Yet, while this background is generally not considered ideal to investigate the cardiovascular system, KCC3 is also expressed in the arterial wall and proximal nephron. In the current study, the effects of *Kcc3* ablation was investigated in a pure rather than mixed C57BL/6J background under regular- and high-salt diets to determine whether they could be mediated through vasculogenic and nephrogenic mechanisms. Aortas were also assessed for reactivity to pharmacological agents while isolated from the influence of sympathetic ganglia. This approach led to the identification of unforeseen abnormalities such as lower pulse pressure, heart rate, aortic reactivity and aortic wall thickness, but higher diastolic BP, left ventricular mass and urinary output in the absence of increased catecholamine levels. Salt loading also led systolic BP to be higher, but to no further changes in hemodynamic parameters. Importantly, aortic vascular smooth muscle cells and cardiomyocytes were both found to express KCC3 abundantly in heterozygous mice. Hence, *Kcc3* inactivation in our model caused systemic vascular resistance and ventricular mass to increase while preventing extracellular fluid volume to accumulate. Given that it also affected the physiological properties of aortas *in vitro*, vasculogenic mechanisms could therefore account for a number of the hemodynamic abnormalities observed.

Introduction

The cation-Cl⁻ cotransporter (CCC) family (or *Slc12a* family) is comprised of nine members that are highly homologous to each other and that play important physiological roles. It is comprised of four closely related phylogenetic branches [1]. One of these branches includes the Na⁺-coupled cotransporters that promote net Cl⁻ entry into cells, i.e., of the Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransporters (NKCC1 and NKCC2) and the Na⁺-Cl⁻ cotransporter (NCC). Another branch includes the Na⁺-independent cotransporters that promote net Cl⁻ exit from cells, i.e., of the K⁺-Cl⁻ cotransporters (KCC1, KCC2, KCC3 and KCC4).

There is strong evidence to suggest that several CCC family members are involved in blood pressure (BP) regulation. This is the case for NKCC2 [2-4] and NCC [3-7] that both play a role in extracellular fluid volume (ECFV) maintenance. In particular, these carriers have been genetically

linked to abnormal BP in mouse and human through mutations or polymorphisms. This is also the case for NKCC1, but the mechanisms involved differ. Indeed, inactivation of NKCC1 in mouse causes systemic hypotension [8] and impaired cardiac contractility [9] while arterial blood vessels isolated from rodents exhibit lower responsiveness to vasopressor agents under conditions where NKCC1 activity is reduced [8,10,11]. Interestingly, mutations or polymorphisms in with-no-lysine kinases (WNKs) and in STE20/SPS1-related proline/alanine-rich kinase (SPAK), both of which regulate the activity of many CCCs, have also been linked to abnormal BP [12-17].

Until recently, CCCs involved in BP regulation have included the Na⁺-coupled cotransporters exclusively. There is now evidence to suggest that the Na⁺-independent cotransporters are also involved. In three different studies, for instance, mice inactivated for *Kcc3* (or *Slc12a6*), as in the *Kcc3*^{-/-}_{129/Sv×C57BL/6} model, have been found to exhibit higher mean arterial pressure (MAP) than wild-type (WT) littermates [18-20]. In one of these studies, interestingly, Rust et al. [20] have also found that *Kcc3*^{-/-}_{129/Sv×C57BL/6} mice exhibited higher levels of urinary catecholamines, greater BP sensitivity to pharmacological inhibition by cholinergic or adrenergic receptor blockers, and a variety of neurological abnormalities. Accordingly, they concluded that high BP developed in the mutant animals through neurogenic mechanisms. Of notice, *Kcc3* has also been linked to corpus callosum agenesis and progressive sensorimotor neuropathy in human [21].

It is noteworthy that in the previously exploited 129/Sv×C57BL/6 background, *Kcc3*^{-/-} inactivation was also characterized by hypertrophied, Cl⁻-rich saphenous arterial vascular smooth muscle cells (VSMCs) and by increased plasma aldosterone levels in the absence of renin suppression [20]. Hence, other mechanisms in the development of high BP could have been at cause, such as suppressed K⁺-Cl⁻ cotransport in VSMCs, implying that KCC3 and NKCC1 would play reciprocal functional roles in this cell type, consistent with their reciprocal transport roles. To this effect, a number of CCCs can affect cell growth, *Kcc3* is expressed in VSMCs [20,22] and NKCC1 inhibition in isolated arterial vessels decreases vessel wall Cl⁻ content [23]. It should be noted, lastly, that the effect of dietary challenges in *Kcc3*^{-/-}_{129/Sv×C57BL/6} mice was not reported, nor was the effect of *Kcc3* inactivation in the genetic backgrounds typically used to study cardiovascular or renal function in animal models.

In this study, we have analyzed a murine model of gene disruption in a purified C57BL/6J strain to revisit the role of KCC3 in the cardiovascular tissue. Compared to WT littermates, *Kcc3*^{-/-} mice exhibited higher diastolic BP (DBP), lower pulse pressure (PP), decreased aortic reactivity to adrenergic stimulation, enlarged left ventricular mass and isosmotic polyuria, but normal levels of circulating catecholamines. Taken together, our findings point towards the involvement of vasculogenic mechanisms in the development of hemodynamic disorders due to *Kcc3* inactivation and a potential role for K⁺-Cl⁻ cotransport in cardiac growth.

Material and Methods

Source of supplies or equipment

- Mice:
 - *Kcc3*^{+/-}_{129/SvEvBrdxC57BL/6J}: Mutant Mouse Regional Resource Centers, University of Carolina, Chapel Hill, NC.
 - *Kcc3*^{+/+}_{C57BL/6J}: The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA.
- Metabolic cages: Nalgene, Missisauga, ON, Canada.
- Echocardiographic system: Philips Medical Imaging, Andover, MA, USA.
- BP-series: Visitech Systems, Inc., Apex, NC, USA.
- Aortic reactivity:
 - Tungsten wires and fluid chambers: Radnoti, LLC, Monrovia, CA (catalog numbers: 158816-005T and 158817-005T).
 - Reagents: Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA.
- Hematological parameters: VetScan HM5 hardware, Abaxis, Inc., Union City, CA, USA.
- Antibody-based kits for hormone measurements:
 - Aldosterone: CUSABIO[®], Wuhan, China.
 - Epinephrine and renin: Uscn Life Science, Inc., Wuhan, China.
 - Norepinephrine: BMassay, Beijing, China.

- Cortisol: Cobas[®]/Roche Molecular Diagnostics, Pleasanton, USA.
- Superfrost[®] Plus glass slides: VWR International, Radnor, PA.
- Quantitative PCR:
 - RNeasy protocol kit: Qiagen, Venlo, Limbourg, Netherlands.
 - cDNA synthesis: SuperScript[™] III First-Strand Synthesis System kit for RT-PCR: Invitrogen; Life Technologies, Carlsbad, CA, USA.
 - PCR: Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG kit: Invitrogen; Life Technologies, Carlsbad, CA, USA.
 - cDNA synthesis and PCR: qScript[™] cDNA SuperMix and PerfeCTa[®] SYBR[®] Green FastMix[®] Reaction Mixes, VWR International, Radnor, PA, USA.
 - Thermocycler: Stratagene Mx3005P, Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA.
 - Analysis: Stratagene MxPro software, Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA.

Animals

All studies were approved by Laval University under animal protocol 11-029. Animals were housed at the L'Hôtel-Dieu de Québec animal facility. *Kcc3*^{-/-}_{C57BL/6J} mice were generated by breeding *Kcc3*^{+/-}_{129/SvEvBrd×C57BL/6J} mice in the C57BL/6J background. The mutant allele contains a gene trap called Gt(IRESBetageo)105Lex that prevents gene translation beyond exon 2 and that codes for β-galactosidase. In each experiment, animals used were males, age-matched (14 to 26 weeks old) and from the same generation (F₅ to F₈). When necessary, anesthesia was induced through isoflurane inhalation. Euthanasia was carried out through cervical dislocation or cardiac exsanguination.

Hemodynamic measurements

BP and heart rate were measured by tail cuff using the BP-2000 Series II hardware system. Cuffs were 6.35 mm in diameter and platforms set at 34 °C. For each experiment, 27 measurements per mouse were obtained every day (unless mentioned otherwise) between 13:00 and 15:00 in appropriately-sized holders during 10 days. The following values were not included in the analyses: those obtained during an acclimation period (measurements of the first 6 days and first 8 measurements of the 4 remaining days) as well as outliers (defined as values $[V] < [Q_1 - 1.5 \times$

IQR] or $> [Q_3 + 1.5 \times \text{IQR}]$, where Q stands for quartile and IQR for interquartile range). MAP and PP were calculated from systolic BP (SBP) and DBP.

In some experiments, mice were fed a high-salt diet in metabolic cages to determine whether the effect of *Kcc3* inactivation could be amplified through changes in ECFV. A schematic representation of the protocol used for Na^+ loading is described in Fig 1. Briefly, mice were subjected to 7 days of regular diet (0.26% NaCl, ~ 10 mg/d) followed by 5 days of high-salt diet (8% NaCl, ~ 300 mg/d) while chow and water intake, diuresis, feces output, BP, heart rate and biochemical parameters were measured at different time points.

Aortic reactivity

Isolated thoracic aortas freed of adipose tissue were maintained in ice-cold 25 mmol L⁻¹ HEPES-buffered Krebs-Henseleit solution and cut transversally into 2-mm segments (4 segments per aorta). Subsequently, each of the isolated segments was threaded through its lumen by two 0.127-mm tungsten wires and placed into a chamber filled with 95% O₂/5% CO₂-aerated bicarbonate-buffered Krebs-Henseleit solution (called regular buffer hereafter) warmed at 38 °C. One of the wires was used to immobilize the aortic segment and the other to measure isometric force development through a height-adjustable transducer.

Once mounted, each aortic segment was loaded to 9.8 mN over 45 min, primed twice with 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ phenylephrine hydrochloride (PhE) and washed four times over 15 min in regular buffer until the preload contractile state was recovered. Subsequently, dose-response curves were generated by exposing aortic segments sequentially to cumulative concentrations of PhE, carbamoylcholine chloride (CCh) or sodium nitroprusside (SNP). Before assessing the effects of CCh and SNP, however, aortic segments were stably precontracted to ~ 12 mN using ~ 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ PhE (each segment receiving a different dose depending on its initial contractile response) and after each contraction or decontraction assay, they were washed four times over 15 min in regular buffer. In one series of experiments, the effect of 1 mmol L⁻¹ furosemide on precontracted aortic segments was also examined. This drug is a loop diuretic that inhibits both the NKCCs and KCCs *in vitro* [1,8,10,11,24].

Echocardiography

A motion mode, two-dimensional and Doppler echocardiogram was performed under anesthesia using a Sonos 5500 echographic system equipped with a 12 MHz probe. Left ventricular dimensions, wall thickness, ejection fraction and cardiac output were assessed as previously reported [25,26].

Sample preparation

Tissues and fluids were collected under anesthesia or in awakened mice. They included urine collected through different means, whole blood obtained by cardiac exsanguination, hearts, thoracic aortas, gonadal adipose depots and adrenal glands.

Blood, serum, plasma and urine measurements

Hematological parameters were obtained in whole blood with the VetScan HM5 hardware. Urea, creatinine, electrolyte and bicarbonate concentrations were measured in serum or urine through standard procedures. Aldosterone, epinephrine, norepinephrine, renin and cortisol concentrations were measured in plasma or urine through commercially available antibody-based kits as per the manufacturers' specifications.

Microscopic studies

Five- to 15- μm tissue sections mounted onto Superfrost® Plus glass slides and embedded in paraffin were analyzed by haematoxylin-eosin staining. In certain experiments, they were pre-embedded in Optimal Cutting Temperature compound (OCT) for β -galactosidase activity assays through the following incubation steps: 1) 5 min in 0.1 mol L⁻¹ PBS, 2 mmol L⁻¹ MgCl₂ and 5 mmol L⁻¹ EGTA (called solution L), 2) 5 min in 4% paraformaldehyde and 0.2% glutaraldehyde diluted in solution L, 3) 15 min in solution L to remove the fixating agents, 4) 18 h in 0.01% Na-deoxycholate, 0.02% NP-40, 5 mmol L⁻¹ K-ferricyanide, 5 mmol L⁻¹ K-ferrocyanide, 2 mmol L⁻¹ MgCl₂ and 0.1 mmol L⁻¹ PBS (called permeabilization solution), 5) 16 h in 0.1% X-Gal diluted in permeabilization solution, 6) 15 min in solution L, 7) 2 min in water to rinse-off solution L, 8) 5 min in nuclear fast red solution and 9) several minutes in dehydrating solutions. All slides were mounted with coverslips once the incubation steps were completed.

Histomorphometric analyses of thoracic aortas were also carried out by measuring wall thickness on transversal sections at 8 equidistant radial points. Data were calculated as means of 16 lengths per mice from 2 contiguous aortic sections among 7-8 mice per group.

Quantitative PCR (qPCR)

Total RNA purified from homogenized tissues was amplified through qPCR using SYBR[®] Green and gene-specific primers (see Table 1). N-fold changes in aortic gene expression were calculated as relative copy numbers using the house keeping gene hypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transferase for normalization. N-fold changes in cardiac gene expression was calculated according to the $-2\Delta\Delta C_t$ method as previously reported using the house keeping gene cyclophilin A for normalization [27].

Wire hang test

A number of studies were carried out to determine how allele expression in the C57BL/6J background compared with allele expression in the genetic backgrounds used in previous studies. They included the wire hang test to assess balance and prehensile strength. For this procedure, mice were placed onto a 10-cm square grid that was flipped upside down 50 cm over a cushioned surface and time to fall off the grid was measured.

Statistics

Values are given as mean \pm SEM using n to indicate the number of animals or specimens. Data were compared using parametric as well as non-parametric tests depending on sample size and distribution type. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

Results

Hemodynamic parameters

To determine whether BP in the pure $Kcc3^{-/-}$ C57BL/6J mouse model was elevated and salt-sensitive as in many models of systemic hypertension, hemodynamic measurements were obtained by tail-cuff sphygmomanometry over several days under regular- and high-salt diets. This method was preferred over radiotelemetric measurements to prevent mutant mice from developing excessive nervousness following catheter implantation. Data are shown in Fig 2 as differences in hemodynamic parameters relative to WT littermates.

Under a regular-salt diet (panel A), it is seen that MAP and DBP in *Kcc3*^{-/-} mice are significantly higher than in WT littermates while SBP are similar and PP lower. These results suggest that systemic vascular resistance as well as aortic distensibility are elevated in *Kcc3*^{-/-} mice and, accordingly, that resistive and conductive vessels react differently to *Kcc3* inactivation. In panel A, it is also seen that heart rate is significantly lower, a finding that had not been reported yet.

During a 5-day high-salt diet (panel B), differences in BP between genotypes are no longer the same. Indeed, SBP and PP in *Kcc3*^{-/-} mice are ~12 mmHg higher than in WT littermates while MAP and DBP are similar. These results suggest once again that resistive and conductive vessels exhibit different behaviors in response to *Kcc3* inactivation.

Characterization of isolated thoracic aortas

To determine whether lower PP in *Kcc3*^{-/-} mice was accompanied by abnormalities in conductive vessels and whether vasculogenic mechanisms could be at cause, thoracic aortas were isolated from the animals and characterized through a combination of functional, histological and expression studies while no longer under the influence of sympathetic ganglia. Results are summarized in Figs 3 and 4.

Looking first at the functional data (Fig 3), one can observe that thoracic aortas from *Kcc3*^{-/-} mice are less reactive to phenylephrine hydrochloride (PhE) than those of *Kcc3*^{+/+} littermates (panel A, gray and black circles, respectively). At saturating concentrations of PhE, the difference in force development is more than 30%. One can also observe that aortas from *Kcc3*^{-/-} mice are less sensitive to PhE in the presence of furosemide (panel B), a drug that inhibits the activity of NKCC1 and KCC3, but equally sensitive to cholinergic or nitric oxide stimulation (panels C and D). Taken together, these results indicate that decreased reactivity to adrenergic stimulation could be due to lower levels of cation-Cl⁻ cotransport in the vascular wall, but not to the absence of *Kcc3* in the endothelium or to NO-dependent mechanisms.

Looking next at the structural and expression data (Fig 4), aortic walls of *Kcc3*^{-/-} mice (panels A and B) are seen to be thinner than those of *Kcc3*^{+/+} (panels C and D) but to appear otherwise normal. Based on histomorphometric analyses, the difference in thickness was 13% ($p = 0.0123$). The mutant allele is also seen to express β -galactosidase at high levels in aortic VSMCs (panels E and

F). Based on qPCR studies, lastly, *Nkcc1* expression also tended to be downregulated in *Kcc3*^{-/-} thoracic aortas ($n = 2$, data not shown). These results confirm that WT C57BL/6J mice express *Kcc3* and *Nkcc1* in the medial layer of their thoracic aorta where the two transporters would thus be functionally linked.

Characterization of the heart

Phenotyping studies of the heart were carried out through a combination of approaches to determine whether changes in myocardial function could account for some of the observed hemodynamic abnormalities. They are presented in Fig 5 and Table 3.

Starting with Fig 5, one can observe that the heart of *Kcc3*^{-/-} mice (panels A and C) is enlarged macroscopically compared to WT littermates (panels B and D) while cardiac chamber size, tissue organization and cell morphology are similar between genotypes (panels C to F). One can also observe that cardiomyocytes from *Kcc3*^{+/-} mice express β -galactosidase at high levels (panel G) and that cardiomyocytes from *Kcc3*^{-/-} mice exhibit higher B-type natriuretic peptide (BNP)/ α -myosin heavy chain (MHC) ratios [27] than WT littermates (panel H; fold difference was 2.4). These results suggest that cardiac mass increased through hypertrophic changes while *Kcc3* is no longer expressed in this tissue.

Continuing with Table 3, it is seen that isolated hearts are heavier in *Kcc3*^{-/-} (section A) based on absolute and normalized weight measurements (6% and 30% heavier, respectively). It is also seen that hearts in *Kcc3*^{-/-} are hypertrophied (section B) based on echocardiographic measurements, i.e., left ventricle during diastole is increased in size with larger chamber diameter (8% difference compared to WT littermates) and higher indexed left ventricular mass (25% difference). In section B, otherwise, ejection fraction, stroke volume and cardiac output are all within normal limits.

Renal function

In the renal epithelium, *Kcc3* is expressed almost exclusively in the proximal tubule [28]. Renal function as well as water and electrolyte balance were thus assessed to determine the effect of *Kcc3* inactivation in this nephron segment specifically and on glomerular filtration secondarily. Data are shown in Table 4. As can be observed, no differences are seen in creatinine, urea, Na⁺ and H⁺ serum concentrations (section A). However, *Kcc3* inactivation is associated with higher water

intake and hourly diuresis, but no difference in urinary osmolality or electrolyte concentration (sections B and C). Of notice, the difference in diuresis is almost twice the difference in water intake.

Circulating factors involved in BP control

Measurements of plasma or urine aldosterone, catecholamines, cortisol and renin levels were obtained under a regular diet to obtain further insight into the mechanisms of DBP elevation and cardiac hypertrophy. As shown in Fig 6, no differences are observed between $Kcc3^{-/-}$ and $Kcc3^{+/+}$ mice (panel A). Interestingly, $Kcc3$ is detected in all four layers of the adrenal gland (panels B and C), but is more abundant in the medulla.

Body measurements and lipid profile

In addition to the cardiovascular abnormalities objectivized, it was apparent that $Kcc3$ inactivation was also associated with lower body weight and substantial leanness at adult age. Additional measurements were thus carried out to quantify these other abnormalities more precisely and determine whether lower amounts of chow intake could have been at cause. They are shown in Fig 7 (panels A to C) and Table 5. Important differences are indeed observed in a number of parameters such as normalized gonadal depot weight and maximal weight based on growth curves (respectively 3.2- and 1.5-fold lower in $Kcc3^{-/-}$ mice compared to $Kcc3^{+/+}$ mice). Interestingly, however, chow intake is seen to be 1.7-fold higher in the mutant animals while serum cholesterol levels are seen to be lower.

Neurologic assessment

To determine how allele expression in the genetic background exploited for this study compared with allele expression in the genetic backgrounds exploited for previous studies, our $Kcc3^{-/-}$ mice were subjected to basic neurologic tests. As reported by other investigators and illustrated in Fig 8, the gait was characterized by dragging of the hindlimbs and tail suspension caused claspings of both the forelimbs and hindlimbs (see panel A where $Kcc3^{-/-}$ mouse is on the left and $Kcc3^{+/+}$ mouse is on the right). Motor abnormalities also appeared to compare with those observed in previous studies based on the wire hang test (panels B and C).

Discussion

In this work, we have exploited a background-purified C57BL/6J mouse line to gain further insight regarding the role of KCC3 in the cardiovascular tissue and in the proximal nephron. As in other models of *Kcc3* inactivation [18-20], our model exhibited elevated MAP and several neurologic abnormalities. However, MAP was elevated mainly as a result of high DBP and this trait was also accompanied by isosmotic polyuria, cardiac hypertrophy and lower sensitivity of denervated aortas to PhE.

Although *Kcc3*^{-/-} mice were found to exhibit high MAP in a previous study, the effect of adrenergic agents on third generation saphenous arteries isolated from these animals was the same compared to WT mice, a finding that could be seen as inconsistent with a role for KCC3 in resistive vessels [20]. Given, however, that DBP values were not reported thereupon, one cannot exclude that VSMC tone was altered in precapillary arterioles. In the previous study, moreover, *Kcc3* inactivation also led saphenous arterial VSMCs to exhibit higher Cl⁻ concentrations.

It is noteworthy that in our own mouse model, SBP was virtually unaffected compared to WT littermates and that the aortic wall was both thinner and less sensitive to PhE. Given that the aortas were characterized in vitro while denervated, it is tempting to postulate that these abnormalities resulted from *Kcc3* inactivation in the vessel wall. Our findings also suggest that the aortas of *Kcc3*^{-/-}_{129/Sv×C57BL/6} mice were more compliant than those of WT littermates although it was not possible to confirm this possibility further. In small rodents, unfortunately, pulse wave velocity measurements along the arterial tree are currently very challenging and not always easy to interpret.

It might appear paradoxical that resistive and conductive vessels would react differently to a given intervention or stimulus. Yet, this was shown to be the case in the rabbit pulmonary circulation where the effect of hypoxia on vessel tone was found to vary as a function of the VSMC subtypes present [29,30]. It was also shown to be the case in the cat cerebral circulation where pial arteries were found to dilate in response to norepinephrine [31]. Regarding our *Kcc3*^{-/-} mice more specifically, differences in the contractile responses of VSMCs along the arterial tree could be due to differences in the population of coexpressed ion transport systems.

If the absence of *Kcc3* in VSMCs caused DBP to increase and PhE-induced aortic contraction to decrease, what mechanisms could be involved? In animal models of *Kcc2* inactivation, it has been proposed that electroneutral accumulation of Cl^- in neurons predisposes to epilepsy by decreasing γ -aminobutyric acid receptor-mediated inward Cl^- currents secondarily [32]. Similar mechanisms could thus be at play in resistive vessels where inward Cl^- currents would also be expected to decrease in response to higher Cl^- concentrations associated with *Kcc3* inactivation [20]. Were K^+ currents of greater amplitude than Cl^- currents in the vascular wall of conductive vessels, the absence of KCC3 could then exert opposite effects on VSMC tone. Currently, very little is known regarding the ion transport properties of VSMCs in large vessels.

In our study, the effect of *Kcc3* inactivation on DBP was robust, but not very strong. However, it was also associated with isosmotic polyuria that was not fully compensated for based on the amount of water ingested. Hence, some degree of volume contraction associated with *Kcc3* inactivation in the basolateral membrane of proximal nephrons could have prevented BP from increasing to higher levels [28]. Although aldosterone levels were not increased under a regular-salt diet, KCC3 was also found to be normally expressed in all layers of the adrenal gland (see Fig 6), implying that it could therefore play a role in hormonal synthesis or secretion. Downregulation of *Nkcc1* expression levels in a number of *Kcc3*^{-/-} tissues, as could be the case based on our preliminary qPCR studies, might have also blunted the increase in BP.

Our model of *Kcc3* inactivation was remarkable compared to the other models for exhibiting a slower heart rate and a 30%-increase in cardiac muscle mass due to hypertrophic changes. Both these phenotypic traits could have developed in response to chronically elevated DBP or neurogenic mechanisms. Another possibility, however, is that they could have also developed from inactivation of *Kcc3* in myocardial cells. This possibility is supported by the observations that an increase in *Nkcc1* activity, under which circumstances intracellular K^+ and Cl^- concentrations are also higher, is often associated with higher rates of cell proliferation or growth *in vitro* [24,33,34]. A decrease in KCC3 activity would thus lead to similar responses.

Accessory findings in this work were that *Kcc3*^{-/-} mice exhibited lower weight at adult age and decreased fat deposition while chow intake was increased. They suggest that KCC3 could play a role in energy allocation as well as in the development of obesity or metabolic dysfunction leading

to cardiovascular disorders. In particular, it would be of interest to determine whether energy expenditure is greater in *Kcc3*^{-/-} mice than in WT mice and whether neuronal, hormonal or a combination of mechanisms are involved.

Although differences were identified between our *Kcc3*^{-/-}_{C57BL/6J} and previously characterized *Kcc3*^{-/-}_{129/Sv×C57BL/6} mice, it remains uncertain to what extent phenotypes actually diverge. First, more subtle defects in one strain might have escaped detection. Second, certain defects might not have been reported or looked for in *Kcc3*^{-/-}_{129/Sv×C57BL/6} mice. Third, the experiments carried out to characterize each strain were not the same. For instance, Rust et al. [20] used isolated saphenous arteries to study the contractile properties of arterial vessels while we used thoracic aortas.

In conclusion, we have found that *Kcc3* inactivation in VSMCs could be responsible for certain of the hemodynamic abnormalities observed in *Kcc3*^{-/-} mice and that it could exert differential effects in conductive and resistive vessels. We have also found that *Kcc3* was naturally expressed in the mouse heart and that its inactivation in the C57BL/6J background led to cardiac hypertrophy and negative chronotropism. Cl⁻ accumulation in the vessel wall and in the heart could thus play important pathogenic roles, but further investigations are required to confirm this hypothesis and understand the mechanisms involved. Our studies also highlight the importance of KCC3 in solute reabsorption by the proximal nephron.

Tables and figures

Table 1. Oligonucleotides used for qPCR studies.

Genes	Sense	Primers
A) Aorta		
– <i>Hprt</i>	forward	TGCTCGAGATGTCATGAAGG
	reverse	AATGTAATCCAGGTCAGC
– <i>Slc12a2</i> (NKCC1)	forward	AGGTTCTCCAAACTCACGGCCTG
	reverse	GACCAAGTCCAGCAGCCTGCATC
B) Heart		
– <i>Nppa</i> (ANP)	forward & reverse	Cat. no.: QT00366170
– <i>Nppb</i> (BNP)	forward & reverse	Cat. no.: QT00183225
– <i>Ppia</i> (CycA)	forward & reverse	Cat. no.: QT00177394
– <i>Coll1a1</i> (proCol1a1)	forward & reverse	Cat. no.: QT00370622
– <i>Col3a1</i> (proCol3a1)	forward & reverse	Cat. no.: QT01083537
– Myh6 (α -MHC)	forward & reverse	Cat. no.: QT00190267
– Myh7 (β -MHC)	forward & reverse	Cat. no.: QT00189504

Sequences are written 5' to 3'. Oligonucleotides used for amplification of heart genes were purchased from Qiagen. ANP, atrial natriuretic peptide; BNP, B-type natriuretic factor; Cat. no., catalogue number; CycA, cyclophilin A; *Hprt*, hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase.

Table 2. Hemodynamic parameters

Parameters	<i>Kcc3</i>^{-/-}	<i>Kcc3</i>^{+/+}	<i>p</i>
Systolic blood pressure (mmHg)	119.2 ± 0.8	119.4 ± 2.0	0.49
Mean arterial pressure (mmHg)	96.1 ± 2.4	88.0 ± 1.7	<0.05 †
Diastolic blood pressure (mmHg)	83.7 ± 2.9	72.4 ± 1.5	<0.05 †
Pulse pressure (mmHg)	37.4 ± 2.4	46.9 ± 1.0	<0.05 †
Heart rate (min ⁻¹)	604 ± 11	666 ± 6	<0.05 †

Data are expressed as means ± SEM (*n* = 4). † indicates that values in a row are significantly different statistically between each other based on a Wilcoxon rank-sum test.

Table 3. Cardiac function

Parameter	<i>Kcc3</i> ^{-/-}	<i>Kcc3</i> ^{+/+}	<i>p</i>
A) Cardiac weight	(<i>n</i> = 29)	(<i>n</i> = 32)	
– Absolute (mg)	149.1 ± 2.7	141.1 ± 2.9	0.0491 *
– Relative to body weight (%)	0.510 ± 0.007	0.391 ± 0.010	< 10 ⁻¹³ *
B) Echocardiographic parameters	(<i>n</i> = 8)	(<i>n</i> = 8)	
– End-diastolic diameter (mm)	4.18 ± 0.05	3.85 ± 0.05	0.0182 †
– End-systolic diameter (mm)	2.32 ± 0.10	2.24 ± 0.07	0.6988
– Ejection fraction (%)	69 ± 2	66 ± 2	0.5635
– LV weight (mg)	136 ± 5	117 ± 6	0.0520
– LV weight relative to tibial length (mg mm ⁻¹)	6.32 ± 0.25	5.24 ± 0.30	0.0240 †
– LV weight relative to body weight (%)	0.544 ± 0.025	0.408 ± 0.026	0.0054 †
– Heart rate (min ⁻¹)	386 ± 17	423 ± 16	0.0831
– Stroke volume (μL)	61 ± 3	60 ± 4	0.9657
– Cardiac output (mL min ⁻¹)	24 ± 1	25 ± 1	0.3184
C) Parameters used for normalization	(<i>n</i> = 8)	(<i>n</i> = 8)	
– Body weight (g)	25.2 ± 0.8	28.8 ± 0.7	0.0054 †
– Tibial length (mm)	21.61 ± 0.09	22.30 ± 0.14	0.0113 †

Data are expressed as means ± SEM. Hearts weighed were freed of blood vessels and pericardial fat. The number of mice tested among several experiments is indicated between parentheses. * and † indicate that values in a row are significantly different statistically between each other based on Student *t* and Wilcoxon rank-sum tests, respectively. LV, left ventricle.

Table 4. Renal function

Trait	<i>Kcc3</i> ^{-/-}	<i>Kcc3</i> ^{+/+}	<i>p</i>
A) Standard serum or blood measurements			
– Creatinine (μmol L ⁻¹)	13.00 ± 1.09 (7)	11.25 ± 1.46 (8)	0.5992
– Urea (mmol L ⁻¹)	10.77 ± 0.78 (7)	10.46 ± 0.38 (8)	0.7716
– Na ⁺ (mmol L ⁻¹)	150.3 ± 0.6 (7)	150.5 ± 0.5 (8)	0.5022
– CO ₂ (mmol L ⁻¹)	14.0 ± 1.2 (7)	15.0 ± 1.2 (8)	0.2599
– Hematocrit (%)	37.2 ± 0.5 (7)	38.7 ± 1.0 (6)	0.2246
B) Water balance and food intake			
– Daily water intake (mL)	4.0 ± 0.1 (11)	3.0 ± 0.3 (9)	0.0133 †
– Hourly diuresis (μL h ⁻¹)	50.2 ± 3.2 (11)	31.4 ± 3.6 (9)	0.0014 †
– Urine osmolality (osmol kg ⁻¹)	1.99 ± 0.11 (5)	1.99 ± 0.15 (5)	1.000
C) Urine measurements			
– Na ⁺ /creatinine	34.3 ± 3.0 (7)	34.2 ± 1.8 (8)	0.955
– Creatinine (μmol L ⁻¹)	3.07 ± 0.12 (7)	4.78 ± 0.25 (8)	< 0.001 †
– Specific gravity	1.041 ± 0.002 (7)	1.060 ± 0.003 (7)	0.002 †

Studies were carried out under a regular diet. Data are expressed as means ± SEM. The number of mice tested among several experiments is indicated between parentheses. † indicates that values in a row are significantly different statistically between each other based on a Wilcoxon rank-sum test.

Table 5. Body measurements and lipid profile

Trait	<i>Kcc3</i>^{-/-}	<i>Kcc3</i>^{+/+}	<i>p</i>
Adult TBW (g)	29.3 ± 0.5 (29)	36.6 ± 1.1 (32)	< 10 ⁻⁶ *
GFW (g)	0.46 ± 0.09 (11)	2.07 ± 0.20 (11)	<10 ⁻⁴ †
GFW relative to TBW (%)	1.51 ± 0.27 (11)	4.85 ± 0.39 (11)	0.0002 †
<i>K</i> _{1/2} of growth curve (weeks)	3.63 (57)	6.19 (98)	n/a
<i>V</i> _{max} of growth curve (g)	30.2 (57)	44.0 (98)	n/a
Daily chow intake (g)	3.7 ± 0.1 (11)	2.2 ± 0.2 (9)	0.0005 †
Cholesterol (mmol L ⁻¹)	1.58 ± 0.08 (7)	2.42 ± 0.11 (8)	0.0015 †
Triglycerides (mmol L ⁻¹)	0.69 ± 0.10 (7)	0.99 ± 0.13 (8)	0.1473

Data are expressed as means ± SEM. The number of mice tested among several experiments is indicated between parentheses. * and † indicate that values in a row are significantly different statistically between each other based on Student *t* and Wilcoxon rank-sum tests, respectively, and n/a indicate not available or not applicable. GFW, gonadal fat weight; TBW, total body weight.

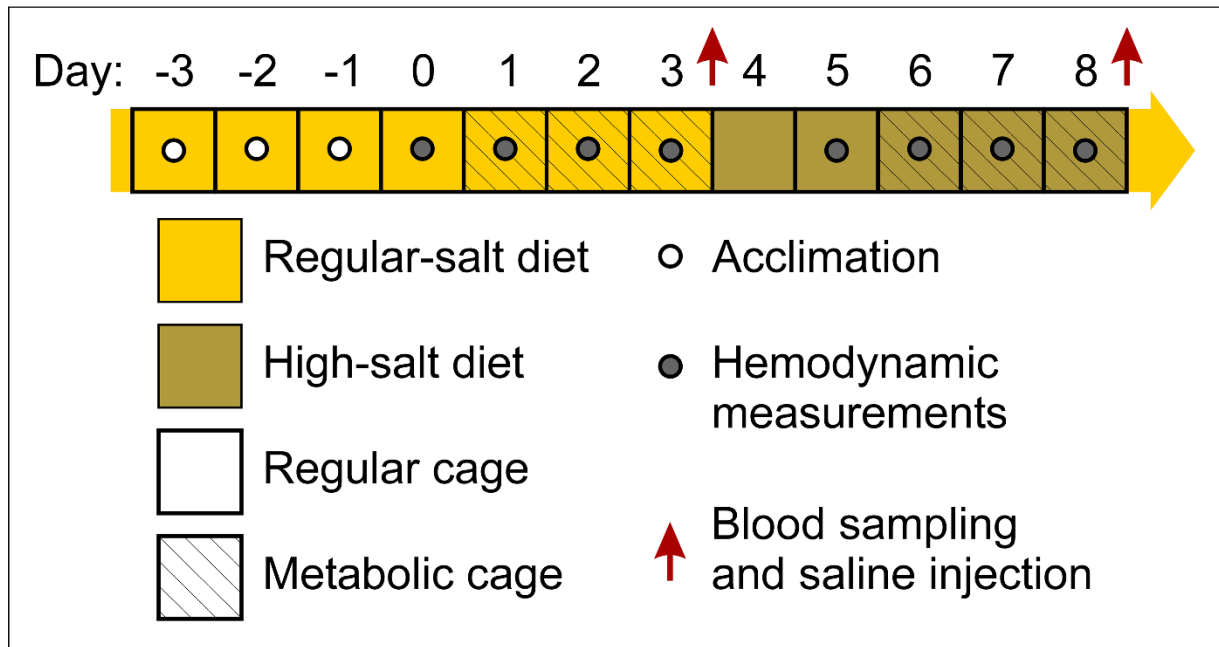


Fig 1. Na⁺ loading protocol.

Mice were subjected to 7 days of regular diet (0.26% NaCl, ~10 mg/d) followed by 5 days of high-salt diet (8% NaCl, ~300 mg/d). Days -3 to -1 served as an acclimation period. BP and HR measurements (23 per day) were obtained between 16:30 and 18:45. Those obtained during acclimation, the first 8 daily hemodynamic measurements and the outliers (as defined in *Material and Methods*) were excluded from further analyses. Chow and water intake, diuresis, fecal output and biochemical parameters were measured at different time points in Nalgene diuresis cages.

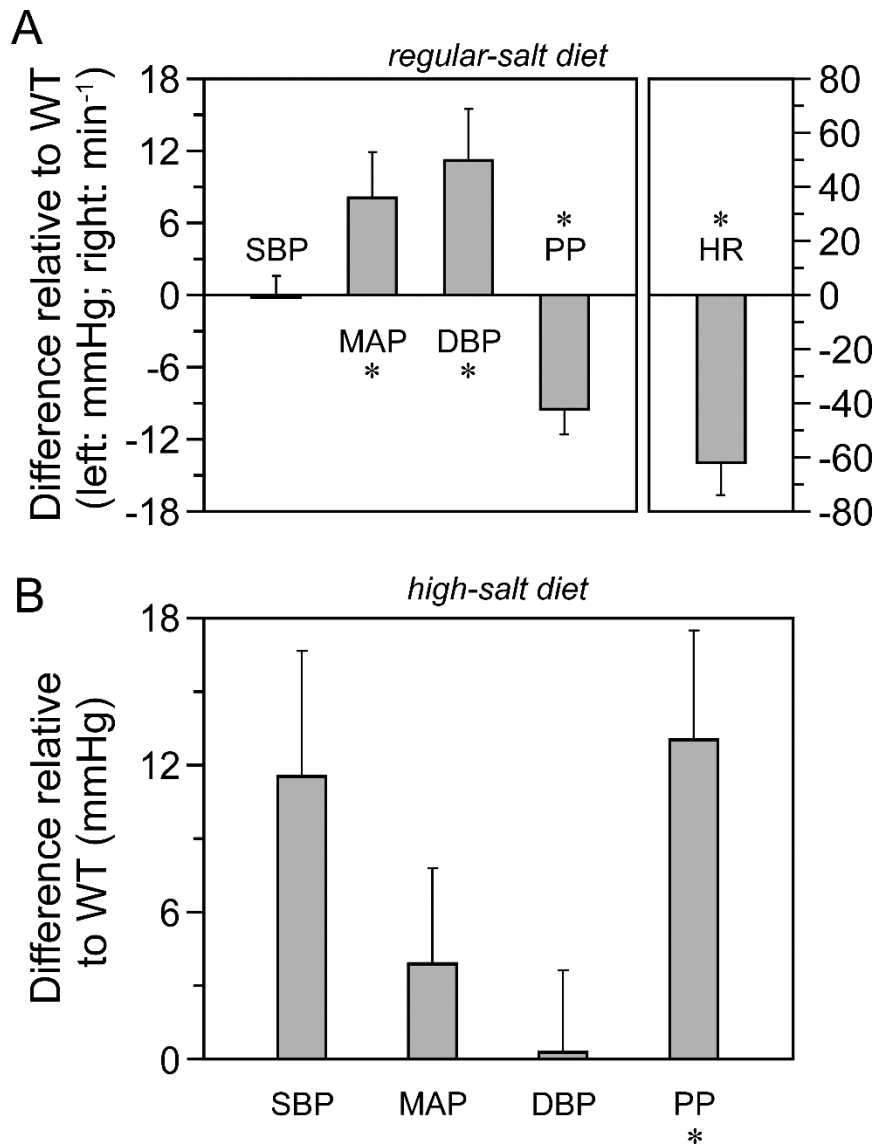


Fig 2. Hemodynamic parameters.

Measurements were obtained by tail cuff sphygmomanometry using the BP-2000 Series II system. Data are presented as means of daily differences \pm SEM between $Kcc3^{-/-}$ and $Kcc3^{+/+}$ mice among 4 consecutive days and 4 to 6 animals per group. **A**, Regular-salt diet. **B**, High-salt diet. The protocol used is illustrated in Fig 1. * indicates that the data are significantly different statistically from 0 ($p < 0.05$) based on a Wilcoxon rank-sum test. DBP, diastolic blood pressure; HR, heart rate; MAP, mean arterial pressure; PP, pulse pressure; SBP, systolic blood pressure. Table 2 is used to show the original data from which differences in parameters were calculated under the regular diet.

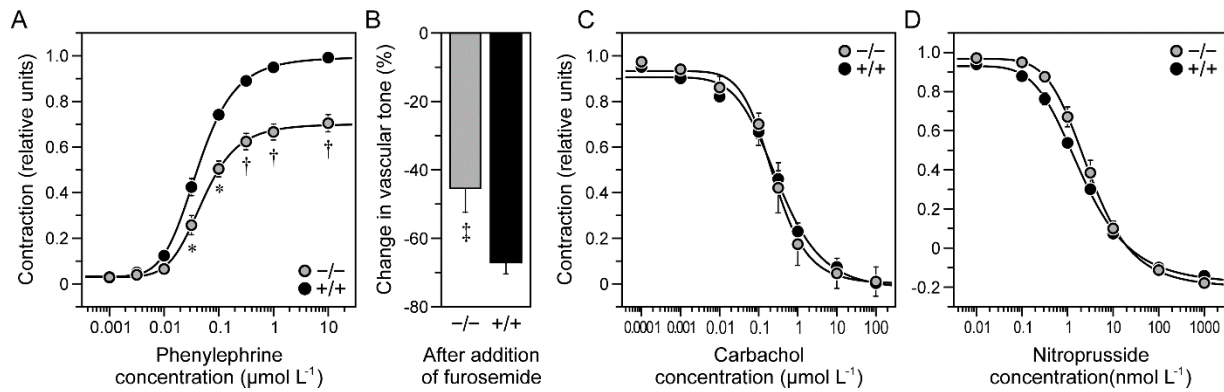


Fig 3. Reactivity of isolated thoracic aorta.

Vessels were freed of adipose tissue, cut into 2-mm ring segments and incubated at 38 °C during the assays. Differences between data sets were analyzed with the Wilcoxon rank-sum test. Except for panel A, aortas were precontracted with phenylephrine (~1 μmol L⁻¹; ~12 mN contraction). A, Effect of phenylephrine. Data are presented as isometric force developments normalized to maximal contraction and are shown as means ± SEM of 6 mice among 6 experiments. * and † indicate that the data are significantly different statistically between *Kcc3*^{-/-} mice and wild-type littermates ($p < 0.05$ and < 0.01 , respectively). B, Effect of furosemide (1 mmol L⁻¹). Data are presented as furosemide-induced changes in the vascular tone of precontracted aortic segments and are shown as means ± SEM of 4 mice among 4 experiments. ‡ indicates that the mean is significantly different statistically compared to *Kcc3*^{+/+} littermates ($p < 0.001$). C, Effect of carbachol. Data are presented as isometric force development normalized to maximal contraction and are shown as means ± SEM of 5 mice among 5 experiments. D, Effect of nitroprusside. Data are presented as isometric force development normalized to maximal contraction and are shown as means ± SEM of 5 mice among 5 experiments.

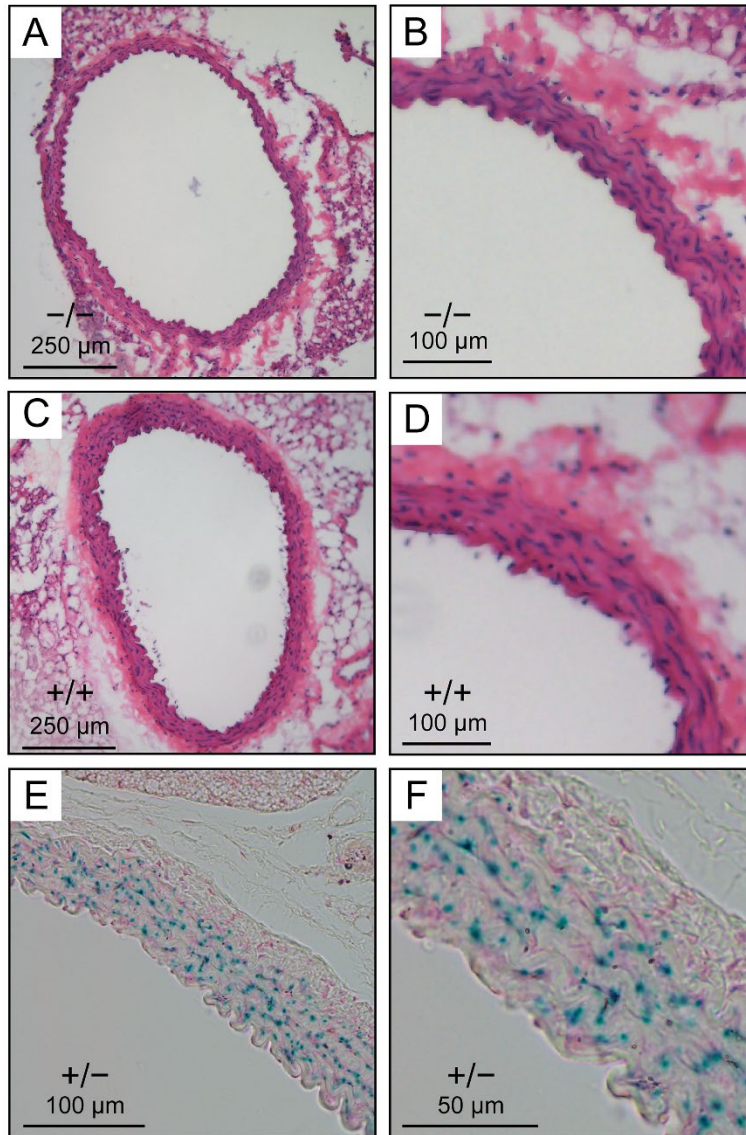


Fig 4. Microscopic and transcriptomal analysis of thoracic aorta.

A to D, Histological appearance of thoracic aorta. Tissues were embedded in paraffin and stained with hematoxylin-eosin. Wall thickness was measured through histomorphometric analyses as described in *Material and Methods*. E and F, *Kcc3* expression in *Kcc3^{+/-}* thoracic aorta based on β-galactosidase activity. Enzyme detection was carried out in Optimal Cutting Temperature-embedded tissues as described in *Material and Methods*. * indicates that the mean is significantly different statistically compared to WT littermates based on a paired Student *t* test.

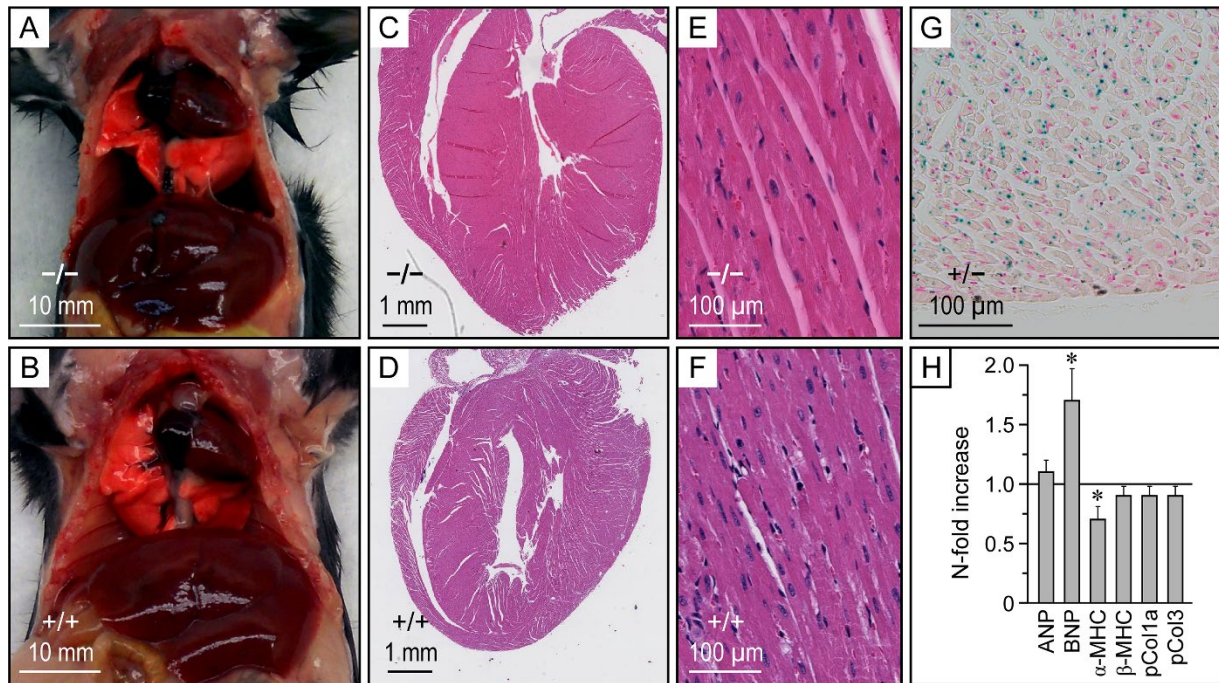


Fig 5. Macroscopic, microscopic and transcriptomal analysis of the heart.

A and B, Macroscopic appearance of the thoracic cavity. Animals were 15 weeks old and from the same litter. C to F, Histological appearance of heart. Tissues were embedded in Optimal Cutting Temperature compound and stained with hematoxylin-eosin. G, $Kcc3$ expression in $Kcc3^{+/-}$ ventricle based on β -galactosidase activity. Enzyme detection was carried out in Optimal Cutting Temperature-embedded tissues as described in *Material and Methods*. H, Heart transcriptomal activity. Gene-specific primers used are listed in Table 1. Data are presented as N-fold increases in $Kcc3^{-/-}$ mice relative to $Kcc3^{+/+}$ mice and are shown as means \pm SEM using 4-6 animals per group. * indicates that the data are significantly different statistically from 1 ($p < 0.05$) based on a Student t test. ANP, atrial natriuretic peptide; BNP, B-type natriuretic factor; MHC, myosin heavy chain; pCol, procollagen.

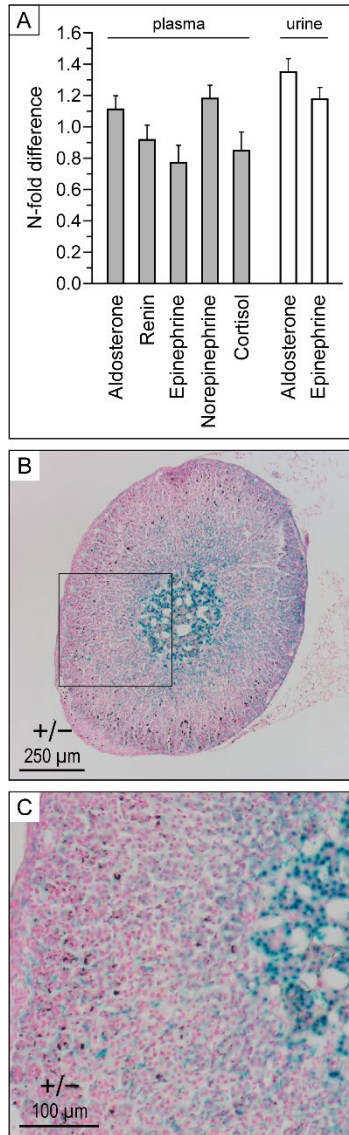


Fig 6. Secretion profile of hemodynamically relevant hormones.

A, Plasma and urine measurements. Animals were under regular diets. Data are presented as N-fold changes in $Kcc3^{-/-}$ mice relative to $Kcc3^{+/+}$ mice and are shown as means \pm SEM of 13 to 23 mice (except for cortisol where means are of 4 mice) among 1-3 experiments. None of the data shown were statistically different from 1 based on Wilcoxon rank-sum tests. Aldo, aldosterone; Epi, epinephrine; Norepi, norepinephrine. B and C, $Kcc3$ expression in $Kcc3^{+/+}$ adrenal gland based on β -galactosidase activity. Enzyme detection was carried out in Optimal Cutting Temperature-embedded tissues as described in *Material and Methods*.

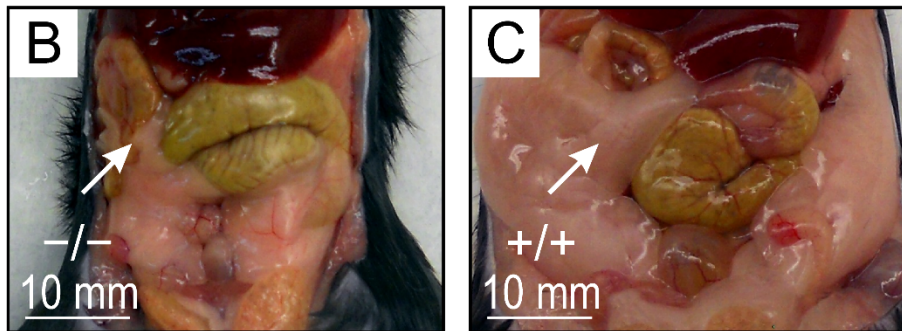
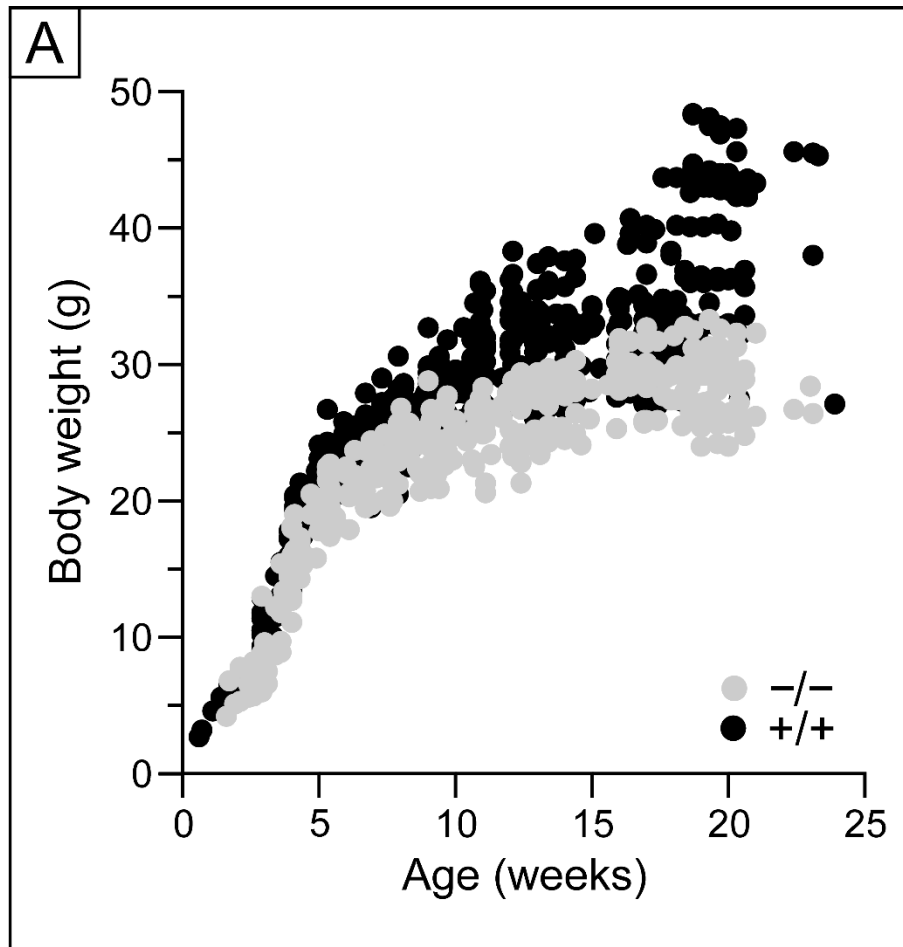


Fig 7. Body measurements. A, Growth curves.

Values shown are from 57 *Kcc3*^{-/-} and 98 *Kcc3*^{+/+} animals. Additional measurements are shown in Table 3. B and C, Macroscopic appearance of the abdominal cavity. Animals were 15 weeks old and from the same litter. Gonadal depots (indicated by arrows) are much smaller in *Kcc3*^{-/-} mouse compared to wild-type mouse.

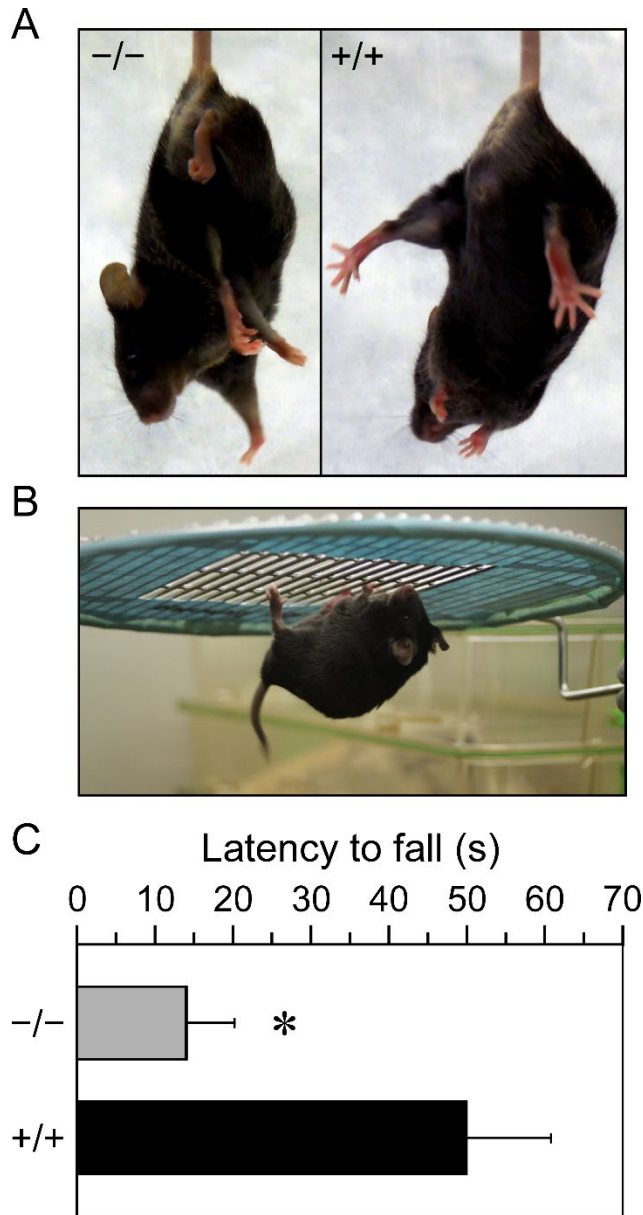


Fig 8. Neurologic assessment.

A, Tail suspension test. $Kcc3^{-/-}$ mice clasp both the forelimbs and hindlimbs upon suspension, whereas $Kcc3^{+/+}$ mice extend them. B and C, Wire hang test. Latency to which mice fell from the horizontal grid was recorded with a chronometer. Data are shown as means \pm SEM of 12 mice among 6 experiments using the longest time for each mouse. * indicates that the mean is significantly different statistically compared to wild-type littermates ($p < 0.0001$) based on a Wilcoxon rank-sum test.

References

1. Daigle ND, Carpentier GA, Frenette-Cotton R, Simard MG, Lefoll MH, Noël M, et al. Molecular characterization of a human cation-Cl⁻ cotransporter (SLC12A8A, CCC9A) that promotes polyamine and amino acid transport. *J Cell Physiol.* 2009;220: 680-689.
2. Takahashi N, Brooks HL, Wade JB, Liu W, Kondo Y, Ito S, et al. Posttranscriptional compensation for heterozygous disruption of the kidney-specific NaK2Cl cotransporter gene. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13: 604-610.
3. Acuña R, Martínez-de-la-Maza L, Ponce-Coria J, Vázquez N, Ortal-Vite P, Pacheco-Alvarez D, et al. Rare mutations in *SLC12A1* and *SLC12A3* protect against hypertension by reducing the activity of renal salt cotransporters. *J Hypertens.* 2011;29: 475-483.
4. Ji W, Foo JN, O'Roak BJ, Zhao H, Larson MG, Simon DB, et al. Rare independent mutations in renal salt handling genes contribute to blood pressure variation. *Nat Genet.* 2008;40: 592-599.
5. Cruz DN, Simon DB, Nelson-Williams C, Farhi A, Finberg K, Burlison L, et al. Mutations in the Na-Cl Cotransporter Reduce Blood Pressure in Humans. *Hypertension.* 2001;37: 1458-1464.
6. Fava C, Montagnana M, Rosberg L, Burri P, Almgren P, Jonsson A, et al. Subjects heterozygous for genetic loss of function of the thiazide-sensitive cotransporter have reduced blood pressure. *Hum Mol Genet.* 2008;17: 413-418.
7. Melander O, Orho-Melander M, Bengtsson K, Lindblad U, Rastam L, Groop L, et al. Genetic Variants of Thiazide-Sensitive NaCl-Cotransporter in Gitelman's Syndrome and Primary Hypertension. *Hypertension.* 2000;36: 389-394.
8. Meyer JW, Flagella M, Sutliff RL, Lorenz JN, Nieman ML, Weber CS, et al. Decreased blood pressure and vascular smooth muscle tone in mice lacking basolateral Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;283: H1846-H1855.

9. Prasad V, Bodi I, Meyer JW, Wang Y, Ashraf M, Engle SJ, et al. Impaired cardiac contractility in mice lacking both the AE3 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger and the NKCC1 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ cotransporter: effects on Ca^{2+} handling and protein phosphatases. *J Biol Chem.* 2008;283: 31303-31314.
10. Akar F, Skinner E, Klein JD, Jena M, Paul RJ, O'Neill WC. Vasoconstrictors and nitrovasodilators reciprocally regulate the $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ cotransporter in rat aorta. *Am J Physiol Cell Physiol.* 1999;276: C1383-C1390.
11. Garg P, Martin CF, Elms SC, Gordon FJ, Wall SM, Garland CJ, et al. Effect of the Na-K-2Cl cotransporter NKCC1 on systemic blood pressure and smooth muscle tone. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;292: H2100-2105.
12. Yang SS, Lo YF, Wu CC, Lin SW, Yeh CJ, Chu P, et al. SPAK-knockout mice manifest Gitelman syndrome and impaired vasoconstriction. *J Am Soc Nephrol.* 2010;21: 1868-1877.
13. Lalioti MD, Zhang J, Volkman HM, Kahle KT, Hoffmann KE, Toka HR, et al. Wnk4 controls blood pressure and potassium homeostasis via regulation of mass and activity of the distal convoluted tubule. *Nat Genet.* 2006;38: 1124-1132.
14. Wilson FH, Disse-Nicodeme S, Choate KA, Ishikawa K, Nelson-Williams C, Desitter I, et al. Human hypertension caused by mutations in WNK kinases. *Science.* 2001;293: 1107-1112.
15. Rafiqi FH, Zuber AM, Glover M, Richardson C, Fleming S, Jovanovic S, et al. Role of the WNK-activated SPAK kinase in regulating blood pressure. *EMBO Mol Med.* 2010;2: 63-75.
16. Xi B, Chen M, Chandak GR, Shen Y, Yan L, He J, et al. STK39 polymorphism is associated with essential hypertension: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2013;8: e59584.
17. Rodan AR, Huang CL. An emerging role for SPAK in NCC, NKCC, and blood pressure regulation. *J Am Soc Nephrol.* 2010;21: 1812-1814.

18. Boettger T, Rust MB, Maier H, Seidenbecher T, Schweizer M, Keating DJ, et al. Loss of K-Cl co-transporter KCC3 causes deafness, neurodegeneration and reduced seizure threshold. *EMBO J.* 2003;22: 5422-5434.
19. Adragna NC, Chen Y, Delpire E, Lauf PK, Morris M. Hypertension in K-Cl cotransporter-3 knockout mice. *Adv Exp Med Biol.* 2004;559: 379-385.
20. Rust MB, Faulhaber J, Budack MK, Pfeffer C, Maritzen T, Didie M, et al. Neurogenic mechanisms contribute to hypertension in mice with disruption of the K-Cl cotransporter KCC3. *Circ Res.* 2006;98: 549-556.
21. Howard HC, Mount DB, Rochefort D, Byun N, Dupre N, Lu J, et al. The K-Cl cotransporter KCC3 is mutant in a severe peripheral neuropathy associated with agenesis of the corpus callosum. *Nat Genet.* 2002;32: 384-392.
22. Di Fulvio M, Lauf PK, Adragna NC. The NO signaling pathway differentially regulates KCC3a and KCC3b mRNA expression. *Nitric Oxide.* 2003;9: 165-171.
23. Anfinogenova YJ, Baskakov MB, Kovalev IV, Kilin AA, Dulin NO, Orlov SN. Cell-volume-dependent vascular smooth muscle contraction: role of Na⁺, K⁺, 2Cl⁻ cotransport, intracellular Cl⁻ and L-type Ca²⁺ channels. *Pflügers Arch.* 2004;449: 42-55.
24. Canessa M, Salazar G, Werner E, Vallega G, Gonzalez A. Cell growth and Na-K-Cl cotransport responses of vascular smooth muscle cells of Milan rats. *Hypertension.* 1994;23: 1022-1026.
25. Plante E, Lachance D, Roussel E, Drolet MC, Arsenault M, Couet J. Impact of anesthesia on echocardiographic evaluation of systolic and diastolic function in rats. *J Am Soc Echocardiogr.* 2006;19: 1520-1525.
26. Drolet MC, Roussel E, Deshaies Y, Couet J, Arsenault M. A high fat/high carbohydrate diet induces aortic valve disease in C57BL/6J mice. *J Am Coll Cardiol.* 2006;47: 850-855.

27. Iemitsu M, Miyauchi T, Maeda S, Sakai S, Kobayashi T, Fujii N, et al. Physiological and pathological cardiac hypertrophy induce different molecular phenotypes in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2001;281: R2029-R2036.
28. Mercado A, Vazquez N, Song L, Cortes R, Enck AH, Welch R, et al. NH₂-terminal heterogeneity in the KCC3 K⁺-Cl⁻ cotransporter. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005;289: F1246-F1261.
29. Urena J, Franco-Obregon A, Lopez-Barneo J. Contrasting effects of hypoxia on cytosolic Ca²⁺ spikes in conduit and resistance myocytes of the rabbit pulmonary artery. *J Physiol*. 1996;496: 103-109.
30. Archer SL, Huang JM, Reeve HL, Hampl V, Tolarova S, Michelakis E, et al. Differential distribution of electrophysiologically distinct myocytes in conduit and resistance arteries determines their response to nitric oxide and hypoxia. *Circ Res*. 1996;78: 431-442.
31. Harder DR, Abel PW, Hermsmeyer K. Membrane electrical mechanism of basilar artery constriction and pial artery dilation by norepinephrine. *Circ Res*. 1981;49: 1237-1242.
32. Viitanen T, Ruusuvoori E, Kaila K, Voipio J. The K⁺-Cl⁻ cotransporter KCC2 promotes GABAergic excitation in the mature rat hippocampus. *J Physiol*. 2010;588: 1527-1540.
33. Mitani A, Shattock MJ. Role of Na-activated K channel, Na-K-Cl cotransport, and Na-K pump in [K]_e changes during ischemia in rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 1992;263: H333-H340.
34. Yamamoto T, Shirayama T, Takahashi T, Matsubara H. Altered expression of Na⁺ transporters at the mRNA level in rat normal and hypertrophic myocardium. *Heart Vessels*. 2009;24: 54-62.

Article 2 : Increased metabolic rate and lipid wasting in a mouse model of K-Cl cotransporter 3 inactivation are associated with marked leanness and improved metabolic profile

GARNEAU, A. P., PEPIN, É., NOËL, M., ELIAS, P., COSSETTE, S., ISENRING, P. et LAVOIE, J. L. (2021). Increased metabolic rate and lipid wasting in a mouse model of K-Cl cotransporter 3 inactivation are associated with marked leanness and improved metabolic profile [Document soumis pour publication]. *Molecular Metabolism* (MOLMET-S-21-00955).

Contributions des auteurs :

Conception des expériences : APG, ÉP & JLL

Réalisation des expériences : APG, ÉP, MN, PE & SC

Analyse des résultats : APG, ÉP, MN, PE, SC, PI & JLL

Obtention de financement et de matériel : PI & JLL

Rédaction du manuscrit : APG, PI & JLL

Révision critique du manuscrit : SC

Relecture et approbation du manuscrit : APG, ÉP, MN, PE, SC, PI & JLL

Increased metabolic rate and lipid wasting in a mouse model of K-Cl cotransporter 3 inactivation are associated with marked leanness and improved metabolic profile

Alexandre P. Garneau^{1,2,3}, Émilie Pepin², Micheline Noël³, Pierre Elias^{1,2}, Suzanne Cossette², Paul Isenring^{2,4}, Julie L. Lavoie^{1,2}

1. School of Kinesiology and Physical Activity Sciences, Faculty of Medicine, Université de Montréal, PO Box 6128, succursale Centre-ville, Montréal (Québec) H3C 3J7 Canada

2. Cardiometabolic Axis, Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), 900 Saint-Denis Street, Montréal (Québec) H2X 0A9 Canada

3. Endocrinology-nephrology axis, Centre de recherche L'Hôtel-Dieu de Québec, 9 McMahon Street, Québec City (Québec) G1R 3S3 Canada

4. Department of medicine, Faculty of Medicine, Université Laval, 1050 Médecine Avenue, Québec City (Québec) G1V 0A6 Canada

Corresponding author

CRCHUM, 900 Saint-Denis Street, Room R08.452, Montréal (Québec) H2X 0A9 Canada Phone: +1 514 890-8000 x23612 Fax: +1 514 412-7655. E-mail: julie.lavoie.3@umontreal.ca (J.L. Lavoie)

Abstract

Objective

K-Cl cotransporter type 3 (KCC3) is a widely expressed ion exporter involved in cell volume and intracellular ion concentration maintenance. *KCC3* loss of function in humans leads to hereditary motor and sensory neuropathy with or without agenesis of the corpus callosum (HMSN/ACC). Patients with HMSN/ACC and *Kcc3* loss-of-function mouse models have been reported to present with low body weight and size, although the mechanisms are unknown. Our goal is to conduct the first comprehensive investigation of metabolic function in a *Kcc3* loss of function model.

Methods

Using a mouse constitutively inactivated for *Kcc3* (*Kcc3*^{KO}), we have performed an extensive metabolic characterization using magnetic resonance-based body composition determinations, laser-assisted locomotor monitoring, indirect calorimetry, oral glucose and lipid tolerance tests and a high-fat dietary challenge, coupled to morphometric characterizations and gene expression studies.

Results

Compared to controls, our *Kcc3*^{KO} mice have a low body weight characterised by reduced fat and lean body masses despite normal food intake. They also engage in more locomotor activity and expend more energy during their active phase compared to controls. Metabolic benefits uncovered in *Kcc3*^{KO} mice included an improved tolerance to glucose, lower circulating triglyceride levels and resistance to diet-induced weight gain. Interestingly, expression studies in adipose tissue support an energy-wasting mechanism in the form of a lipid substrate cycle.

Conclusions

Our data suggest that high activity and energy dissipation in lipid metabolism drive an increased energy expenditure in a mouse model of HMSN/ACC, which displays marked leanness. This hypermetabolic phenotype also appears to confer benefits in the processing of energetic substrates

and commands deeper extraneurological evaluation of HMSN/ACC patients as they could benefit from more holistic care plans.

Keywords

Potassium-chloride cotransporter type 3, mouse model, hereditary motor and sensory neuropathy with or without agenesis of the corpus callosum, lipid metabolism, resistance to diet-induced obesity, energy expenditure

Abbreviations

CCC, cation-Cl cotransporter; HFD, high-fat diet; HMSN/ACC, hereditary motor and sensory neuropathy with or without agenesis of the corpus callosum; KCC3, K-Cl cotransporter type 3; KO, knocked-out; NKCC, Na-K-Cl cotransporter; OGTT, oral glucose tolerance test; OLTT, oral lipid tolerance test; RER, respiratory exchange ratio; SEM, standard error of the mean; WT, wild-type

1. Introduction

The K-Cl cotransporter type 3 (KCC3 or SLC12A6) is a membrane protein responsible for the electroneutral and coupled K⁺ and Cl⁻ transport across the cell surface. It belongs to a family of nine ion carriers termed the cation-Cl cotransporters (CCCs), which share common structural features and physiological roles [1; 2]. KCC3 has a broad distribution but has higher expression in the brain, heart, muscle and kidney [3-9]. In most cell types, KCC3 is likely to act as an efflux transport system and contribute to cell volume regulation under hypotonic conditions [5; 7; 8; 10].

In the early 2000s, *Kcc3* was linked in humans to a rare neurologic disorder termed hereditary motor and sensory neuropathy with or without agenesis of the corpus callosum (HMSN/ACC) or Andermann syndrome [11; 12]. This disorder causes impaired locomotor and cognitive development, neuropsychiatric manifestations, amyotrophy, dysmorphic features, and premature death often due to respiratory failure [13-16]. Investigation of *Kcc3* knocked-out mouse models (*Kcc3*^{KO}) has revealed that the neurologic abnormalities in HMSN/ACC are due to loss of K-Cl transport in neurons, leading to axonal swelling and various lesions in the nervous system [12; 17].

Of note, extraneurological abnormalities such as lower body weight and short stature have also been observed in many *Kcc3*^{KO} mouse models characterized [18-21] and in several confirmed [16; 22; 23] or presumed [24-26] cases of HMSN/ACC. However, in the face of severe neurological disorders associated with HMSN/ACC, the study designs were not aimed at investigating the metabolic features, and the animal experiments were notably carried out using mixed background mouse strains.

In a previous study [18], we generated a constitutive *Kcc3*^{KO} mouse line in the C57BL/6J background that is better suited to characterize the cardiometabolic features observed. We found that the mouse model also had lower body length, body weight and visceral adiposity [18]. Nevertheless, the body composition and energy metabolism phenotype associated with *Kcc3* loss of function remain poorly characterized and understood. To better describe the metabolic phenotype arising from *Kcc3* loss of function and the underlying mechanisms, we further characterized the metabolic features of our *Kcc3*^{KO} mouse model using techniques such as indirect calorimetry, oral tolerance tests, a dietary challenge and expression studies.

2. Material and methods

2.1. Animals

The *Kcc3*^{KO} mouse line [18] was provided by Dr. Paul Isenring's laboratory to the Centre hospitalier de l'Université de Montréal Research Centre (CRCHUM). Briefly, C57BL/6J mice carrying a heterozygous constitutive mutation preventing translation of KCC3 beyond exon 2 [Mutant Mouse Regional Resource Centers (MMRRC), University of Carolina, Chapel Hill, NC, USA] were intercrossed to generate wild-type (WT), heterozygous and homozygous KO littermates. Offspring of the 9th backcross or more were used in experimental protocols (>99.6% homozygosity [27]).

Crude DNA obtained by hotSHOT NaOH-EDTA extraction [28] from tail biopsies were used for genotyping by PCR in a combined reaction using a common forward primer at 0.4 μ M and two alternative reverse primers at 0.2 μ M, 25 mU/ μ L GoTaq® DNA Polymerase (M3001, Promega, Madison, WI, USA) according to the thermal profile and sequences provided by the supplier (PCR #11666, MMRRC) using a T-1 Thermoblock thermocycler (Biometra, Göttingen, Germany). The PCR products were run on a 3% agarose gel and visualised on a G:BOX transilluminator (Syngene, Bengaluru, India).

Male experimental mice were individually housed in a 12-h light/dark cycle with *ad libitum* access to water and normal diet (2018 Teklad global 18% protein rodent diet, Envigo, Huntingdon, UK) unless stated otherwise. The animal care met the standards set forth by the Canadian Council on Animal Care for the use of experimental animals. All procedures were approved by the Animal Care Committee of the CRCHUM.

2.2. High-fat feeding

At 12 weeks of age, a subgroup of mice was placed on either a high-fat diet (HFD, 60% of calories from fat, Bio-Serv S3282, Flemington, NJ, USA) or a control diet (Bio-Serv F4031) in individual cages for eight weeks with *ad libitum* access to food and water [29; 30]. Body weight and food intake were measured biweekly. Food intake from the first week was excluded from the cumulative calculation because of high variability due to environment novelty. Caloric intake was calculated from the energetic content of the diet provided by the supplier (3.93 kcal \cdot g⁻¹ for control diet vs

5.49 for HFD). Feed efficiency was calculated as total weight gain divided by total caloric intake at the end of the experiment [31]. Body composition assessments were performed on a representative subgroup of animals before and after the feeding protocol as described in section 2.4. At the end of the protocol, mice were sacrificed to collect plasma, liver, abdominal subcutaneous fat, perigonadal fat and left hind limb muscles (*soleus*, *plantaris*, *gastrocnemius*) which were flash-frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C for future assay.

2.3. Metabolic cages

Mice aged 18-23 weeks were individually housed in Promethion™ cages (Sable Systems International, Las Vegas, NV, USA) for seven days before measuring body composition and returning to metabolic cages. Two days later, animals were considered thoroughly acclimated, and data was collected for 96 continuous h (see Lark *et al.* [32] for additional technical details). Briefly, outflowing air was sampled and dried every 5 min for oxygen and carbon dioxide determinations. The manufacturer's algorithm [33] allowed for the calculation, at each sampling time, of the respiratory exchange ratios (RERs) and metabolic rates (according to the Weir equation [34]), the latter being further integrated over time to yield energy expenditure over 12 h periods. Based on the manufacturer's algorithm [33], the minimum metabolic rate is defined as the mean rate during the 30-min period with the lowest observed values. Accordingly, the maximum metabolic rate is defined as the mean rate during the 15-min period with the highest values.

Food and water intake, as well as locomotor data, were measured every second. Intake data was compiled using the manufacturer's algorithm to detect significant intake events. Locomotor activity was detected by regularly spaced infrared beams in the x and y -axis, as well as by an array of higher-raised z -axis beams to detect rearing activity. Traveled distance data was generated from positional data and interpreted as ambulatory or stereotypical movements based on movement parameters. Locomotion at $1 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ or more is classified as ambulatory as opposed to the stereotypic activity, which is not associated with significant displacement in the horizontal plane. Mice were considered quiet when they were not crossing an infrared beam, nor entering or leaving the shelter, nor interacting with a food or water source for at least 1 s. Data were acquired and processed using MetaScreen and MacroInterpreter softwares (Sable Systems, Las Vegas, NV, USA), respectively.

2.4. Body composition analysis

Fat and lean masses were measured with an EchoMRI™-500-A100 body composition analyzer (EchoMRI LLC, Houston, TX, USA) at 19-24 weeks of age during metabolic cages housing or at 12 and 20 weeks of age for the high-fat feeding protocol. Individual metabolic masses were calculated as lean mass + 0.2 × fat mass [35].

2.5. Oral glucose tolerance test (OGTT)

Oral glucose tolerance was assessed in 16 to 18-week-old mice after a 5-hour fast in the morning [29]. Caudal vein blood glucose was measured after fasting at baseline and 15, 30, 45, 60, 90 and 120 min after administration of D-glucose (Baxter Corporation, Mississauga, ON, Canada) by gavage (2 g per kg body weight). Plasma (from 50-μL caudal vein blood drawings) was also obtained at baseline and 30 min after gavage using heparinized glass capillaries (Precision, St. Louis, MO, USA) to measure insulin and C-peptide as described below.

2.6. Oral lipid tolerance test (OLTT)

Oral lipid tolerance was assessed in 12- to 16-week-old mice after a 17-h overnight fast [36-38]. Plasma from caudal vein blood (20 μL blood) was obtained using heparinized glass capillaries (Precision, MO, USA) after fasting at baseline and 1, 2, 3, 4, 6 and 8 h after administration of olive oil (Colavita, Sant'Elia a Pianisi, Italy) by gavage (10 mL per kg of body weight) for measurement of triglycerides as described below.

2.7. Circulating and tissue parameters

Blood glucose was measured using a glucometer (Accu-Chek Performa, Roche, Indianapolis, IN). Plasma C-peptide, insulin and leptin were measured by AlphaLISA as described previously by our group [29]. Plasma triglyceride concentrations were determined enzymatically as previously described [29] and are expressed as triolein equivalents. Liver triglyceride content was determined as described previously [29].

2.8. Reverse transcription and quantitative PCR

Frozen adipose tissues were ground into a fine powder before extracting total RNA using a phenol-chloroform-based protocol, as described previously by our group [39]. Five hundred ng of RNA was treated with DNase I (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) and reverse transcribed into

cDNA using random hexamer primers, RiboLock RNase Inhibitor and Maxima Reverse Transcriptase (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), according to the manufacturer's protocol.

Quantitative PCR was used to assess mRNA expression of lipogenic (diacylglycerol O-acyltransferase-1, fatty acid synthase and glycerol kinase) and lipolytic (adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase) enzymes as well as mesoderm-specific transcript (*Mest*), which was used as a marker of adipocyte size [40]. Reactions were performed in 10- μ L duplicates containing 0.3 μ mol \cdot L⁻¹ of each forward and reverse gene-specific primers (Table S1) and 2,5 μ L of cDNA template in FastStart™ Universal SYBR® Green Master (Rox) (Roche, Indianapolis, IN, USA) at 1X concentration. The reactions were run in a Rotor-Gene Q thermocycler (Qiagen, Hilden, Germany) and the thermal profile consisted of a hot start (95 °C for 10 min), followed by 40 cycles of a two-step program (95 °C for 15 s and 60 °C for 60 s) and a melt curve (55 °C to 95 °C). Amplification specificity was confirmed by melt curve analysis and visualization of qPCR products size on a 3% agarose gel. Expression of each gene of interest was normalized to that of cyclophilin A (peptidylprolyl isomerase A, *Ppia*) as a reference gene [41] in the same sample using the Pfaffl method [42].

2.9. Statistical analyses

All data are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM). Differences between groups for single measurements were evaluated by Student t-tests. Repeated measures two-way ANOVA were used for analysis when comparing groups at different time points. A *post hoc* Tukey analysis was conducted if a significant interaction was detected. The energy expenditure ANCOVA analyses done for this work were provided by the National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK from NIH) Mouse Metabolic Phenotyping Centers using their energy expenditure analysis page (mmpc.org/shared/regression.aspx) and supported by grants DK076169 and DK115255. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Lower body weight and differences in body composition

In keeping with previous observations [18; 20; 21], body weight was 14% lower in *Kcc3*^{KO} compared to WTs (Figure 1A). Total fat mass was additionally found to be 70% lower than in WTs, while lean body mass was 8.3% lower (Figure 1B-C).

3.2. Increased energy expenditure and locomotor activity

Interestingly, we observed a higher daily energy expenditure compared to WTs (Figure 2A, $p = 0.0068$), as measured by indirect calorimetry, which may have contributed to the leaner profile described earlier. Although diurnal energy expenditure was equal for both genotypes, nocturnal energy expenditure was higher in *Kcc3*^{KO} mice (Figure 2A), suggesting an effect of activity rather than basal metabolic rate. However, we found that the minimum and maximum punctual metabolic rates were equal between genotypes (Table S2).

Because the *Kcc3*^{KO} mice exhibit a low body weight and lean phenotype, we tested whether the difference in energy expenditure would be maintained after controlling for body weight, lean body mass or metabolic mass through individual ANCOVAs. No interaction was found between the genotype and either of the three covariates, but the difference in energy expenditure becomes more statistically significant with the covariates ($p = 0.002$, 0.001 and 0.001 , respectively).

The RER was the same between genotypes during the nocturnal phase, but it was significantly lower during the diurnal phase for *Kcc3*^{KO} mice (Figure 2B). These observations suggest that *Kcc3*^{KO} mice rely more on lipids for energy expenditure during the resting phase.

Concomitantly to the calorimetric measurements in normal housing, daily food consumption was found to be similar between *Kcc3*^{KO} and WT mice (Figure 2C). However, daily water intake was ~0.7g (20.4%) higher in *Kcc3*^{KO} mice in keeping with previous observations [18; 43] (Figure 2D). In-depth analysis of feeding and drinking patterns further revealed longer meal durations for *Kcc3*^{KO} mice during both day phases despite normal meal size and slower feeding rates (Table S3A). By contrast, *Kcc3*^{KO} mice drank more water at a faster rate during each drinking bout during the nocturnal phase (Table S3B).

The increased nocturnal energy expenditure in *Kcc3*^{KO} mice prompted us to examine the pattern of activity more closely. In agreement with the abnormal gait and posture associated with *Kcc3* inactivation, we found that these mice engaged in more stereotypic activity during diurnal and nocturnal phases (Figure 2E). Distance travelled was also increased in *Kcc3*^{KO} mice compared to WT mice during both phases (Figure 2F). However, mean ambulatory speed was lower in *Kcc3*^{KO} mice regardless of the phase of the day (Figure 2G) as expected, given the motor deficit. Thereby, *Kcc3*^{KO} mice spent more time engaged in ambulatory locomotion throughout the day, spent more time feeding during the nocturnal phase, but spent less time engaged in activities of lower metabolic intensity (Table 1).

3.3. Improved glucose tolerance despite lower insulin secretion

To further examine our *Kcc3*KO mouse model's metabolic profile and assess energetic substrate homeostasis, we conducted an oral glucose tolerance test (OGTT; Figure 3A). Using a repeated measure two-way ANOVA, we found that fasting glycemia was lower in *Kcc3*^{KO} mice compared to WT mice at all measured time points, including at baseline.

To remove the possible confounding effect of lower fasting glycemia in *Kcc3*^{KO} mice, the data were reanalyzed after subtracting the baseline values. We observed no such confounding effect based on a repeated measure two-way ANOVA with the adjusted glycemia. The *Kcc3*^{KO} mice also showed improved oral glucose tolerance as assessed by the area under the curve of the adjusted glycaemic excursions (Figure 3A, inset).

Lastly, the *Kcc3*^{KO} mice had normal fasting plasma insulin levels compared to WT mice but showed a lower increase in plasma insulin levels 30 min after receiving a glucose load (Figure 3B). Glucose-stimulated C-peptide circulating concentration, an indicator of insulin secretion, was also lower in *Kcc3*^{KO} mice compared to WT mice (Figure 3C).

3.4. Lower circulating lipids

In light of the indirect calorimetry data and an apparent improvement in metabolic profile, we next assessed the homeostasis of lipids, another important energetic substrate, using an oral lipid tolerance test (OLTT; Figure 4A). We found lower plasma triglycerides in *Kcc3*^{KO} mice from baseline to 6 h following lipid administration but similar levels in both genotypes after 8 h. As

baseline plasma triglycerides were lower in *Kcc3*^{KO} mice, we reiterated the analysis using baseline-subtracted data and found that the actual increases in plasma triglycerides were lower in *Kcc3*^{KO} mice between 2 and 4 h after the lipid load. However, we did not detect a change in oral lipid tolerance in KO mice compared to WT mice as evaluated by the baseline-corrected area under the curve of triglyceride excursions, although a tendency could be observed ($p = 0.0988$; Figure 4B).

3.5. Resistance to diet-induced obesity

Given that *Kcc3*^{KO} mice exhibit low adiposity, increased glucose tolerance and lower triglyceride levels, we sought to determine if these mice were prone to additional metabolic benefits when exposed to a prolonged HFD. Compared to control diet-fed mice, WT mice fed a HFD gained more weight (an additional 14 g in total) and consumed more calories (764 additional kcal in total) (Figure 5A-B). These differences were apparent as early as 2 weeks of diet. However, the effect of the HFD was not as pronounced in *Kcc3*^{KO} mice which gained only an additional 7 g and consumed an additional 324 kcal compared to *Kcc3*^{KO} mice fed a control diet. Moreover, these diet differences were only apparent from week 4. As observed in metabolic cages, mice from both genotypes fed the control diet consumed a similar number of calories (Figure 5B). Feed efficiencies, or propensity to gain weight, were 44-46% lower on both diets for *Kcc3*^{KO} mice compared to WT counterparts (Figure 5C).

As expected, body composition assessments before and after the dietary challenge confirmed that most of the weight gain in HFD-fed animals from both genotypes was in the fat compartment. Indeed, we observed a fat mass increase of 15.7 g in WT mice, whereas the increase was only 6.8 g in *Kcc3*^{KO} mice, while the lean mass increased by 2.2 and 1.9 g, respectively (Figure 5D-E). Abdominal subcutaneous and perigonadal fat pad weights were smaller in *Kcc3*^{KO} mice regardless of the diet, and both pads had similar fold changes following the HFD (Figure 5F). Expression of the adipocyte size marker mesoderm specific transcript (*Mest*) suggested that in both abdominal subcutaneous and perigonadal fat pads, adipocytes are smaller in *Kcc3*^{KO} independently of diet and that cell size in both genotypes increased in response to the HFD (Figure S1).

At sacrifice after the dietary treatments, the weight of the three hind limb muscles was found to be slightly, yet significantly, lower in *Kcc3*^{KO} mice, but no effect of the diet was observed. The most

significant reduction observed was in the largest muscle studied, the *gastrocnemius* muscle (Figure S2).

Circulating leptin levels were higher in mice fed a HFD compared to those fed a control diet. However, leptin levels were much lower in *Kcc3*^{KO} mice independently of the diet (Figure S3). In fact, the pattern in leptin levels resembled those of the fat pad weights and of the feed efficiency, a finding that is expected because adipose tissue is the primary source of leptin [44].

Since the *Kcc3*^{KO} mice had lower feed efficiency and accumulated less fat under a HFD compared to WT, we verified whether fat accumulated in ectopic locations such as the liver. Determinations of liver triglyceride content ruled out this possibility in *Kcc3*^{KO} mice (Figure S4). In contrast, the WT mice fed a HFD had a very high triglyceride liver content and overt steatosis as seen during necropsy.

3.6. Increased expression of fat metabolism enzymes

To investigate the molecular mechanisms behind low adiposity and weight gain resistance in *Kcc3*^{KO} mice, we assessed the expression profile of fat-metabolizing enzymes in both visceral and subcutaneous fat pads (Figures 6 and 7). As reported by other groups [45-49], we noted a strong repression of the lipogenic enzyme fatty acid synthase (*Fasn*) in perigonadal and abdominal subcutaneous fat pads for both genotypes in mice fed a HFD (Figures 6A and 7A). Interestingly, fatty acid synthase expression levels were substantially higher in the abdominal subcutaneous fat pad from control diet-fed *Kcc3*^{KO} mice compared to WT mice (Figure 7A).

Of notice, several key lipid metabolism genes were regulated similarly in the perigonadal fat pad. Indeed, lipogenic enzyme diacylglycerol O-acyltransferase-1 (*Dgat1*) and lipolytic enzymes adipose triglyceride lipase (*Pnpla2*) and hormone-sensitive lipase (*Lipe*) were downregulated in animals fed a HFD independently of genotype. Furthermore, the expression of these genes was higher in *Kcc3*^{KO} mice compared to WT, regardless of the diet (Figure 6C-E). Another pivotal lipogenic enzyme, glycerol kinase (*Gk*), was expressed at higher levels in *Kcc3*^{KO} mice compared to WT on a control diet, which was normalized by the HFD (Figure 6B).

In the abdominal subcutaneous fat pad, diacylglycerol O-acyltransferase-1 expression was higher in *Kcc3*^{KO} mice on a control diet compared to WT (Figure 7C). HFD decreased the expression of

the enzyme in *Kcc3*^{KO} mice only. In contrast to the visceral fat pad, adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase were not modulated by the genotype, nor the diet, in the abdominal subcutaneous fat pad (Figures 7D-E). As for glycerol kinase, HFD treatment increased expression in this fat pad from WT animals, while no change was observed in *Kcc3*^{KO}. Thus, expression in *Kcc3*^{KO} mice fed a HFD was lower than their WT counterparts (Figure 7B).

4. Discussion

To our knowledge, we are reporting for the first time the detailed metabolic profile of a *Kcc3* loss-of-function mouse model. We have shown, in particular, that low body weight in this model is related to both a reduction in fat and lean body mass. Of interest, this reduced body weight was associated with reduced feed efficiencies both on a control diet and a HFD. This leaner phenotype could result from the increased energy expenditure itself driven by an increase in locomotor activity. Of note, a "futile" cycle within the lipid metabolism may also be contributory. Of interest, this phenotype was associated with improved glucose homeostasis and decreased fasting and fat-fed triglyceride circulating levels. In addition, *Kcc3*^{KO} mice exhibited a marked resistance to weight gain when placed on a HFD, which was characterised by a reduced caloric intake. Importantly, *Kcc3*^{KO} mice were lean but not lipodystrophic, as their fat was not dispersed along a usual subcutaneous-visceral pattern nor deposited ectopically. These mice rather exhibit metabolic advantages and do not suffer from typical fallouts of diet-induced obesity.

As mentioned, low body weight and short stature have been reported in many individuals who had [16; 22; 23] or could have had [24-26] HSMN/ACC based on the phenotype described and family history. The same can also be said of the *Kcc3*^{KO} mouse models of HSMN/ACC published so far, that is mouse models of neurospecific [20] or constitutive [18; 20; 21] *Kcc3* inactivation show lower body weight. It must also be noted that, in contrast to ours, not all *Kcc3* loss-of-function mouse models were established in pure and ideal genetic backgrounds to reveal cardiometabolic traits (such as C57BL/6J) [50-52]. Hence, the body weight phenotype may be mutation, genetic background and environment-dependent.

In the current study, we gathered concomitant records of energy expenditure, food intake and locomotor activity in an acclimated state in order to monitor the everyday metabolic features of our animal model. Indeed, before choosing the metabolic cages protocol exposed in section 2.3, we had observed within our *Kcc3*^{KO} mice unusual transient feeding and locomotor phenotypes upon shifting to another type of cage or even upon changing a cage of the same model. Acute measurements of less than 2-3 days may be misleading as they are influenced in these conditions by stress or environment novelty. To our knowledge, ours is the first report of a reduction in both the lean and the fat masses associated with *Kcc3* loss of function.

Our investigation of locomotor activity for 96 h in home-type cages revealed a distinct activity pattern in our $Kcc3^{KO}$ mice. Indeed, despite their gait impairment, these mice travel more distance in both phases of the day, although at lower speeds, and they have more stereotypic movements than WT mice. As a corollary, they spend less time resting. This is consistent with the results of Shekarabi *et al.*, who reported increased ambulatory travelled distance and stereotypic activity in a single 90-min experiment in both their constitutive and neuron-specific $Kcc3^{KO}$ models [20]. While previous observations of the locomotion in $Kcc3^{KO}$ mice [12; 20] were not meant to measure daily activity, in our study, the seven-day acclimation and the 96-h measurements in housing cages allow for a quantification of the usual locomotor activity of each animal. It is interesting to note that $Kcc3$ expression has already been confirmed in several structures of the central nervous system that are implicated in the initiation or coordination of motor commands. Therefore, the anatomic-functional impairments described in the pyramidal pathways in HMSN/ACC patients and $Kcc3^{KO}$ mice may contribute to the locomotor phenotype observed in our model as well as in the constitutive and neurospecific models developed by Shekarabi *et al.* [20]. Given the different locomotor mode between mouse and human, and the differential gait impairment, it is still unclear to which extent our findings on locomotion applies to patients affected with HMSN/ACC.

In our model, the increased locomotor behavior, both its stereotypic and ambulatory components, most likely contributed to the increase in nocturnal energy expenditure. Given that $Kcc3^{KO}$ mice are hallmarked by involuntary muscle twitching and sinuous motion, the higher energy expenditure could be due to excessive muscle contractions over large portions of the day as appears to occur in several spastic disorders [53-56]. The similar measured minimum metabolic rates between $Kcc3^{KO}$ mice and WTs further suggests that locomotor activity, rather than resting metabolic rate, accounts for the higher energy expenditure in $Kcc3^{KO}$ mice.

It is interesting to note that along with lower traveling speeds, $Kcc3^{KO}$ mice showed a lower RER in the diurnal phase. This suggests that, in resting conditions or at lower metabolic rates, $Kcc3^{KO}$ mice rely more on lipids compared to WTs in order to generate energy. This corroborates well with their time budget comprised of sustained periods of slow ambulatory activity. During the nocturnal phase, the intrinsic intra- and inter-individual variability in the punctual metabolic rates and substrate dynamics probably precluded us from bringing out differences in RER between

genotypes. The range of observed metabolic rates was the same between genotypes, but *Kcc3*^{KO} mice spent more time being active (Table 1).

The hypothesis of higher reliance of *Kcc3*^{KO} mice on lipids for low rate and sustained energy generation is supported further by our observations that *Kcc3*^{KO} mice exhibit low circulating triglycerides after a prolonged fast and a blunted increase in circulating triglycerides for the first 6 h during an OLTT. The capacity of *Kcc3*^{KO} mice to acutely absorb oral lipids does not appear to be compromised. Yet, because the plasma triglyceride excursions are a composite of digestion and tissue uptake, direct interpretations on specific processes cannot be drawn from the test. However, based on the indirect calorimetry data, we can reasonably speculate that *Kcc3*^{KO} mice utilize triglycerides from the circulation as the preferred energetic substrate and that a faster rate of triglycerides uptake by tissues compared to WT mice blunt a further increase in plasma triglycerides. Increased fat oxidation could provide an explanation for lower feed efficiencies, but one cannot exclude a malabsorption component or another fat-wasting mechanism.

In the same line, an interesting finding was that several enzymes responsible for lipogenesis and lipolysis are locally and simultaneously upregulated in *Kcc3*^{KO} mice. Indeed, in *Kcc3*^{KO} mice perigonadal fat pad particularly, the enzymes mediating reciprocal reactions are upregulated, which would serve no apparent net anabolic or catabolic purpose. This situation could then represent a means to dissipate excess energy [57-59]. Such "futile" metabolic cycles have been observed by other investigators, notably in lipid metabolism [60-62] in the setting of increased energy expenditure [30; 63; 64]. This "futile" cycle might also serve important functions under various conditions such as thermogenesis and metabolic signaling.

Lipids were not the only energetic substrates to be handled differently in *Kcc3*^{KO} mice. We observed a striking increase in glucose tolerance in our model, along with several indications of improved insulin sensitivity. Indeed, the lower fasting glycemia, the curtailed glycemic excursion and the reduced AUC of corrected glycemia during the OGTT are robust indicators of improved glucose tolerance [65-67]. The lower plasma concentrations of insulin and C-peptide during the test argue for an improved insulin sensitivity as a central underlying mechanism, although this was not tested specifically. In this regard, the hypermetabolic phenotype of *Kcc3*^{KO} mice could lead to increased glucose uptake and oxidation by peripheral tissues.

There is growing evidence to suggest that CCC family members play an important role in glucose homeostasis, notably through their pancreatic expression and implication in Cl⁻ efflux-mediated insulin secretion [68; 69]. Within the CCC family, Na-K-Cl cotransporters (NKCCs) typically show opposite localization and reciprocal function relative to KCCs, and as such, in pancreatic β cells, they are confirmed Cl⁻ loaders while some KCCs are putative Cl⁻ extruders. However, conflicting results were obtained in vivo: the *Nkcc1*^{KO} model shows increased glucose tolerance and insulin secretion [70], while the *Nkcc2a*^{KO} model suffers notably from impaired glucose tolerance [71]. Along the same line, pharmacological inhibition of KCCs in MIN6 cells and islets have been shown to stimulate insulin secretion, while pharmacological stimulation of KCCs in MIN6 cells exert the opposite effect [72].

In our study, *Kcc3* inactivation was associated with lower glucose-stimulated insulin secretion. This finding was unexpected based on the in vitro and ex vivo studies by Kursan *et al.* [72], but would be consistent with previous observations that NKCC1 and KCC3 often exert reciprocal effects in a same cell type [9; 73; 74]. In addition, our results were obtained in constitutively inactivated mice, where additional physiological regulatory mechanisms are elicited in response to oral administration of glucose, namely those mediated by incretins [75]. Notably, upon genetic inactivation, the activity of CCCs [71; 76] and other interactors might have been the object of compensatory changes compared to acute pharmacological inhibition.

Ion transport systems are known to play critical roles in the specific operations of any given cell type [77; 78], and the same holds true in the case of most CCC family members [1; 2; 79-81]. As KCC3 is not expressed only in neurons and pancreatic cells but in adipocytes, myocytes, and enterocytes, one could presume that its inactivation or activation in these cell types could exert important effects in various metabolic processes [8]. In this regard, we have established new links between KCC3 activity and energy expenditure, lipid metabolism and response to a HFD. Thus, our findings should open new lines of research in the field of ion-dependant metabolic processes that could be useful in the development of novel therapeutic avenues.

In conclusion, we have characterized a mouse model of HMSN/ACC in which high levels of locomotor activity coupled to an energy-wasting substrate cycle are most likely responsible for a phenotype of increased energy expenditure and that this hypermetabolic phenotype confers benefits

for energetic substrates processing. Although the severe neurologic burden that affects patients with HSMN/ACC is well characterized, little is still known regarding the metabolic features that could arise while the disease progresses. Our findings warrant further metabolic investigation of patients affected with HSMN/ACC to determine whether they could lead the way to additional management options in this disorder.

Acknowledgments

Measurements of plasma C-peptide, insulin and triglycerides were performed by the Cellular Physiology Core Facility from the CRCHUM.

This work was supported by research grants from the Fondation des Jumelles Coudé, the Grand Défi Pierre Lavoie, the Fondation du CHU de Québec, the Kidney Foundation of Canada and the Cardiometabolic Health, Diabetes and Obesity Network.

APG was supported by doctoral scholarships from the Canadian Institutes of Health Research (GSD-146238), Fonds de recherche du Québec – Santé (31733), Société québécoise d'hypertension artérielle, Diabète Québec, Corporation de recherche et d'action sur les maladies héréditaires, CRCHUM and Université de Montréal.

PE was supported by two annual University Undergraduate Student Research Awards (499393) from Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada.

Declarations of interest

None

Tables and figures with captions

Table 1. Time allocated daily to different categories of activities.

		Time spent quiet (h)	Time spent walking (h)	Time spent eating (h)	Time spent drinking (h)
Nocturnal	WT	8,35 ± 0,18	1,583 ± 0,068	2,47 ± 0,20	0,576 ± 0,054
	KO	6,45 ± 0,44 §	2,37 ± 0,16 §	3,42 ± 0,27 *	0,506 ± 0,095
Diurnal	WT	11,199 ± 0,074	0,257 ± 0,022	0,434 ± 0,067	0,0463 ± 0,0057
	KO	10,44 ± 0,21 *	0,645 ± 0,048 §	0,562 ± 0,066	0,0603 ± 0,0154

Data presented as mean ± SEM ($n = 12-13$). * $p < 0.05$, § $p < 0.001$ compared to WT.

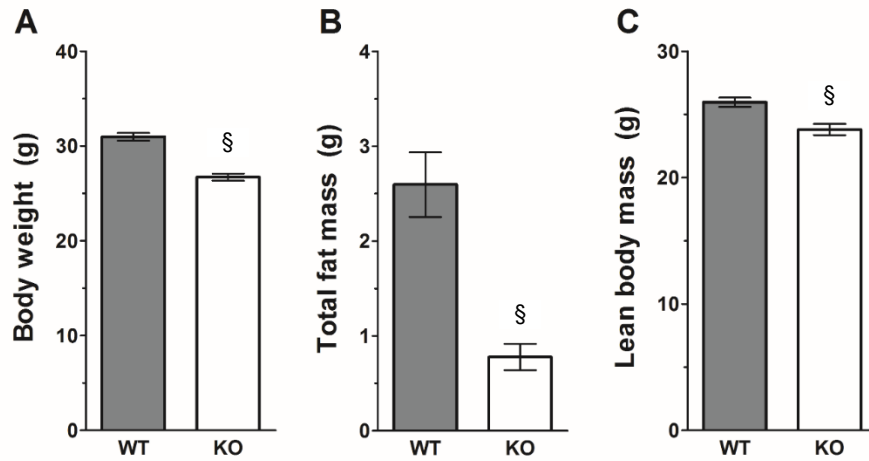


Figure 1. Body composition.

A, Body weight at 19-24 weeks of age. **B**, Total fat mass. **C**, Lean body mass. Data presented as mean \pm SEM ($n = 13$). § $p < 0.001$ compared to WT.

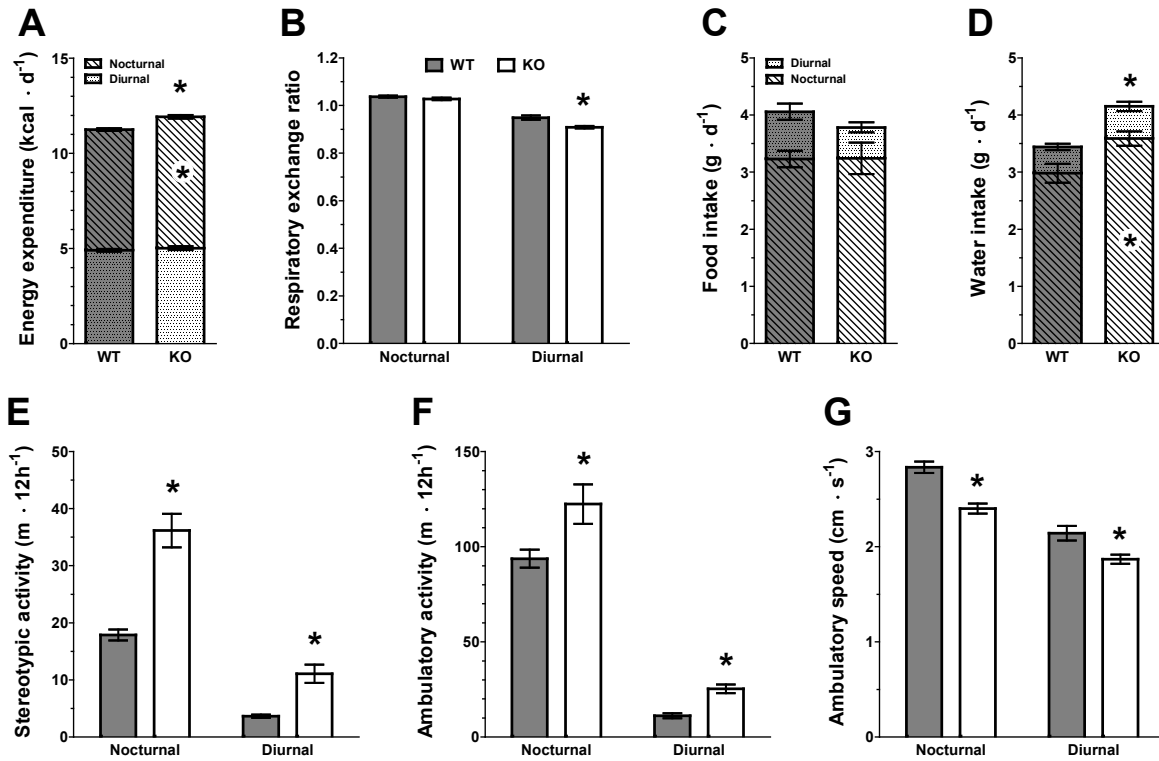


Figure 2. Metabolic cages measurements.

Indirect calorimetry-based measurements of total daily energy expenditure (**A**) and average respiratory exchange ratio (**B**). Total daily food (**C**) and water intake (**D**). **E**, Stereotypic activity expressed as distance moved. **F**, Ambulatory activity expressed as distance traveled. **G**, Mean ambulatory speed. In A, C and D, nocturnal and diurnal data are stacked. Data presented as mean \pm SEM ($n = 12-13$). * $p < 0.05$ compared to WT.

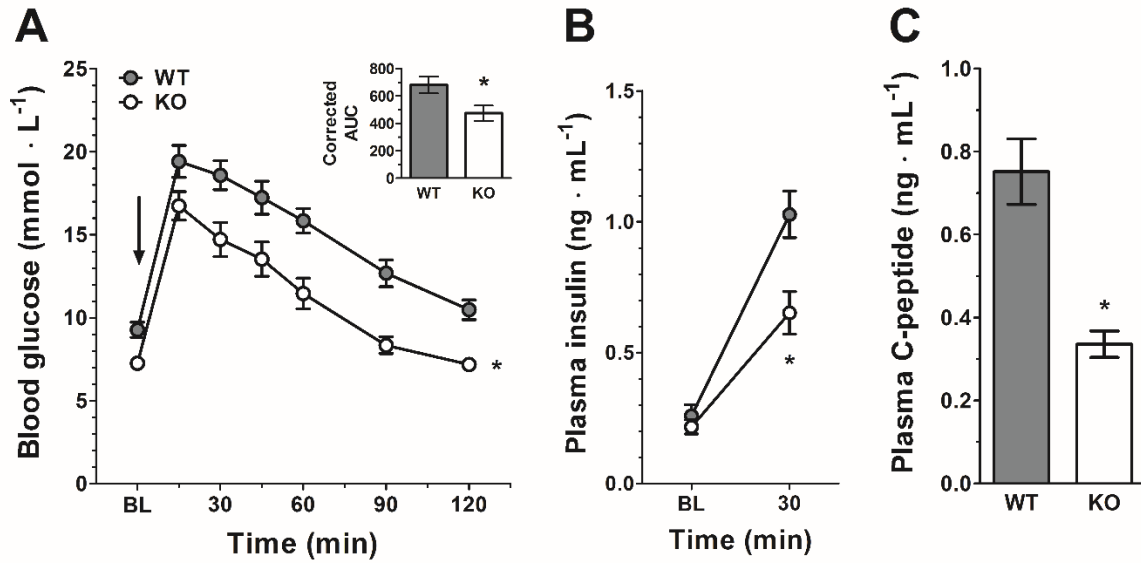


Figure 3. Oral glucose tolerance test.

A, Glycemic response to oral administration of glucose (arrow). Inset, Area under the curve corrected for individual baseline glycemia. **B**, Circulating insulin levels during the test. **C**, Circulating C-peptide levels 30 min after glucose administration. Data presented as mean \pm SEM ($n = 7-10$). BL, baseline. AUC, area under curve. * $p < 0.05$ compared to WT.

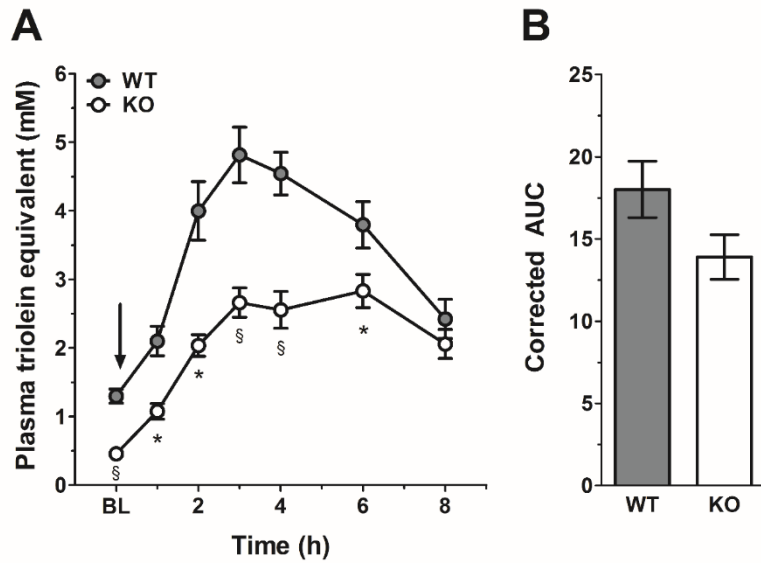


Figure 4. Oral lipid tolerance test.

A, Excursion of plasma triglycerides in response to oral administration of olive oil (arrow) expressed as triolein equivalent. **B**, Area under the curve corrected for individual baseline triglyceridemia. Data presented as mean \pm SEM ($n = 10-15$). BL, baseline. AUC, area under curve.

* $p < 0.05$, § $p < 0.001$ compared to WT.

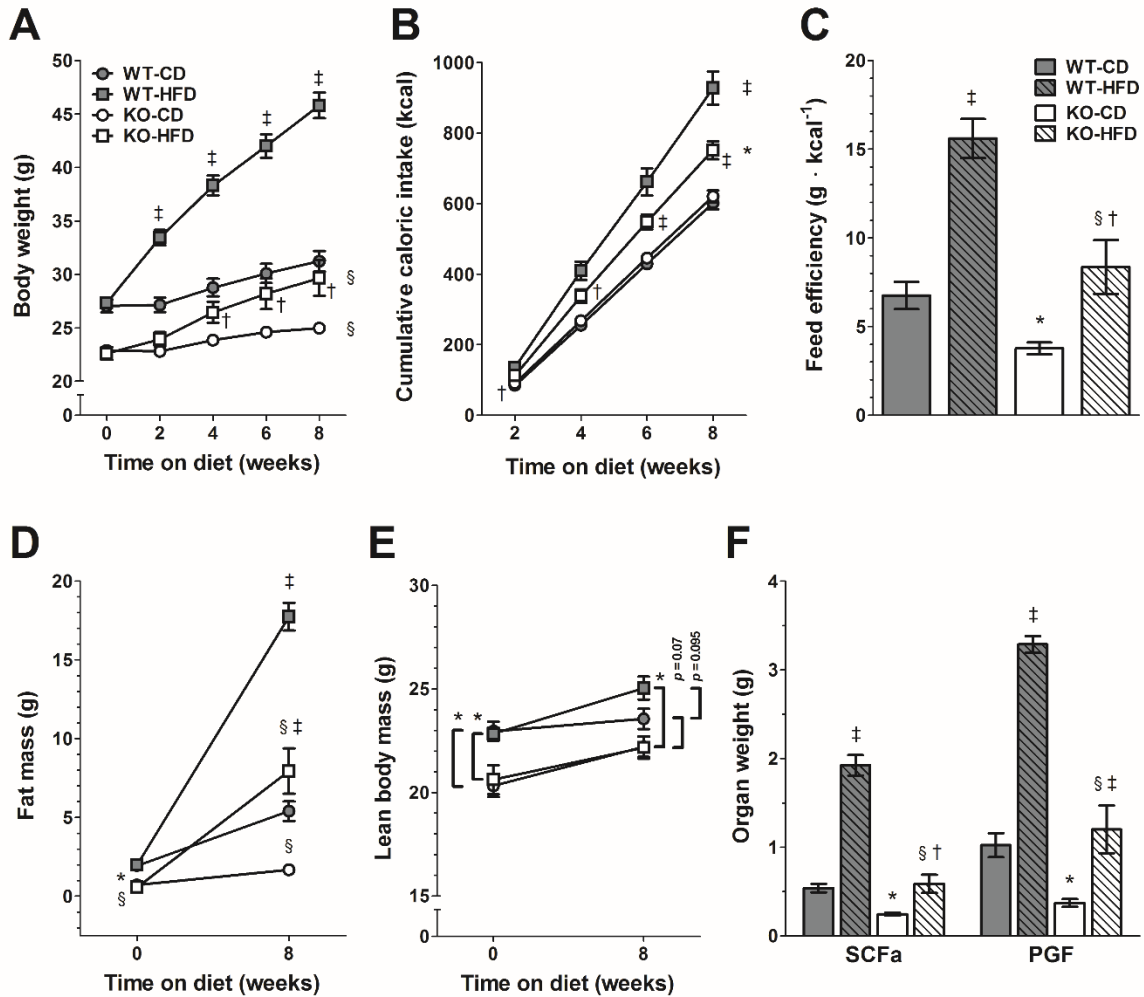


Figure 5. Body weight and composition as well as food consumption in response to a high-fat diet.

Body weight (**A**) and cumulative caloric intake (**B**) during the protocol. **C**, Feed efficiency over the duration of the protocol. **D**) and lean body mass (**E**) before and after the feeding protocol. **F**, Weight of adipose depots after the feeding protocol. Data presented as mean \pm SEM ($n = 8-15$). CD, control diet. HFD, high-fat diet. PGF, perigonadal fat. SCFa, abdominal subcutaneous fat. * $p < 0.05$, § $p < 0.001$ compared to WT; † $p < 0.05$, ‡ $p < 0.001$ compared to CD.

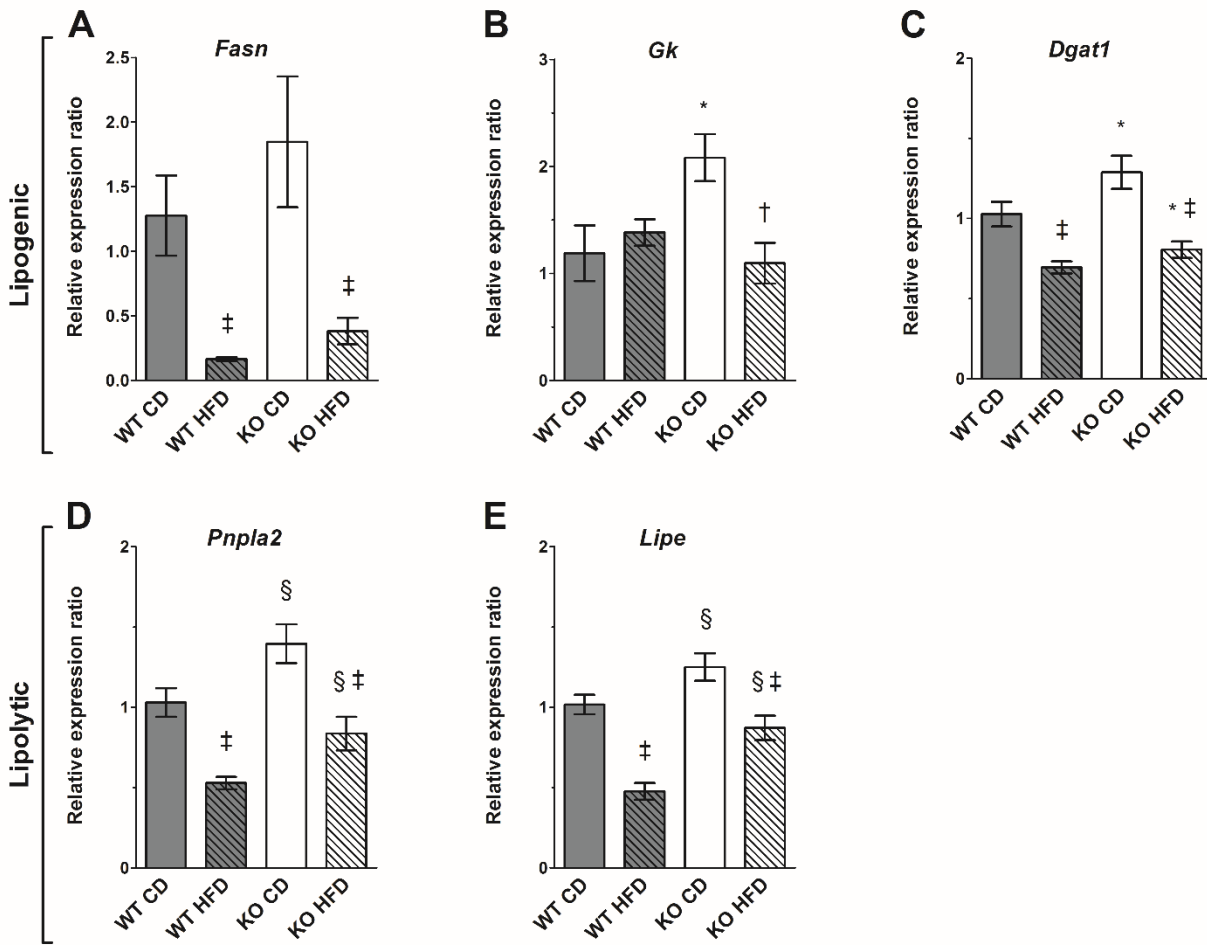


Figure 6. Lipogenic and lipolytic gene expression profile of visceral fat in mice after a high-fat diet.

Relative mRNA expression ratios of lipogenic enzymes *Fasn* (A), *Gk* (B), and *Dgat1* (C) as well as lipolytic enzymes *Pnpla2* (D) and *Lipe* (E) in perigonadal fat. Data presented as mean \pm SEM ($n = 8-10$). CD, control diet. *Dgat1*, diacylglycerol O-acyltransferase 1. *Fasn*, fatty acid synthase. *Gk*, glycerol kinase. HFD, high-fat diet. *Lipe*, lipase, hormone sensitive. *Pnpla2*, adipose triglyceride lipase. *Ppia*, cyclophilin a. See Table S1 for gene names and synonyms. * $p < 0.05$, § $p < 0.001$ compared to WT; † $p < 0.05$, ‡ $p < 0.001$ compared to CD.

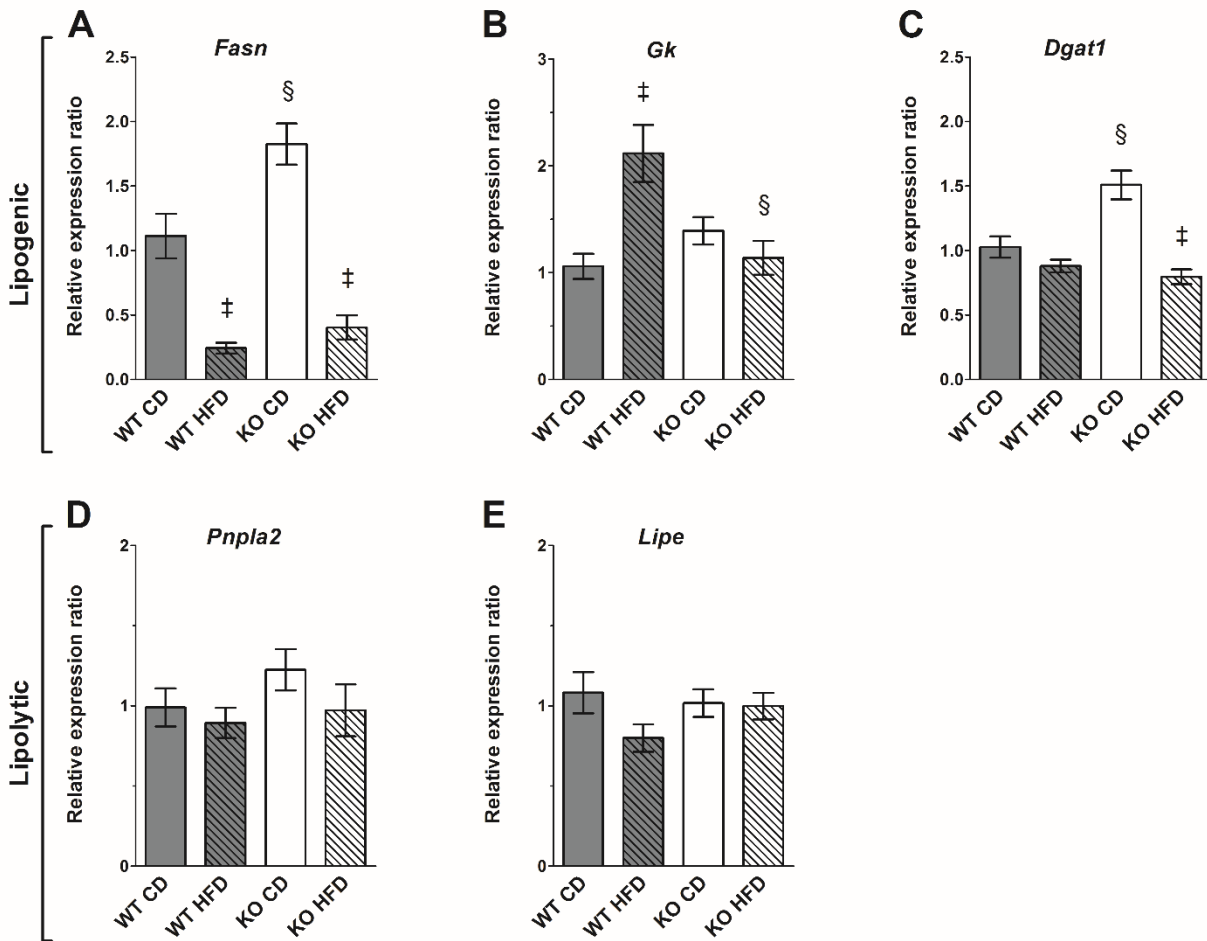


Figure 7. Lipogenic and lipolytic gene expression profile of subcutaneous fat in mice after a high-fat diet.

Relative mRNA expression ratios of lipogenic enzymes *Fasn* (A), *Gk* (B), and *Dgat1* (C) as well as lipolytic enzymes *Pnpla2* (D) and *Lipe* (E) in abdominal subcutaneous fat. Data presented as mean \pm SEM ($n = 8-10$). CD, control diet. *Dgat1*, diacylglycerol O-acyltransferase 1. *Fasn*, fatty acid synthase. *Gk*, glycerol kinase. HFD, high-fat diet. *Lipe*, lipase, hormone sensitive. *Pnpla2*, adipose triglyceride lipase. *Ppia*, cyclophilin a. See Table S1 for gene names and synonyms.

* $p < 0.05$, § $p < 0.001$ compared to WT; † $p < 0.05$, ‡ $p < 0.001$ compared to CD.

Supplemental figures and tables

Table S1. Oligonucleotides used for qPCR

Gene name(s)	Gene symbol	RefSeq of target mRNA	Forward primer sequence	Reverse primer sequence	Reference
Diacylglycerol O-acyltransferase 1	<i>Dgat1</i>	NM_010046.3	GAGCTATCCAGACAACCTGACC	AGCATCTCAAGAACTCGTCGT	Peyot 2010
Fatty acid synthase	<i>Fasn</i>	NM_007988.3	CACAGATGATGACAGGAGATGG	TCGGAGTGAGGCTGGGTTGAT	Misso 2003
Glycerol kinase	<i>Gk</i>	NM_001294140.1 NM_001294138.1 NM_001331046.1 NM_008194.3 NM_212444.2	ATCCGCTGGCTAAGAGACAACC	TGCACTGGGCTCCCAATAAGG	Patsouris 2004
Lipase, hormone sensitive Lipase E Mesoderm-specific transcript	<i>Lipe</i>	NM_010719.5	GGCTCACAGTTACCATCTCACC	GAGTACCTTGCTGTCTGTCC	Shostak 2013
Paternally-expressed gene 1 Adipose triglyceride lipase	<i>Mest</i>	NM_001252292.1	CACACCGACAGAATCTTGGTAGAA	GTTTTTCACCTACAAAGGCCTACG	Kamei 2007
Patatin-like phospholipase domain containing 2	<i>Pnpla2</i>	NM_001163689.1 NM_025802.3	GGGTCTACCACATTGGCGT	GCCTCCTTGGACACCTCAATA	In house
Cyclophilin a Peptidylprolyl isomerase A	<i>Ppia</i>	NM_008907.2	GCGGCAGGTCCATCTACG	GCCATCCAGCCATTCAGTC	Wang 2010

Official gene symbols were retained. When applicable, targeted alternative splice variants are listed. Sequences are written 5' to 3'.

Table S2. Amplitude of naturally-occurring metabolic rates.

	Minimum metabolic rate (kcal · h ⁻¹)	Maximum metabolic rate (kcal · h ⁻¹)
WT	0.318 ± 0.008	0.734 ± 0.012
KO	0.313 ± 0.008	0.734 ± 0.013

Data presented as mean ± SEM ($n = 13$).

Table S3. Feeding and drinking patterns.

	Nocturnal		Diurnal	
	WT	KO	WT	KO
A) Feeding pattern				
Average meal size (mg)	158 ± 12	150 ± 12	177 ± 30	117 ± 13
Number of feeding events	21,38 ± 0,93	22,3 ± 1,5	4,77 ± 0,58	4,67 ± 0,38
Average meal duration (min)	7,08 ± 0,57	9,66 ± 0,91 *	4,98 ± 0,45	7,55 ± 0,83 *
Average inter-feeding interval (min)	27,4 ± 1,7	24,2 ± 2,3	124 ± 12	156 ± 13
Average feeding rate (mg · min ⁻¹)	23,1 ± 2,0	16,9 ± 2,0 *	35,1 ± 5,5	16,9 ± 2,1 *
Sub-total of food intake (g · 12 h ⁻¹)	3,23 ± 0,14	3,24 ± 0,28	0,83 ± 0,14	0,541 ± 0,088
B) Drinking pattern				
Average amount uptaken per event (mg)	80,4 ± 5,8	103,1 ± 7,1 *	87,4 ± 9,6	102,7 ± 6,6
Number of drinking events	38,7 ± 2,2	37,1 ± 2,8	5,46 ± 0,53	5,46 ± 0,64
Average drinking event duration (min)	0,898 ± 0,073	0,89 ± 0,23	0,494 ± 0,043	0,68 ± 0,13
Average inter-drinking event interval (min)	18,4 ± 1,2	18,8 ± 1,5	116 ± 11	136 ± 30
Average drinking rate (mg · min ⁻¹)	99 ± 13	160 ± 22 *	201 ± 32	190 ± 23
Sub-total of water intake (g · 12 h ⁻¹)	2,98 ± 0,17	3,59 ± 0,13 *	0,461 ± 0,058	0,563 ± 0,082

Data presented as mean ± SEM (*n* = 12-13). * *p* < 0.05 compared to WT.

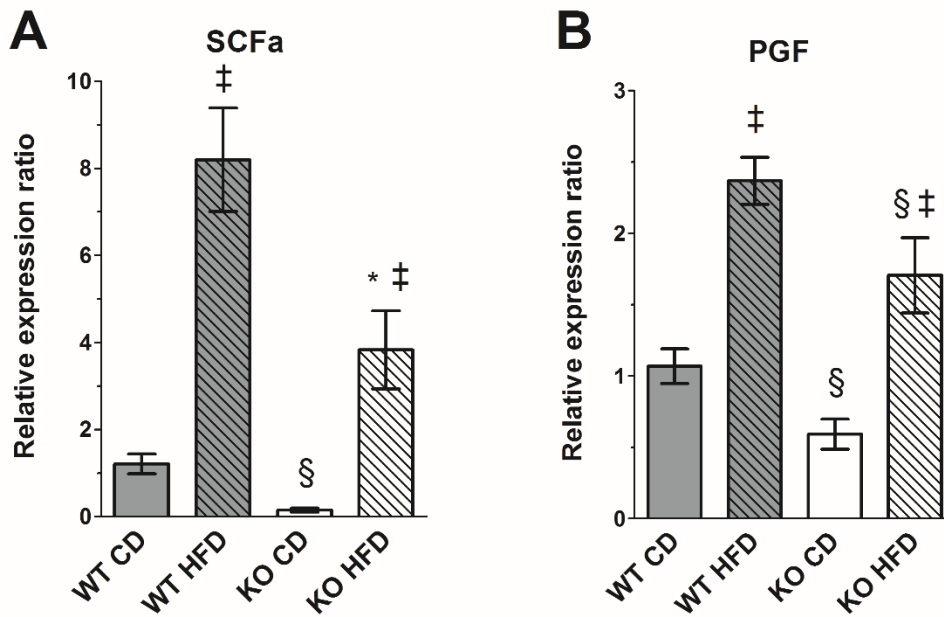


Figure S1. Expression of *Mest* gene in mice after a high-fat diet.

Relative mRNA expression ratio of the gene in abdominal subcutaneous fat (A) and perigonadal fat (B). Data presented as mean \pm SEM ($n = 8-10$). CD, control diet. HFD, high-fat diet. *Mest*, mesoderm-specific transcript protein. See Table S1 for gene name and synonyms. * $p < 0.05$, § $p < 0.001$ compared to WT; ‡ $p < 0.001$ compared to CD.

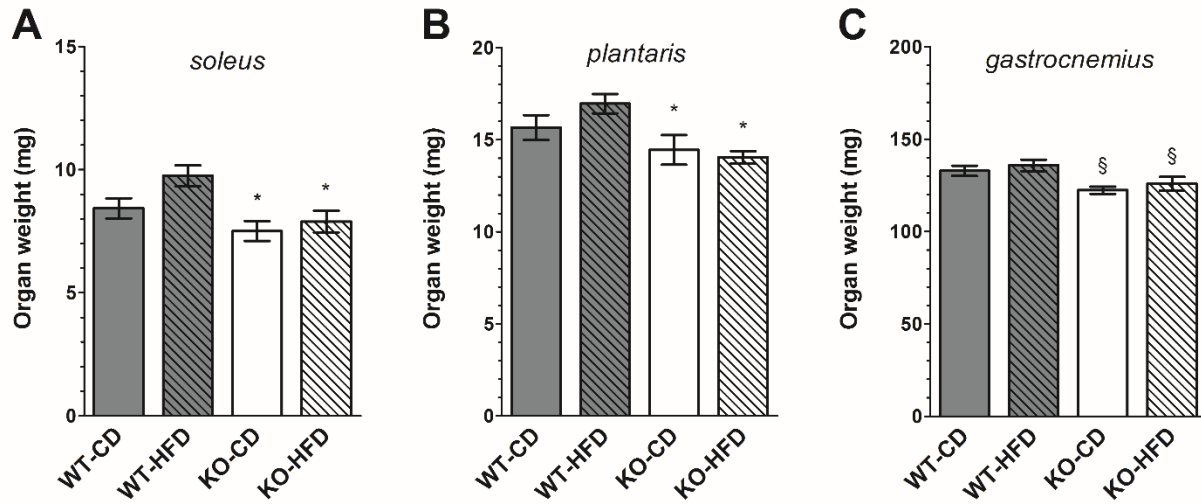


Figure S2. Weight of hind limb muscles after a high-fat diet.

Wet weight of left *soleus* (A), *plantaris* (B) and *gastrocnemius* (C) muscles at necropsy. Data presented as mean \pm SEM ($n = 11-15$). CD, control diet. HFD, high-fat diet. * $p < 0.05$, § $p < 0.001$ compared to WT.

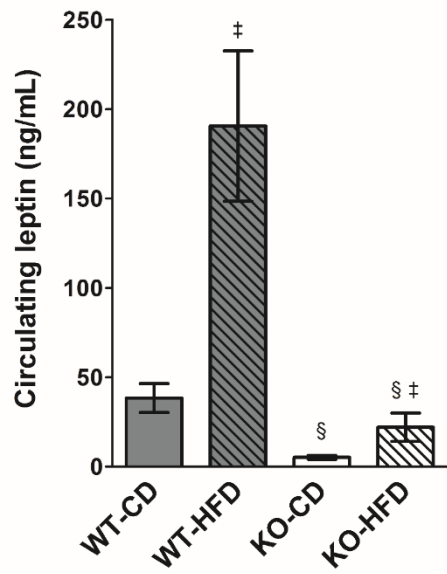


Figure S3. Circulating leptin concentrations after a high-fat diet.

Data presented as mean \pm SEM ($n = 7-8$). CD, control diet. HFD, high-fat diet. § $p < 0.001$ compared to WT; ‡ $p < 0.001$ compared to CD.

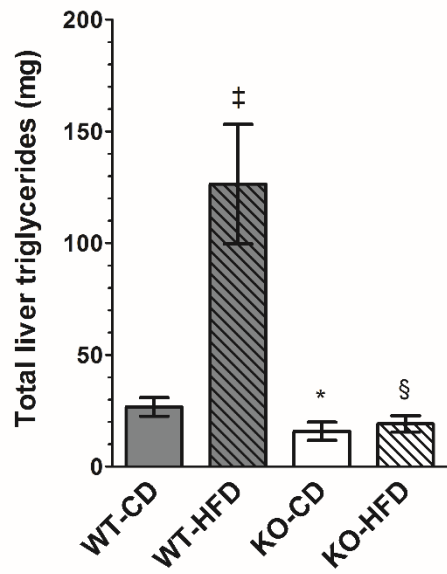


Figure S4. Liver triglyceride content after a high-fat diet.

Data presented as mean \pm SEM ($n = 9-10$). CD, control diet. HFD, high-fat diet. * $p < 0.05$, § $p < 0.001$ compared to WT; ‡ $p < 0.001$ compared to CD.

References

- [1] Gamba, G., 2005. Molecular physiology and pathophysiology of electroneutral cation-chloride cotransporters. *Physiol Rev* 85(2):423-493.
- [2] Gagnon, K.B., Delpire, E., 2013. Physiology of SLC12 transporters: lessons from inherited human genetic mutations and genetically engineered mouse knockouts. *American Journal of Physiology - Cell physiology* 304(8):C693-714.
- [3] Hiki, K., D'Andrea, R.J., Furze, J., Crawford, J., Woollatt, E., Sutherland, G.R., et al., 1999. Cloning, characterization, and chromosomal location of a novel human K⁺-Cl⁻ cotransporter. *J Biol Chem* 274(15):10661-10667.
- [4] Mount, D.B., Mercado, A., Song, L., Xu, J., George, A.L., Jr., Delpire, E., et al., 1999. Cloning and characterization of KCC3 and KCC4, new members of the cation-chloride cotransporter gene family. *J Biol Chem* 274(23):16355-16362.
- [5] Race, J.E., Makhlof, F.N., Logue, P.J., Wilson, F.H., Dunham, P.B., Holtzman, E.J., 1999. Molecular cloning and functional characterization of KCC3, a new K-Cl cotransporter. *Am J Physiol* 277(6):C1210-1219.
- [6] Pearson, M.M., Lu, J., Mount, D.B., Delpire, E., 2001. Localization of the K⁺-Cl⁻ cotransporter, KCC3, in the central and peripheral nervous systems: expression in the choroid plexus, large neurons and white matter tracts. *Neuroscience* 103(2):481-491.
- [7] Mercado, A., Vazquez, N., Song, L., Cortes, R., Enck, A.H., Welch, R., et al., 2005. NH₂-terminal heterogeneity in the KCC3 K⁺-Cl⁻ cotransporter. *Am J Physiol Renal Physiol* 289(6):F1246-1261.
- [8] Garneau, A.P., Marcoux, A.A., Frenette-Cotton, R., Mac-Way, F., Lavoie, J.L., Isenring, P., 2017. Molecular insights into the normal operation, regulation, and multisystemic roles of K⁽⁺⁾-Cl⁽⁻⁾ cotransporter 3 (KCC3). *American Journal of Physiology - Cell physiology* 313(5):C516-C532.

- [9] Garneau, A.P., Marcoux, A.A., Slimani, S., Tremblay, L.E., Frenette-Cotton, R., Mac-Way, F., et al., 2019. Physiological roles and molecular mechanisms of K(+) -Cl(-) cotransport in the mammalian kidney and cardiovascular system: where are we? *The Journal of Physiology* 597(6):1451-1465.
- [10] Lytle, C., McManus, T., 2002. Coordinate modulation of Na-K-2Cl cotransport and K-Cl cotransport by cell volume and chloride. *American Journal of Physiology - Cell physiology* 283(5):C1422-1431.
- [11] Howard, H.C., Dube, M.P., Prevost, C., Bouchard, J.P., Mathieu, J., Rouleau, G.A., 2002. Fine mapping the candidate region for peripheral neuropathy with or without agenesis of the corpus callosum in the French Canadian population. *Eur J Hum Genet* 10(7):406-412.
- [12] Howard, H.C., Mount, D.B., Rochefort, D., Byun, N., Dupre, N., Lu, J., et al., 2002. The K-Cl cotransporter KCC3 is mutant in a severe peripheral neuropathy associated with agenesis of the corpus callosum. *Nat Genet* 32(3):384-392.
- [13] Andermann, F., Andermann, E., Joubert, M., Karpati, G., Cartpenter, S., Melançon, D., 1972. Familial agenesis of the corpus callosum with anterior horn cell disease: a syndrome of mental retardation, areflexia and paraparesis. *Trans Am Neurol Assoc* 97:242-244.
- [14] Larbrisseau, A., Vanasse, M., Brochu, P., Jasmin, G., 1984. The Andermann syndrome: agenesis of the corpus callosum associated with mental retardation and progressive sensorimotor neuronopathy. *The Canadian Journal of Neurological Sciences* 11(2):257-261.
- [15] Menkes, J.H., Philippart, M., Clark, D.B., 1963. Hereditary Partial Agensis of the Corpus Callosum. *Biochemical and Histological Studies. Trans Am Neurol Assoc* 88:240-243.
- [16] Trevi, G.P., Marini, A., Sheiban, I., Benussi, P., Caobelli, A., Olivari, Z., et al., 1977. [Thoracic pain and dyssynergia of the left ventricle in rheumatic valvulopathies. Correlation with coronary arteriography in 131 patients]. *Boll Soc Ital Cardiol* 22(9):1551-1565.

- [17] Boettger, T., Rust, M.B., Maier, H., Seidenbecher, T., Schweizer, M., Keating, D.J., et al., 2003. Loss of K-Cl co-transporter KCC3 causes deafness, neurodegeneration and reduced seizure threshold. *EMBO J* 22(20):5422-5434.
- [18] Garneau, A.P., Marcoux, A.A., Noel, M., Frenette-Cotton, R., Drolet, M.C., Couet, J., et al., 2016. Ablation of Potassium-Chloride Cotransporter Type 3 (*Kcc3*) in Mouse Causes Multiple Cardiovascular Defects and Isosmotic Polyuria. *PLOS One* 11(5):e0154398.
- [19] Rust, M.B., Faulhaber, J., Budack, M.K., Pfeffer, C., Maritzen, T., Didie, M., et al., 2006. Neurogenic mechanisms contribute to hypertension in mice with disruption of the K-Cl cotransporter KCC3. *Circulation Research* 98(4):549-556.
- [20] Shekarabi, M., Moldrich, R.X., Rasheed, S., Salin-Cantegrel, A., Laganriere, J., Rochefort, D., et al., 2012. Loss of neuronal potassium/chloride cotransporter 3 (*KCC3*) is responsible for the degenerative phenotype in a conditional mouse model of hereditary motor and sensory neuropathy associated with agenesis of the corpus callosum. *J Neurosci* 32(11):3865-3876.
- [21] Rust, M.B., Alper, S.L., Rudhard, Y., Shmukler, B.E., Vicente, R., Brugnara, C., et al., 2007. Disruption of erythroid K-Cl cotransporters alters erythrocyte volume and partially rescues erythrocyte dehydration in SAD mice. *J Clin Invest* 117(6):1708-1717.
- [22] Andermann, E., Andermann, F., Joubert, M., Melancon, D., Karpati, G., Carpenter, S., 1975. Three familial midline malformation syndromes of the central nervous system: agenesis of the corpus callosum and anterior horn-cell disease; agenesis of cerebellar vermis; and atrophy of the cerebellar vermis. *Birth Defects Original Article Series* 11(2):269-293.
- [23] Auer, R.N., Laganriere, J.L., Robitaille, Y.O., Richardson, J., Dion, P.A., Rouleau, G.A., et al., 2016. KCC3 axonopathy: neuropathological features in the central and peripheral nervous system. *Mod Pathol* 29(9):962-976.
- [24] Naiman, J., Fraser, F.C., 1955. Agenesis of the corpus callosum; a report of two cases in siblings. *AMA Arch Neurol Psychiatry* 74(2):182-185.

- [25] Ziegler, E., 1958. [Malignant familial early infantile convulsive disorders, partial relation with aplasia of corpus callosum]. *Helv Paediatr Acta* 13(2):169-184.
- [26] Jacob, E.T., Kantor, E., Shapira, Z., 1973. [En bloc transplantation of both kidneys]. *Harefuah* 85(2):64-66.
- [27] Silver, L.M., 1995. *Mouse genetics: concepts and applications*. Oxford University Press.
- [28] Truett, G.E., Heeger, P., Mynatt, R.L., Truett, A.A., Walker, J.A., Warman, M.L., 2000. High-throughput preparation of PCR-quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and tris (HotSHOT). *Faseb Journal* 14(4):A53-A53.
- [29] Shamansurova, Z., Tan, P., Ahmed, B., Pepin, E., Seda, O., Lavoie, J.L., 2016. Adipose tissue (P)RR regulates insulin sensitivity, fat mass and body weight. *Mol Metab* 5(10):959-969.
- [30] Tan, P., Blais, C., Nguyen, T.M., Schiller, P.W., Gutkowska, J., Lavoie, J.L., 2016. Prorenin/renin receptor blockade promotes a healthy fat distribution in obese mice. *Obesity (Silver Spring)* 24(9):1946-1954.
- [31] Fisette, A., Tobin, S., Decarie-Spain, L., Bouyakdan, K., Peyot, M.L., Madiraju, S.R.M., et al., 2016. alpha/beta-Hydrolase Domain 6 in the Ventromedial Hypothalamus Controls Energy Metabolism Flexibility. *Cell Rep* 17(5):1217-1226.
- [32] Lark, D.S., Kwan, J.R., McClatchey, P.M., James, M.N., James, F.D., Lighton, J.R.B., et al., 2018. Reduced Nonexercise Activity Attenuates Negative Energy Balance in Mice Engaged in Voluntary Exercise. *Diabetes* 67(5):831-840.
- [33] Lighton, J.R., 2018. *Measuring metabolic rates: a manual for scientists*. Oxford University Press.
- [34] Weir, J.A., 1949. Blood pH as a factor in genetic resistance to mouse typhoid. *J Infect Dis* 84(3):252-274.

- [35] Attané, C., Peyot, M.L., Lussier, R., Poursharifi, P., Zhao, S., Zhang, D., et al., 2016. A beta cell ATGL-lipolysis/adipose tissue axis controls energy homeostasis and body weight via insulin secretion in mice. *Diabetologia* 59(12):2654-2663.
- [36] Douglass, J.D., Malik, N., Chon, S.H., Wells, K., Zhou, Y.X., Choi, A.S., et al., 2012. Intestinal mucosal triacylglycerol accumulation secondary to decreased lipid secretion in obese and high fat fed mice. *Frontiers in Physiology* 3:25.
- [37] Huynh, F.K., Neumann, U.H., Wang, Y., Rodrigues, B., Kieffer, T.J., Covey, S.D., 2013. A role for hepatic leptin signaling in lipid metabolism via altered very low density lipoprotein composition and liver lipase activity in mice. *Hepatology* 57(2):543-554.
- [38] Xu, E., Forest, M.P., Schwab, M., Avramoglu, R.K., St-Amand, E., Caron, A.Z., et al., 2014. Hepatocyte-specific Ptpn6 deletion promotes hepatic lipid accretion, but reduces NAFLD in diet-induced obesity: potential role of PPARgamma. *Hepatology* 59(5):1803-1815.
- [39] Tan, P., Pepin, E., Lavoie, J.L., 2018. Mouse Adipose Tissue Collection and Processing for RNA Analysis. *Journal of Visual Experiments* (131).
- [40] Takahashi, M., Kamei, Y., Ezaki, O., 2005. Mest/Peg1 imprinted gene enlarges adipocytes and is a marker of adipocyte size. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 288(1):E117-E124.
- [41] Perez, L.J., Rios, L., Trivedi, P., D'Souza, K., Cowie, A., Nzirorera, C., et al., 2017. Validation of optimal reference genes for quantitative real time PCR in muscle and adipose tissue for obesity and diabetes research. *Sci Rep* 7(1):3612.
- [42] Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29(9):e45.
- [43] Adragna, N.C., Chen, Y., Delpire, E., Lauf, P.K., Morris, M., 2004. Hypertension in K-Cl cotransporter-3 knockout mice. *Adv Exp Med Biol* 559:379-385.
- [44] Considine, R.V., 2001. Regulation of leptin production. *Rev Endocr Metab Disord* 2(4):357-363.

- [45] Harada, K., Shen, W.J., Patel, S., Natu, V., Wang, J., Osuga, J., et al., 2003. Resistance to high-fat diet-induced obesity and altered expression of adipose-specific genes in HSL-deficient mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285(6):E1182-1195.
- [46] Moraes, R.C., Blondet, A., Birkenkamp-Demtroeder, K., Tirard, J., Orntoft, T.F., Gertler, A., et al., 2003. Study of the alteration of gene expression in adipose tissue of diet-induced obese mice by microarray and reverse transcription-polymerase chain reaction analyses. *Endocrinology* 144(11):4773-4782.
- [47] Li, X., Yang, M., Li, Z., Xue, M., Shangguan, Z., Ou, Z., et al., 2016. *Fructus xanthii* improves lipid homeostasis in the epididymal adipose tissue of rats fed a high-fat diet. *Mol Med Rep* 13(1):787-795.
- [48] Fitzgibbons, T.P., Kelly, M., Kim, J.K., Czech, M.P., 2018. Resistance to diet induced obesity in the apolipoprotein E deficient mouse is associated with an attenuated transcriptional response in visceral fat. *bioRxiv*:494195.
- [49] Bardova, K., Funda, J., Pohl, R., Cajka, T., Hensler, M., Kuda, O., et al., 2020. Additive Effects of Omega-3 Fatty Acids and Thiazolidinediones in Mice Fed a High-Fat Diet: Triacylglycerol/Fatty Acid Cycling in Adipose Tissue. *Nutrients* 12(12).
- [50] Almind, K., Kahn, C.R., 2004. Genetic determinants of energy expenditure and insulin resistance in diet-induced obesity in mice. *Diabetes* 53(12):3274-3285.
- [51] Fengler, V.H., Macheiner, T., Kessler, S.M., Czepukojc, B., Gemperlein, K., Muller, R., et al., 2016. Susceptibility of Different Mouse Wild Type Strains to Develop Diet-Induced NAFLD/AFLD-Associated Liver Disease. *PLOS One* 11(5):e0155163.
- [52] Simon, M.M., Greenaway, S., White, J.K., Fuchs, H., Gailus-Durner, V., Wells, S., et al., 2013. A comparative phenotypic and genomic analysis of C57BL/6J and C57BL/6N mouse strains. *Genome Biol* 14(7):R82.

- [53] Broussolle, E., Borson, F., Gonzalez de Suso, J.M., Chayvialle, J.A., Beylot, M., Chazot, G., 1991. [Increase of energy expenditure in Parkinson's disease]. *Rev Neurol (Paris)* 147(1):46-51.
- [54] Spaans, F., Wagenmakers, A., Saris, W., Reekers, A., Theunissen, P., Cremers, H., 1991. Procainamide therapy, physical performance and energy expenditure in the Schwartz-Jampel syndrome. *Neuromuscul Disord* 1(5):371-374.
- [55] Gaba, A.M., Zhang, K., Marder, K., Moskowitz, C.B., Werner, P., Boozer, C.N., 2005. Energy balance in early-stage Huntington disease. *The American Journal of Clinical Nutrition* 81(6):1335-1341.
- [56] Brunton, L.K., Rice, C.L., 2012. Fatigue in cerebral palsy: a critical review. *Dev Neurorehabil* 15(1):54-62.
- [57] Munakata, K., Ookata, K., Doi, H., Baba, O., Terashima, T., Hirose, S., et al., 2012. Histological demonstration of glucose transporters, fructose-1,6-bisphosphatase, and glycogen in gas gland cells of the swimbladder: is a metabolic futile cycle operating? *Biochem Biophys Res Commun* 417(1):564-569.
- [58] Orman, M.A., Androulakis, I.P., Berthiaume, F., Ierapetritou, M.G., 2012. Metabolic network analysis of perfused livers under fed and fasted states: incorporating thermodynamic and futile-cycle-associated regulatory constraints. *J Theor Biol* 293:101-110.
- [59] Tolla, D.A., Kiley, P.J., Lomnitz, J.G., Savageau, M.A., 2015. Design principles of a conditional futile cycle exploited for regulation. *Mol Biosyst* 11(7):1841-1849.
- [60] Guan, H.P., Li, Y., Jensen, M.V., Newgard, C.B., Stepan, C.M., Lazar, M.A., 2002. A futile metabolic cycle activated in adipocytes by antidiabetic agents. *Nat Med* 8(10):1122-1128.
- [61] Newsholme, E.A., Crabtree, B., 1976. Substrate cycles in metabolic regulation and in heat generation. *Biochem Soc Symp*(41):61-109.

- [62] Prentki, M., Madiraju, S.R., 2008. Glycerolipid metabolism and signaling in health and disease. *Endocr. Rev* 29(6):647-676.
- [63] Worsch, S., Heikenwalder, M., Hauner, H., Bader, B.L., 2018. Dietary n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids upregulate energy dissipating metabolic pathways conveying anti-obesogenic effects in mice. *Nutr Metab (Lond)* 15:65.
- [64] Poursharifi, P., Attane, C., Mugabo, Y., Al-Mass, A., Ghosh, A., Schmitt, C., et al., 2020. Adipose ABHD6 regulates tolerance to cold and thermogenic programs. *JCI Insight* 5(24).
- [65] Alquier, T., Poitout, V., 2018. Considerations and guidelines for mouse metabolic phenotyping in diabetes research. *Diabetologia* 61(3):526-538.
- [66] Ayala, J.E., Samuel, V.T., Morton, G.J., Obici, S., Croniger, C.M., Shulman, G.I., et al., 2010. Standard operating procedures for describing and performing metabolic tests of glucose homeostasis in mice. *Disease Models & Mechanisms* 3(9-10):525-534.
- [67] Bowe, J.E., Franklin, Z.J., Hauge-Evans, A.C., King, A.J., Persaud, S.J., Jones, P.M., 2014. Metabolic phenotyping guidelines: assessing glucose homeostasis in rodent models. *J Endocrinol* 222(3):G13-25.
- [68] Best, L., 2005. Glucose-induced electrical activity in rat pancreatic beta-cells: dependence on intracellular chloride concentration. *The Journal of Physiology* 568(Pt 1):137-144.
- [69] Di Fulvio, M., Brown, P.D., Aguilar-Bryan, L., 2015. Chloride Channels and Transporters in β -Cell Physiology. In: Islam, M.S., editor. *Islets of Langerhans*. Springer Netherlands: Dordrecht, p. 401-451.
- [70] Alshahrani, S., Di Fulvio, M., 2012. Enhanced insulin secretion and improved glucose tolerance in mice with homozygous inactivation of the Na⁽⁺⁾K⁽⁺⁾2Cl⁽⁻⁾ co-transporter 1. *J Endocrinol* 215(1):59-70.
- [71] Kelly, L., Almutairi, M.M., Kursan, S., Pacheco, R., Dias-Junior, E., Castrop, H., et al., 2019. Impaired glucose tolerance, glucagon, and insulin responses in mice lacking the loop

diuretic-sensitive Nkcc2a transporter. *American Journal of Physiology - Cell physiology* 317(4):C843-C856.

- [72] Kursan, S., McMillen, T.S., Beesetty, P., Dias-Junior, E., Almutairi, M.M., Sajib, A.A., et al., 2017. The neuronal K(+)Cl(-) co-transporter 2 (Slc12a5) modulates insulin secretion. *Sci Rep* 7(1):1732.
- [73] Vardi, N., Zhang, L.L., Payne, J.A., Sterling, P., 2000. Evidence that different cation chloride cotransporters in retinal neurons allow opposite responses to GABA. *J Neurosci* 20(20):7657-7663.
- [74] Schulte, J.T., Wierenga, C.J., Bruining, H., 2018. Chloride transporters and GABA polarity in developmental, neurological and psychiatric conditions. *Neurosci Biobehav Rev* 90:260-271.
- [75] Efendic, S., Portwood, N., 2004. Overview of incretin hormones. *Horm Metab Res* 36(11-12):742-746.
- [76] Alshahrani, S., Almutairi, M.M., Kursan, S., Dias-Junior, E., Almiahuob, M.M., Aguilar-Bryan, L., et al., 2015. Increased Slc12a1 expression in beta-cells and improved glucose disposal in Slc12a2 heterozygous mice. *J Endocrinol* 227(3):153-165.
- [77] Kim, J.B., 2014. Channelopathies. *Korean J Pediatr* 57(1):1-18.
- [78] Schumann, T., Konig, J., Henke, C., Willmes, D.M., Bornstein, S.R., Jordan, J., et al., 2020. Solute Carrier Transporters as Potential Targets for the Treatment of Metabolic Disease. *Pharmacol Rev* 72(1):343-379.
- [79] Hebert, S.C., Mount, D.B., Gamba, G., 2004. Molecular physiology of cation-coupled Cl-cotransport: the SLC12 family. *Pflugers Arch* 447(5):580-593.
- [80] Arroyo, J.P., Kahle, K.T., Gamba, G., 2013. The SLC12 family of electroneutral cation-coupled chloride cotransporters. *Mol Aspects Med* 34(2-3):288-298.

[81] Meor Azlan, N.F., Zhang, J., 2020. Role of the Cation-Chloride-Cotransporters in Cardiovascular Disease. *Cells* 9(10).

Article 3 : Blood pressure regulation and renal salt handling in a mouse model inactivated for K-Cl cotransporter type 3

GARNEAU, A. P., PEPIN, É., NOËL, M., ELIAS, P., HAYDOCK, L., COSSETTE, S., LAVOIE, J. L. et ISENRING, P. (2022). Blood pressure regulation and renal salt handling in a mouse model inactivated for K-Cl cotransporter type 3 [Document en preparation].

À soumettre à *Journal of Hypertension*

Contributions des auteurs :

Conception des expériences : APG, ÉP, JLL & PI

Réalisation des expériences : APG, ÉP, MN, PE, LH, SC & JLL

Analyse des résultats : APG, ÉP, MN, PE, SC, PI & JLL

Obtention de financement et de matériel : JLL & PI

Rédaction du manuscrit : APG, JLL & PI

Relecture et approbation du manuscrit : APG, ÉP, MN, PE, LH, SC, JLL & PI

Blood pressure regulation and renal salt handling in a mouse model inactivated for K-Cl cotransporter type 3

Running head: Hydromineral regulation in *Kcc3*^{KO} mice

Alexandre P. GARNEAU^{a,b,c}, Émilie PEPIN^b, Micheline NOËL^c, Pierre ELIAS^{a,b},
Ludwig HAYDOCK^{b,d}, Suzanne COSSETTE^b, Julie L. LAVOIE^{a,b*}, Paul ISENRING^{b,d*}

* Contributed equally to this work

- a. School of Kinesiology and Physical Activity Sciences, Faculty of Medicine, Université de Montréal, PO Box 6128, succursale Centre-ville, Montréal (Québec) H3C 3J7 Canada
- b. Cardiometabolic Axis, Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), 900 Saint-Denis Street, Montréal (Québec) H2X 0A9 Canada
- c. Endocrinology-nephrology axis, Centre de recherche L'Hôtel-Dieu de Québec, 10 McMahon Street, Québec City (Québec) G1R 3S1 Canada
- d. Department of medicine, Faculty of Medicine, Université Laval, 1050 Médecine Avenue, Québec City (Québec) G1V 0A6 Canada

Potential conflicts of interest: None

Correspondance to: Paul Isenring

Centre de recherche L'Hôtel-Dieu de Québec, 10 McMahon Street, Québec City (Québec)
G1R 3S1 Canada

E-mail: paul.isenring@crhdq.ulaval.ca

Abstract

Objectives. K^+ - Cl^- cotransporter type 3 (KCC3) is a basolateral exporter of K and Cl ions with broad tissular expression in the. It is notably found in neurons, renal tubular cells and all types of muscle cells (cardiomyocytes, smooth muscle cells and rhabdomyocytes). Localization and functional studies have indicated that KCC3 could play an important role in salt reabsorption along the proximal nephron and in blood pressure control. However, the mechanisms and the significance of these functions have not been elucidated thoroughly. This work was destined at obtaining further insight into the involvement of KCC3 in global hydromineral homeostasis.

Methods. A constitutive *Kcc3* knock-out mouse was characterized through various measurements to determine its hemodynamic and renal profiles at baseline, under physical or dietary stressors and to assess its preference to salt. Resistive vessels isolated from this model were also tested *ex vivo* to assess their reactivity to vasomodulators and their passive properties.

Results. Compared to WT, nocturnal blood pressure in *Kcc3* knock-out mice was normal at baseline and under salt loading, whereas diurnal blood pressure was slightly lower. Some of these findings were thus unexpected based on the behavior of similar mouse models. However, mutant mice also excreted higher amounts of Na^+ , K^+ and Cl^- in urine compared to WT and exhibited a marked preference for salt. Lastly, small arteries isolated from this model had a normal reactivity to common vasomodulators, but higher compliance.

Conclusions. We found that a subtle form of salt wasting in our *Kcc3* knock-out mouse model could prevent high blood pressure from developing. Whereas KCC3 could play a redundant role in steady-state proximal hydromineral reabsorption, it could be of much greater importance in a process known as glomerulotubular balance or conditions in which salt handling by the nephron is perturbed.

Key Words: hemodynamics, hydrosodic regulation, renal function, arteriolar reactivity

Introduction

[Manuscript in preparation; introduction will be bonified through the obtention of final results]

The cation-chloride cotransporters (CCCs, SLC12A family) play an important role in salt handling by the kidneys. In this family, K-Cl cotransporter type 3 (KCC3) typically acts as a basolateral K-Cl co-exporter that secondarily promotes water efflux (Gamba 2005). KCC3 was shown to be widely distributed in animals, but is expressed at higher levels notably in neurons, endocrine pancreas, proximal tubule (PT) of nephrons as well as smooth, striated and cardiac muscle cells (Garneau 2019). In many of these structures, it was shown to sustain a process known as cellular regulatory volume decrease (RVD) in response to cell swelling (Garneau 2017). However, the precise role of KCC3 in solute and water reabsorption in the kidney remains ill-described.

Mouse models constitutively knocked-out (KO) for *Kcc3* recapitulate the human hereditary motor and sensory neuropathy with or without agenesis of the corpus callosum (HMSN/ACC) and were thus used to investigate the pathophysiological mechanisms contributing to the disease (Howard 2002, Boettger 2003, Shekarabi 2012). Among the *Kcc3*^{KO} mice characterized thus far, extraneurological abnormalities were also reported, including high blood pressure (BP), polydipsia and polyuria (Howard 2002, Boettger 2003, Adragna 2004, Rust 2006, Garneau 2016). The hypertensive phenotype is believed to be driven through neurogenic mechanisms (Rust 2006), but more recent lines of evidence suggest that additional factors could be at play (Garneau 2016, Garneau 2019).

In this study, we have characterized the cardiovascular and hydromineral phenotype of a constitutive *Kcc3*^{KO} mouse model thoroughly purified in an ideal background for cardiometabolic investigation. The approaches used included intra-arterial radiotelemetric BP readings, intake measurements, renal clearance studies and pressurised arteriography, which were conducted under different challenges such as dietary salt overload as well as water and salt deprivation.

We have found in particular that our *Kcc3*^{KO} mice exhibited a mild form of salt wasting and that its BP was unexpectedly normal. These results suggest that our model could have developed adaptation mechanisms to regularize its hypertensive phenotype. The role of KCC3 in the proximal

nephron may thus be most important in the face of environmental cues to sustain glomerulotubular balance.

Methods

Animals

The animals characterized in this work consisted of C57BL/6J mice that were homozygous for a constitutive loss-of-function mutation in *Slc12a6* (*Kcc3*) through which protein translation is limited to exons 1 and 2. Wild-type littermates were also used as controls. Experiments were as per approved by protocol CM19008JLs at the CRCHUM animal facility and the mouse lines were maintained as previously described (Garneau 2016). Mice were housed in 12-h light/dark cycles under controlled conditions of humidity, temperature, low noise and occupancy. Experiments were carried out in males exclusively and after several days of individual housing and *ad libitum* access to water and standard diet (2018 Teklad global 18% protein rodent diet, Envigo, Huntingdon, UK) unless stated otherwise. Animals used in experiments were the offspring of the 14th backcross or more (>99,99% homozygosity; Silver 1995).

Radiotelemetric probe implantation and baseline hemodynamic measurements

At age 17 to 19 weeks, mice were implanted with radiotelemetric probes (TA11-PAC10, Data Sciences International, Saint Paul, MN) for direct measurements of arterial blood pressure (BP) and heart rate (HR) in the left carotid artery and were allowed to recover for 10 day as described previously (Falcao 2009, Lavoie 2006). At age 18 to 20 weeks of age, baseline BP and HR were recorded over 3 days at a sample rate of 10 s every 2 minutes.

Restraint stress test

At age 20 to 23 weeks, continuous hemodynamic measurements were started for 1 h before placing the mice in a plexiglass restrainer (IITC Life Science, Woodland Hills, CA) for 30 min before returning to the housing cage. Recovery of parameters was also monitored for 1 h. For analysis, the first 30 min of the baseline were discarded.

Salt loading protocol

Given the presumed role of KCC3 in renal salt handling, we verified the impact of a dietary supplementation in CaCl on hydromineral regulation and hemodynamic parameters. At age 23 to 25 weeks, mice were switched to a high-salt diet (HSD, 8 % NaCl; TD.03142, Envigo, Huntingdon, UK) for 23 days while they still had access to water *ad libitum* (see schematic protocol in Fig 3A).

During this period, blood was drawn from tail vein and urine collected between 14:00 and 18:00 (during the inactive phase) on the day of diet switch (baseline) and after 23 days on diet. Note that it was not possible to monitor food intake given that the salt-added chow disaggregated substantially. Water intake was monitored as indicated below. 24-h hemodynamic measurements were recorded the day before diet switching, and on days 1, 6, 11, 16 and 21 on the diet.

Salt preference test

A separate group of 25-week-old mice were housed individually for at least 7 days (days -10 to -3) under regular conditions for acclimation (see Fig 4A). Between days -3 and 0 (3 days), mice were exposed to two sources of regular water (SipperSacks from the cage top) for further acclimation. Between days 0 and +3 (3 days), they were provided with a choice of regular water or salted water ($0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$) while position of drinking sources were interchanged daily and while the diet was changed to sodium-depleted diet (0.01-0.02 % NaCl; TD.17023, Envigo, Huntingdon, UK) as described previously (Morimoto 2002). During this interval, liquid intake was monitored as described above and urine was collected on days 0 and +3. Blood was also drawn on days -3 and +3. At the end of protocol, the animals had a cardiac puncture under isoflurane for collection of EDTA-anticoagulated blood and isolation of plasma. An additional group of 25-week-old mice was used to collect corresponding baseline plasma for further dosing as explained below.

Intake measurements

At age 17 to 24 weeks, mice were acclimated for at least 7 days to drip-proof drinking valve lying from the cage top (SipperSack watering system, Edstrom, Avidity Science, Waterford, WI). Chow and water intake was measured regularly by weighing the remaining amounts of food and water using a portable scale ($d = 0.1 \text{ g}$, Ohaus, Parsippany, NJ).

Blood collection.

Blood from tail vein ($\sim 50 \mu\text{L}$ per sample) was collected in heparinized capillaries (Precision, MO) sealed with vinyl putty (Critoseal©, McCormick Scientific LLC, Saint Louis, MO, USA) and kept on ice until centrifugation. Plasma was collected and kept at $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ until further assessment.

Arterial reactivity

Resistive 3rd-order mesenteric arteries were isolated from 27 to 35-week-old animals and mounted on glass capillaries in an arteriograph chamber. The chamber was filled with Krebs-Henseleit buffer (KHB) kept at 38 °C and bubbled with a gas mixture (5 % CO₂, 20 % O₂, 75 % N₂). The vessels were continuously perfused with KHB with incurrent pressure set at 30 mmHg and excurrent pressure set at 25 mmHg. Diameters were measured using a video dimension analyzer (Living Systems Instrumentation, St Albans City, VT, USA). After a 45-min equilibration, the vessels were successively assessed for reactivity to vasoactive drugs to establish dose-response curves to norepinephrine, acetylcholine, sodium nitroprusside and endothelin-1 administered extraluminally. Vessels were stably contracted at ~70% of maximal contraction with norepinephrine right before submission to vasodilating drugs. Assays were interspaced by 30-min washout periods. See Falcao 2009 for more technical details.

Passive vessel properties were also assessed after equilibrating the vessels in Ca-depleted KHB. The vessel was then subjected to increasing perfusion pressures with a constant pressure differential of 5 mmHg. Parameters were calculated after previously published equations (Laurant 1997).

Plasma renin activity and solute concentration

Plasma renin activity was measured as described previously (Shamansurova 2016). [Plasma renin activity and solute concentration determinations are under preparation]

Urinary osmolality

Urine samples diluted in ultrapure water were subjected to freezing point depression measurement using an osmometer (Model 3320, Advanced Instruments, Norwood, MA, USA).

Urinary solute concentration

Urine samples diluted in ultrapure water were assayed by indirect potentiometry to measure Na⁺, K⁺ and Cl⁻ concentrations, and by a creatinine amidohydrolase enzymatic assay to measure creatinine concentration. The concentration of solutes were normalized to that of creatinine from the same sample.

Statistics

Data are shown as mean \pm SEM among the specified separate group sizes. For protocols in which several data points are collected on the same biological entity, repeated measure ANOVAs were performed to verify the effect of each factor or interactions and of individual responses. Tukey *post hoc* tests were conducted when significant interactions were detected. Differences were considered statistically significant if lower than $\alpha = 0.05$ (bilateral).

Results

Baseline hemodynamic parameters

In order to provide a full portrait of the hemodynamic phenotype of our mouse model, we performed baseline measurements of BP and HR after full recovery from telemetric probe implantation, in freely ranging and undisturbed animals, and analyzed the components of BP during nocturnal and diurnal phases (Table 1). In opposition to what had been reported previously (Adragna 2004, Rust 2006, Garneau 2016), we observed no differences between genotypes for nocturnal BP. During the diurnal phase, we measured slightly lower SBP, MAP and DBP in *Kcc3*^{KO} mice compared to WT (3 mmHg). In contrast to what we had measured previously, the weight of the left ventricle was the same between both genotypes (101.0 ± 3.3 mg in WTs vs 92.9 ± 2.7 in KOs as assessed during necropsy, $n = 8$).

Hemodynamic response to restraint stress

To further study the stress-induced response of blood pressure in our model, we monitored hemodynamic parameters during a 30-min restraint stress test (Figure 1). Both WT and *Kcc3*^{KO} mice had sustained increases in BP (~30 mmHg for MAP) during restraint and showed a similar recovery of BP upon release from the restraining device. Heart rate response was also the same for both genotypes.

Reactivity of resistive arteries to vasoactive agents

In order to determine if KCC3 is important for resistance vessel function in our model, we assessed the reactivity of 3rd-order mesenteric arteries to a panel of vasoactive drugs and results are presented in Supplemental Figures S1-S4. There was no difference between genotypes as for the response to epinephrine, acetylcholine, Na-nitroprusside, endothelin-1 or L-Arg.

Mechanics of resistive arteries

In order to further assess the importance of KCC3 for resistive vessel mechanic properties, we evaluated the pressure-diameter relationship of mesenteric arteries in a Ca-depleted environment and calculated mechanical parameters (Figure 2). At physiological values of pressure, vessels from *Kcc3*^{KO} mice had normal anatomic parameters as compared to vessels from WT littermates. The measured changes in vessel diameter and wall thickness in response to pressure increase were

similar between genotypes. The calculated wall stress-pressure relationship was also the same between genotypes. However, at low pressure values, the calculated circumferential strain, compliance and distensibility of the *Kcc3*^{KO} vessels tended to be higher in comparison to WT vessels (Fig 2F-G).

Hemodynamics and renal salt and water handling under a dietary sodium overload

The cardiovascular parameters as well as characteristics of renal salt and water handling in our model were investigated under a HSD challenge to determine whether KCC3 allowed for adaptive responses. The protocol and data are shown in Figure 3. In Figure 3B, one can notice that prolonged dietary salt loading, *Kcc3*^{KO} mice maintained a similar body weight throughout the experiment whereas WT controls lost weight during the acute response to the diet. In Figure 3C, the change in nocturnal systolic blood pressure in response to salt loading is seen to be the same between genotypes. Before and during high-salt feeding, mice had access to ad libitum diets and water. Under normal diet, both genotypes had a similar water intake within normal range. Upon high-salt feeding, water intake increased greatly, and more dramatically so in KO mice. Of notice, the difference between genotypes was greater during the acute response to salt loading (15 vs 12 g · d⁻¹, Figure 3D).

In Figure 3E, urine osmolality is seen to be similarly affected by the diet in the two genotypes. However, *Kcc3*^{KO} mice showed a stronger reduction in urinary creatinine at the end of the dietary challenge (Figure 3F), indicating an increased urine production. It can be further noticed in Figure 3G-H that NaCl excretion is identical between the genotypes under a regular diet, but much higher in the null mouse under a HSD even though it is still increased in WT mouse compared to baseline. These results suggest that KCC3 activity decreases under HSD, but is not completely abrogated. In Figure 3I, lastly, K⁺ excretion is seen to decrease under HSD in WT mice only, while *Kcc3*^{KO} mice maintain the same urinary K⁺ concentration on both diets.

Salt preference test.

Since systemic ablation of KCC3 is linked to some solute wasting from the kidney, especially highlighted under a chronic salt loading, we sought to determine if salt wasting could also lead to higher salt requirements. The protocol and data are presented in Figure 4. When given the choice between regular water and hypertonic saline as their sole salt source, *Kcc3*^{KO} mice showed a higher

preference for saline than WT controls (Figure 4B), which could again indicate a modification in their salt handling mechanisms. Indeed, saline intake represented 47 % of total in KOs, whereas it was only 26 % in WTs. Interestingly, KOs maintained the same water intake as WTs (3.0 vs $2.8 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1}$), but added it with $\sim 2.0 \text{ g}$ more of saline daily. This greater fluid intake also appeared to be linked to some fluid retention as indicated by body weight gain over the course of the experiment (Figure 4C).

Discussion and conclusion

Loss of KCC3 is associated with normal-low blood pressures

In this study, we report normal or low blood pressure in a *Kcc3*^{KO} mouse model thoroughly purified in the C57BL/6J background through radiotelemetric measurements. In a previous study, we had reported a modest 8-mmHg increase in mean arterial pressure as evaluated by sphygmomanometry (Garneau 2016). Although these differences could appear discordant, they were not entirely unexpected given that the methods used to monitor blood pressure were not the same and that the mouse models were not perfectly comparable pertaining to background type and purity. Moreover, the left cardiac hypertrophy initially measured in our model (Garneau 2016) was not detected during this study, which could indicate that hypertension was initially present in the mouse line, but eventually dissipated. Of notice, conflicting results were already observed in the same CCC-inactivated mouse model by the same team as a function of the protocols used (Flagella 1999, Kim 2008).

Resistive vessels from *Kcc3*^{KO} mice are more compliant

3rd-order mesenteric arteries isolated from *Kcc3*^{KO} mice show normal reactivity to epinephrine, acetylcholine, exogenous NO and endothelin-1 and have a normal morphology. However, they differ in their passive properties evaluated in a Ca²⁺-free environment compared to WT vessels. Indeed, vessels from *Kcc3*^{KO} mice show increased circumferential strain, compliance and distensibility. This vascular feature could help *Kcc3*^{KO} mice maintaining a normal or lower blood pressure especially if cardiac output increases transiently.

Loss of KCC3 leads to abnormal response to salt loading

Even though the profile of urinary salt excretion of *Kcc3*^{KO} mice at baseline was comparable to WT, *Kcc3*^{KO} mice exhibited a clear decrease in fractional Cl⁻ reabsorption by the kidney. Given that the main site of expression for KCC3 in the nephron is the proximal tubule, the observed decrease in Cl⁻ reabsorption should therefore be due to a decrease in K-Cl cotransport across this nephron segment. The observed decrease in Cl⁻ reabsorption would also suggest that KCC3 is normally involved in glomerulotubular balance to ensure that tubular reabsorption varies with changes in GFR as can occur through changes in salt ingestion.

At baseline, we did not detect differences in urinary solute concentrations, including creatinine as an inverse indicator of daily diuresis. We had previously reported baseline isoosmolar polyuria in the same mouse model using 8-h collections in diuresis cages (also called metabolic cages). When designing this longer-term experiment, we considered that a point urine collection in standardized conditions would offer a better reflection of the actual kidney function while parameters such as water intake are not affected by housing stress. The slight discrepancies with our previous report are in all likelihood dependant on the nature of the two collecting procedures.

We show no significant difference in 24-h water intake at baseline between genotypes as measured over two weeks. However, in a previous 4-d experiment, we noticed a slight 0,7-g increase in nocturnal water intake in KO compared to WT animals. Drinking pattern analysis revealed a normal number of drinking events, but larger amounts uptaken during the nocturnal phase (Garneau 2021). In our initial characterization of the KO mouse model in diuresis cages, we had measured a 1-g increase in water intake (Garneau 2016), whereas Adragna et al. showed a 1.1-g increase in water intake along with a 157% increase in nocturnal licking activity (Adragna 2004). Methodological differences likely contribute to the variability of the data among these studies. Indeed, short periods of measurements in new environments are likely to yield unusual activity patterns in mice, as could have been the case of previous studies (Adragna 2004, Garneau 2016). The longer reporting period for water intake and the different measurement system could also explain the slight differences with our most recent report (Garneau 2021).

Loss of KCC3 leads to greater appetite for salt

The stronger appetite of *Kcc3*^{KO} mice for salt contrasted with the relative aversion observed in control mice. Given that KCC3 could play an important role in glomerulotubular balance, it would also be expected to play an equally important role in Cl⁻ reabsorption by the proximal nephron under conditions of volume contraction. It is thus tempting to postulate that in the absence of KCC3, both the glomerulotubular balance and salt retaining capacity are compromised. The consequence of it all would then be a tendency to chronic renal salt wasting which could contribute to drive the increased salt intake.

One must remember that KCC3 is also expressed in neurons, those of the hippocampus in particular, that also play a role in regulation of salt appetite (Pearson 2001). KCC3 could also be

expressed in the salt sensing circuitry that links taste buds to the nervous central systems. As such, one cannot exclude that the possibility that increased salt preference could also be contributed for by the absence of KCC3 in these other structures. As salt was only available in the form of a solution during the test, a hedonistic appeal for salt in *Kcc3*^{KO} mice could then explain, at least in part, the increase in fluid intake and would also explain the slight increase in weight during the course of this preference test.

In conclusion, we have found that *Kcc3* inactivation in mouse leads to increased distensibility of small vessels and variable degrees of urinary salt wasting depending on the diet. These vascular and renal mechanisms can play important roles in preventing blood pressure rises and likely contribute to the normal hemodynamic profile measured in our mouse model. It would be interesting to investigate the blood pressure phenotype of patients with HSMN/ACC to determine whether they are susceptible to developing disorders in blood pressure regulation.

Acknowledgements

Measurements of urine solutes were performed by the Biochemistry service from L'Hôtel-Dieu de Québec hospital. Radiotelemetric probes used were made available in a self-service mode.

This work was supported by research grants from the Fondation des Jumelles Coudé, the Grand Défi Pierre Lavoie, the Fondation du CHU de Québec, the Kidney Foundation of Canada and the Cardiometabolic Health, Diabetes and Obesity Network.

APG was supported by doctoral scholarships from the Canadian Institutes of Health Research (GSD-146238), Fonds de recherche du Québec – Santé (31733), Société Québécoise d'hypertension artérielle, Diabète Québec, Corporation de recherche et d'action sur les maladies héréditaires, CRCHUM and Université de Montréal.

PE was supported by two annual University Undergraduate Student Research Awards (499393) from Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada.

Tables and figures

Table 1. Baseline hemodynamic parameters during (A) nocturnal and (B) diurnal phases.

	SBP, mmHg	MAP, mmHg	DBP, mmHg	PP, mmHg	HR, min ⁻¹
A) Nocturnal parameters					
WT	133.9 ± 1.6	118.7 ± 1.2	102.8 ± 1.4	31.0 ± 1.8	585.8 ± 7.3
KO	132.7 ± 1.4	117.86 ± 0.70	101.89 ± 0.97	30.8 ± 2.0	608.6 ± 5.6 *
B) Diurnal parameters					
WT	117.0 ± 0.87	102.98 ± 0.54	88.24 ± 0.99	28.7 ± 1.5	508.6 ± 5.5
KO	114.0 ± 1.1 *	100.07 ± 0.54 *	84.92 ± 0.97 *	29.0 ± 1.7	512.1 ± 6.1

DBP, diastolic blood pressure; HR, heart rate; MAP, mean arterial pressure; PP, pulse pressure; SBP, systolic blood pressure. Data presented as mean ± SEM (n = 13-14) * p < 0.05 vs WT.

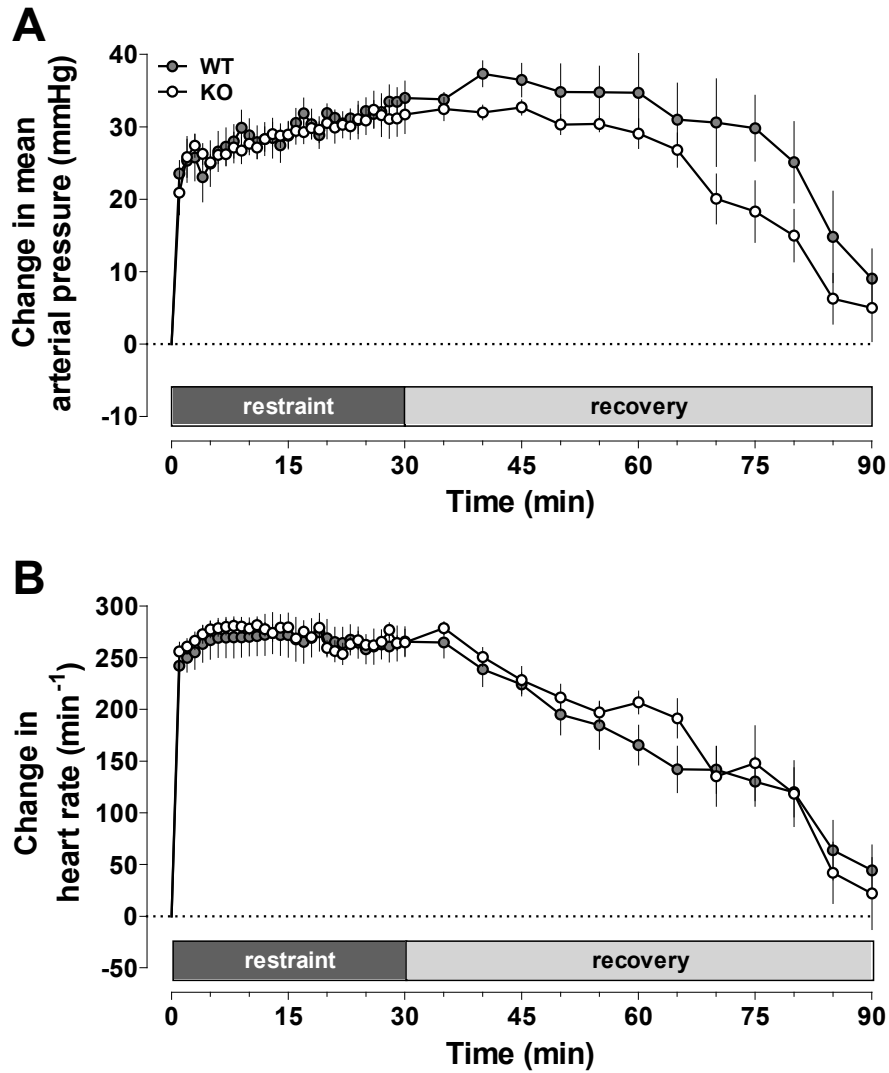


Figure 1. Variation of (A) mean arterial pressure and (B) heart rate over the course of a restraint stress test and during recovery.

Data presented as mean \pm SEM ($n = 5-7$).

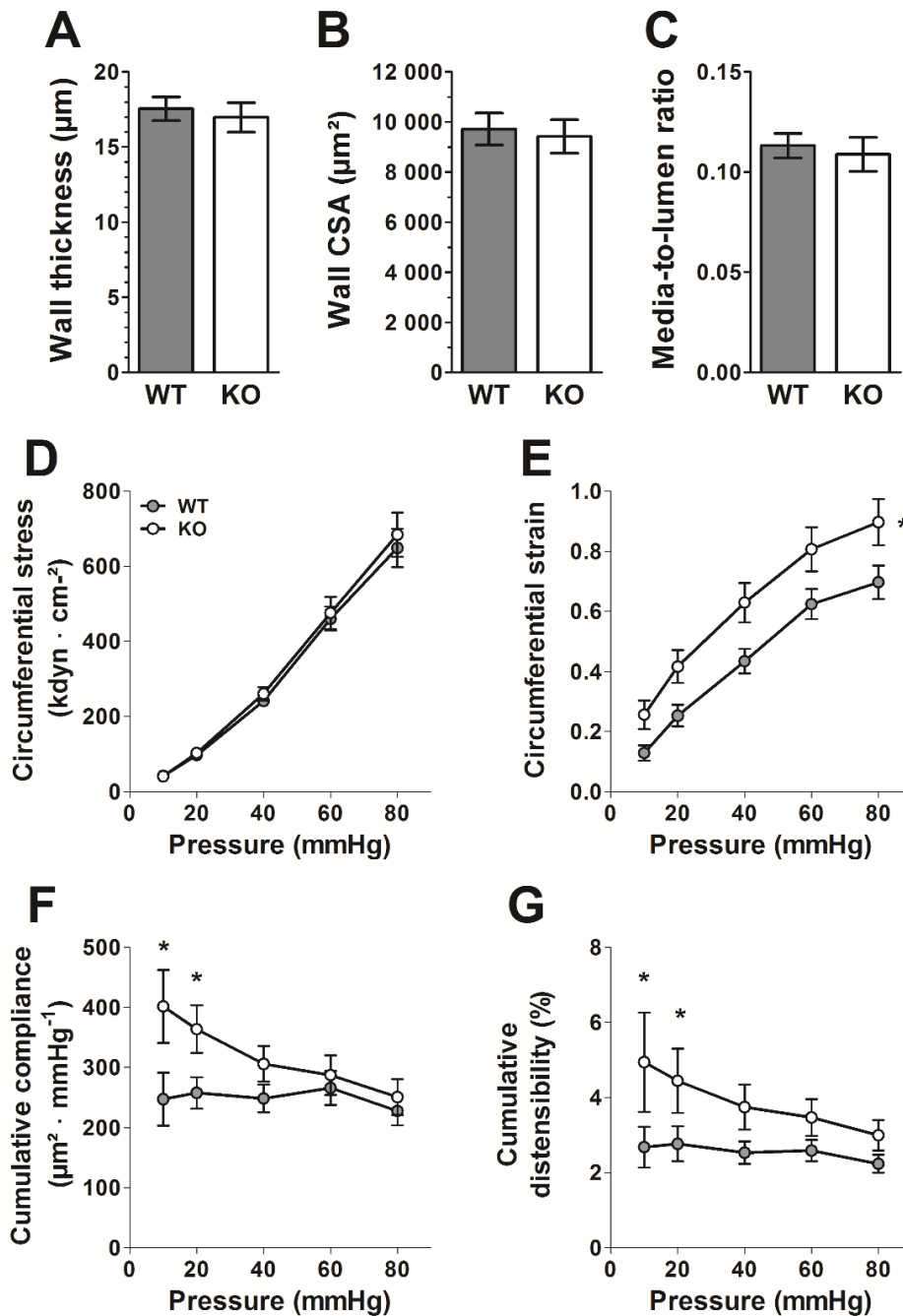


Figure 2. Passive properties of perfused mesenteric 3rd order arteries.

(A) Wall thickness. (B) Wall cross sectional area. (C) Media-to-lumen ratio. (D) Circumferential stress, (E) Circumferential strain, (F) cumulative compliance and (G) Cumulative distensibility in relationship to incurrent perfusion pressure. In A-C, hypertrophy markers were measured at 40 mmHg incurrent pressure. Data presented as mean \pm SEM ($n = 12-16$) * $p < 0.05$ vs WT.

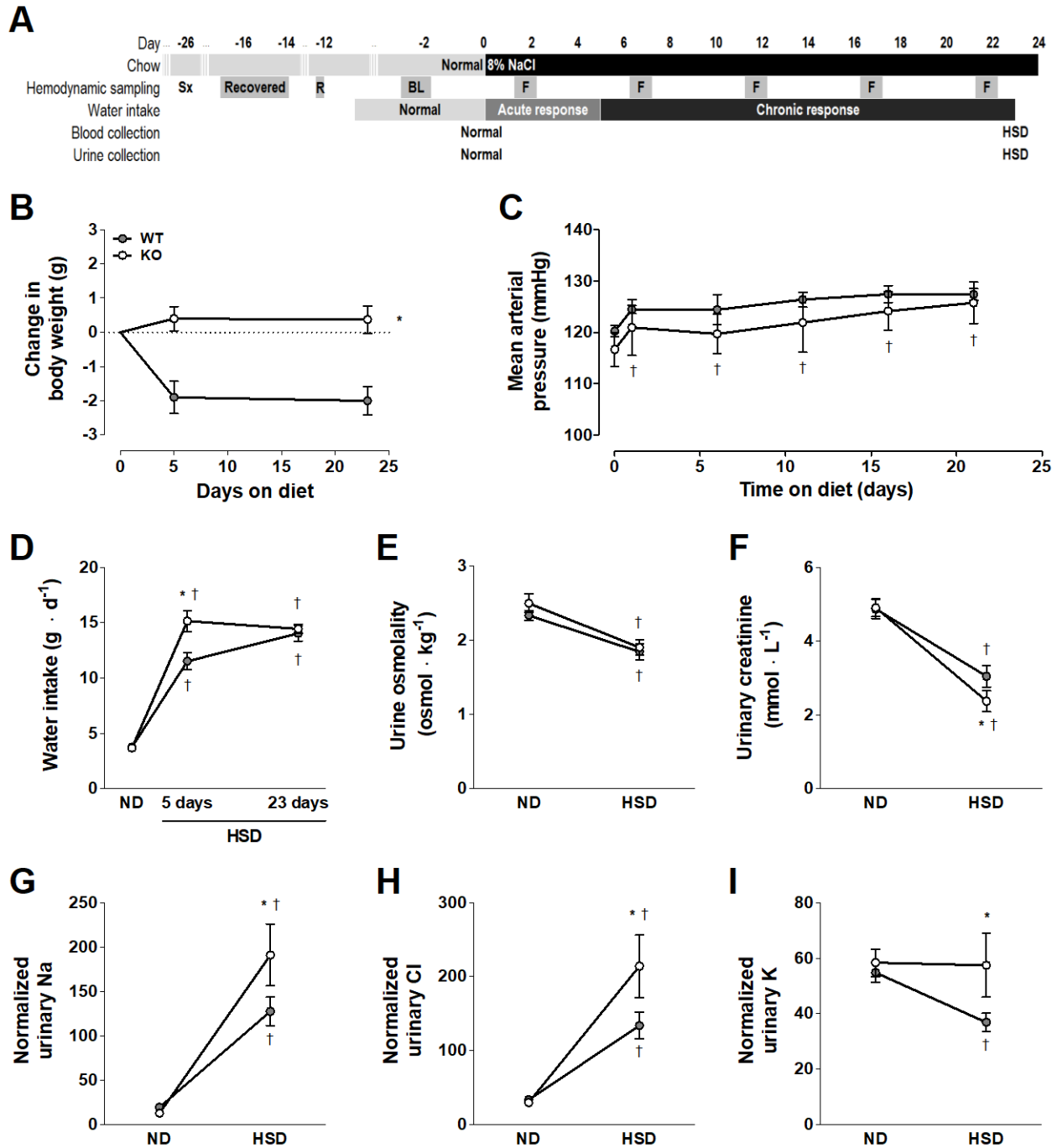


Figure 3. Response to dietary salt loading.

(A) Schematic protocol. (B) Change in body weight. (C) Change in nocturnal systolic blood pressure. (D) Evolution of water intake. Evolution of urinary (E) osmolality, (F) creatinine, (G) Na, (H) Cl and (I) K. In G-I, solute concentration is normalized to that of creatinine from the same sample. BL, baseline; F, 24-h follow-up readings; HSD, high-salt diet; ND, normal diet; R, restraint

stress test; Sx, vascular surgery. Data presented as mean \pm SEM ($n = 5-18$) * $p < 0.05$ vs WT; † $p < 0.05$ vs ND. *[Additional experiments using collected samples are underway to investigate mechanisms]*

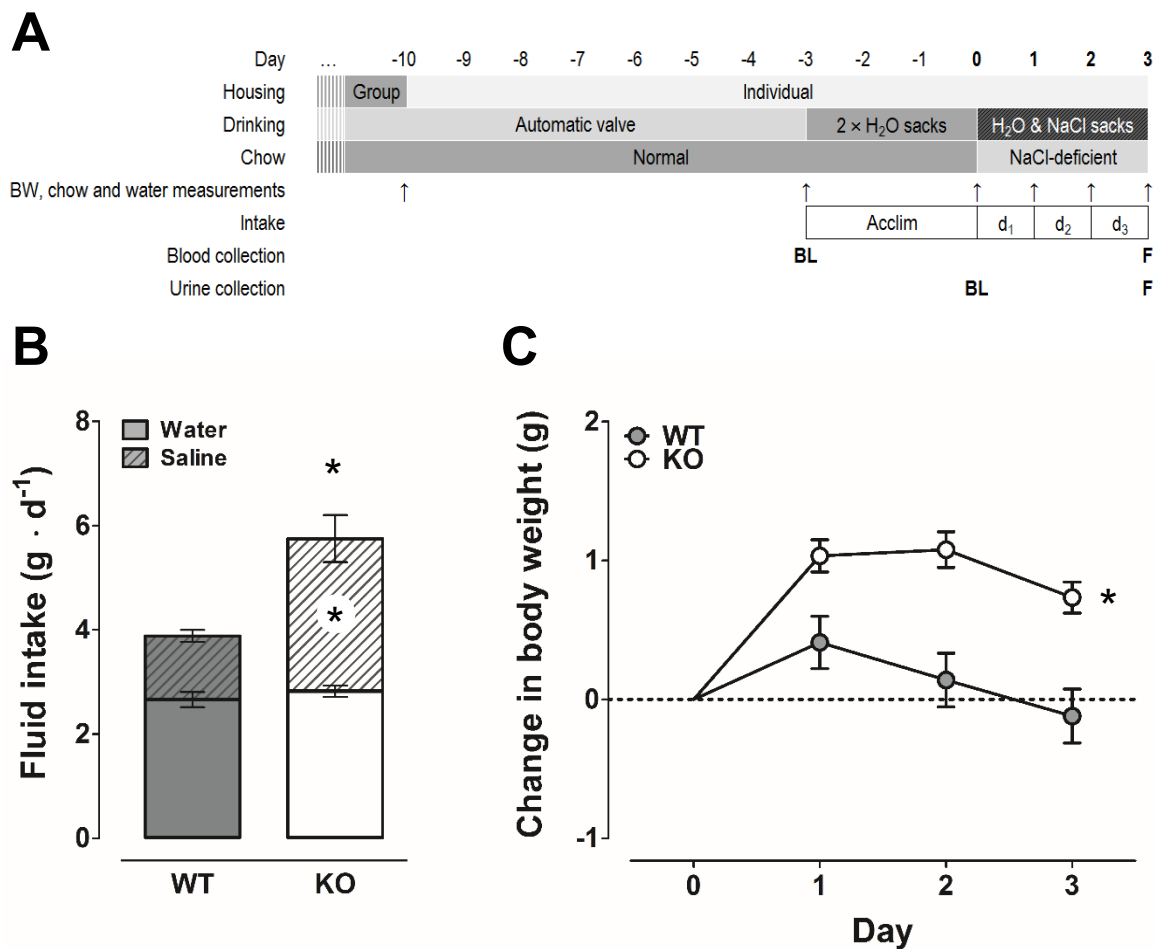


Figure 4. Salt preference test.

(A) Schematic protocol. The test *per se* occurs during the last 72 h. (B) Average daily fluid intake during the test broken down by type. (C) Evolution of body weight during the test. Acclim, acclimation; BL, baseline; d_x, day x; F, final. Data presented as mean ± SEM ($n = 18-20$) * $p < 0.05$ vs WT. [Additional experiments using collected samples are underway to investigate mechanisms]

Supplemental figures

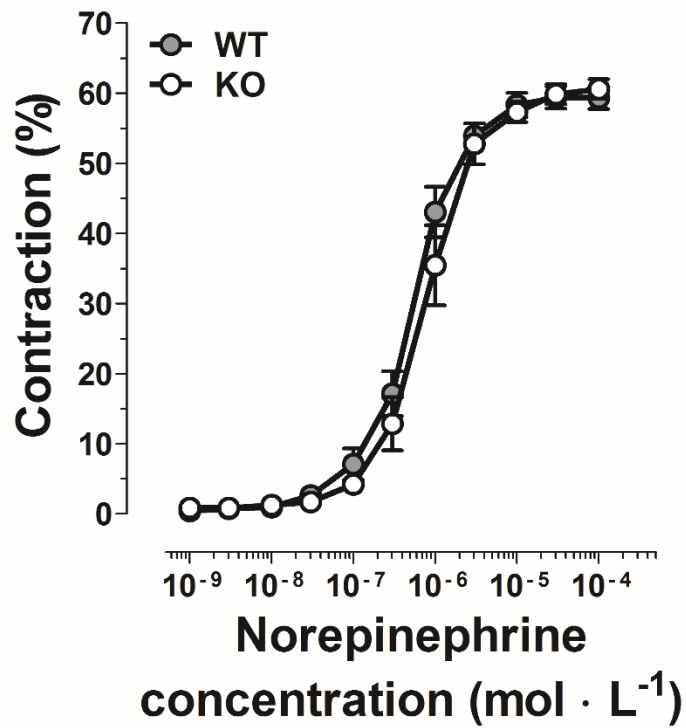


Figure S1. Dose-response curve of the response of resistive mesenteric arteries to norepinephrine.

Data presented as mean \pm SEM ($n = 7-8$).

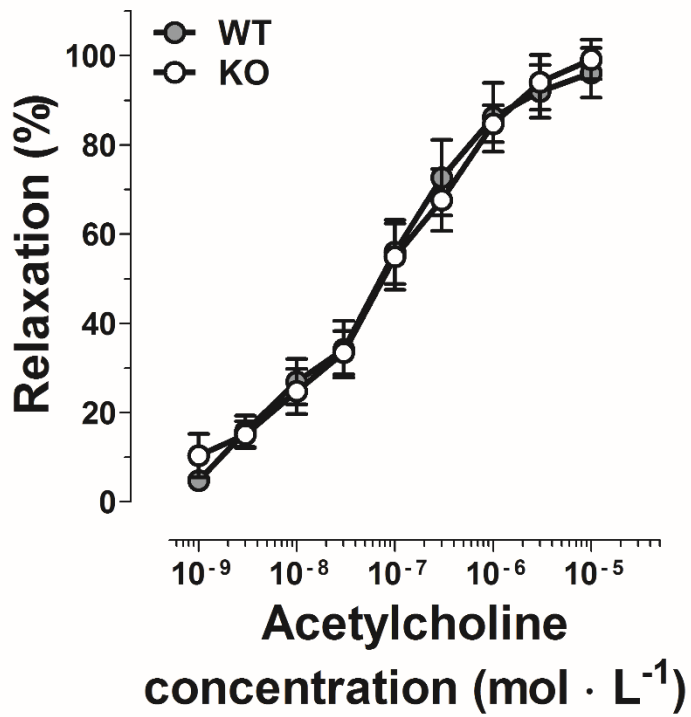


Figure S2. Dose-response curve of the response of resistive mesenteric arteries to acetylcholine.

Vessels were precontracted at ~70 % of maximum with norepinephrine beforehand. Data presented as mean \pm SEM ($n = 7-8$).

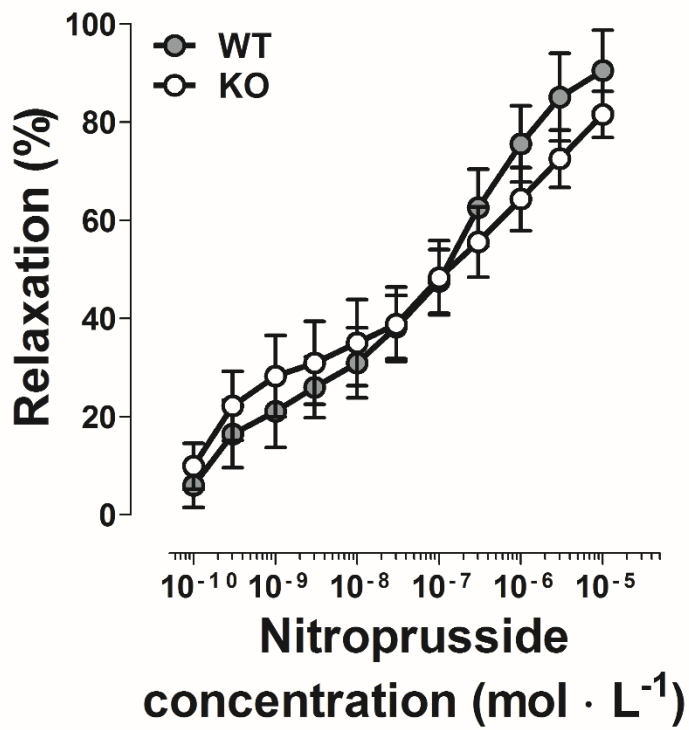


Figure S3. Dose-response curve of the response of resistive mesenteric arteries to sodium nitroprusside.

Vessels were precontracted at ~70 % of maximum with norepinephrine beforehand. Data presented as mean \pm SEM ($n = 7-8$).

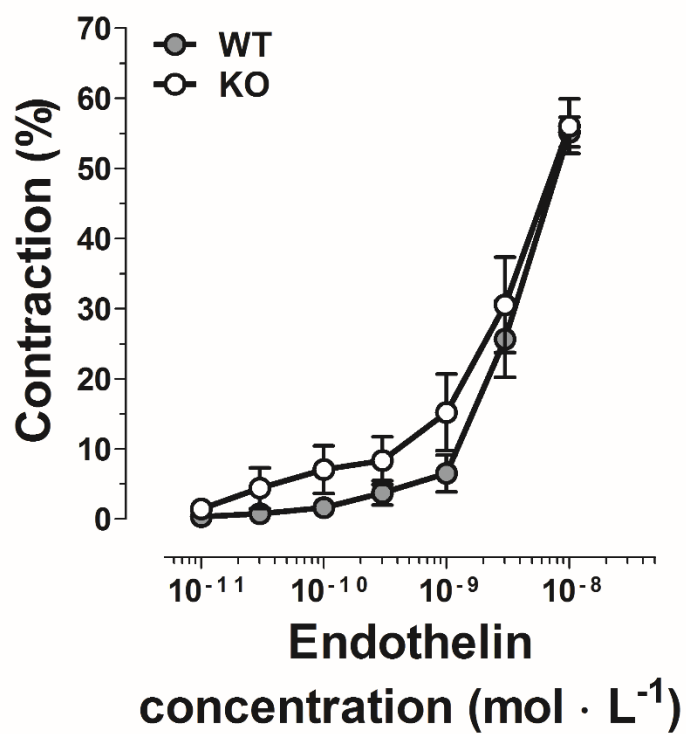


Figure S4. Dose-response curve of the response of resistive mesenteric arteries to endothelin-1.

Data presented as mean \pm SEM ($n = 7-8$).

References

Adragna, N. C., Chen, Y., Delpire, E., Lauf, P. K., & Morris, M. (2004). Hypertension in K-Cl cotransporter-3 knockout mice. In *Cell Volume and Signaling* (pp. 379-385). Springer, Boston, MA.

Boettger, T., Rust, M. B., Maier, H., Seidenbecher, T., Schweizer, M., Keating, D. J., ... & Jentsch, T. J. (2003). Loss of K-Cl co-transporter KCC3 causes deafness, neurodegeneration and reduced seizure threshold. *The EMBO journal*, *22*(20), 5422-5434.

Falcao, S., Solomon, C., Monat, C., Bérubé, J., Gutkowska, J., & Lavoie, J. L. (2009). Impact of diet and stress on the development of preeclampsia-like symptoms in p57kip2 mice. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, *296*(1), H119-H126.

Flagella, M., Clarke, L. L., Miller, M. L., Erway, L. C., Giannella, R. A., Andringa, A., ... & Shull, G. E. (1999). Mice lacking the basolateral Na-K-2Cl cotransporter have impaired epithelial chloride secretion and are profoundly deaf. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(38), 26946-26955.

Gamba, G. (2005). Molecular physiology and pathophysiology of electroneutral cation-chloride cotransporters. *Physiological reviews*, *85*(2), 423-493.

Garneau, A. P., Marcoux, A. A., Noël, M., Frenette-Cotton, R., Drolet, M. C., Couet, J., ... & Isenring, P. (2016). Ablation of potassium-chloride cotransporter type 3 (Kcc3) in mouse causes multiple cardiovascular defects and isosmotic polyuria. *PLOS one*, *11*(5), e0154398.

Garneau, A. P., Marcoux, A. A., Frenette-Cotton, R., Mac-Way, F., Lavoie, J. L., & Isenring, P. (2017). Molecular insights into the normal operation, regulation, and multisystemic roles of K⁺-Cl⁻ cotransporter 3 (KCC3). *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, *313*(5), C516-C532.

Garneau, A. P., Marcoux, A. A., Slimani, S., Tremblay, L. E., Frenette-Cotton, R., Mac-Way, F., & Isenring, P. (2019). Physiological roles and molecular mechanisms of K⁺-Cl⁻ cotransport in the mammalian kidney and cardiovascular system: where are we?. *The Journal of physiology*, *597*(6), 1451-1465.

Garneau, A. P., Pepin, É., Noël, M., Elias, P., Haydock, L., Cossette, S. Lavoie, J. L. & Isenring, P. (2021). Increased metabolic rate and lipid wasting in a mouse model of K-Cl cotransporter 3 inactivation are associated with marked leanness and improved metabolic profile. Submitted to *Molecular Metabolism* (MOLMET-S-21-00955).

Howard, H. C., Mount, D. B., Rochefort, D., Byun, N., Dupré, N., Lu, J., ... & Rouleau, G. A. (2002). The K-Cl cotransporter KCC3 is mutant in a severe peripheral neuropathy associated with agenesis of the corpus callosum. *Nature genetics*, *32*(3), 384-392.

Kim, S. M., Eisner, C., Faulhaber-Walter, R., Mizel, D., Wall, S. M., Briggs, J. P., & Schnermann, J. (2008). Salt sensitivity of blood pressure in NKCC1-deficient mice. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, *295*(4), F1230-F1238.

Laurant, P., Touyz, R. M., & Schiffrin, E. L. (1997). Effect of pressurization on mechanical properties of mesenteric small arteries from spontaneously hypertensive rats. *Journal of vascular research*, *34*(2), 117-125.

Lavoie, J. L. (2006). Pression artérielle chez la souris avec un nouveau transmetteur miniaturisé. *STAL*, *31*(3/4), 227.

Morimoto, S., Cassell, M. D., & Sigmund, C. D. (2002). Neuron-specific expression of human angiotensinogen in brain causes increased salt appetite. *Physiological genomics*, *9*(2), 113-120.

Pearson, M. M., Lu, J., Mount, D. B., & Delpire, E. (2001). Localization of the K⁺-Cl⁻ cotransporter, KCC3, in the central and peripheral nervous systems: expression in the choroid plexus, large neurons and white matter tracts. *Neuroscience*, *103*(2), 481-491.

Rust, M. B., Faulhaber, J., Budack, M. K., Pfeffer, C., Maritzen, T., Didié, M., ... & Hübner, C. A. (2006). Neurogenic mechanisms contribute to hypertension in mice with disruption of the K-Cl cotransporter KCC3. *Circulation research*, 98(4), 549-556.

Shamansurova, Z., Tan, P., Ahmed, B., Pepin, E., Seda, O., & Lavoie, J. L. (2016). Adipose tissue (P) RR regulates insulin sensitivity, fat mass and body weight. *Molecular metabolism*, 5(10), 959-969.

Silver, L. M. (1995). *Mouse genetics: concepts and applications*. Oxford University Press.

Discussion

Dans ce travail, nous avons cherché à comprendre les mécanismes physiologiques dans lesquels le cotransporteur KCC3 est impliqué. Pour ce faire, nous avons utilisé un modèle de souris constitutivement et systématiquement inactivée pour le gène de *Kcc3* (*G_{syst}-Kcc3^{KO}*) que nous avons purifié dans un fond génétique favorable à l'expérimentation en physiologie cardiométabolique. Une caractérisation étendue des traits métaboliques, cardiovasculaires et rénaux a permis de révéler dans notre modèle plusieurs traits phénotypiques jamais identifiés auparavant, en plus de certains phénotypes peu décrits. Nous avons également rapporté les désordres neurologiques caractéristiques qui accompagnent la perte de fonction de *KCC3* chez l'humain, la souris et même chez d'autres espèces comme le chien. Certains traits que nous avons décrits dans notre modèle présentent différents degrés de discordance par rapport à des observations antérieures, ce qui sera discuté plus bas dans les sections thématiques.

L'un des phénotypes les plus frappants que nous avons décrits est une diminution de la masse corporelle accompagnée d'une forte réduction d'adiposité et d'une légère diminution de la masse maigre (Garneau et collab., 2016; Garneau et collab., 2021). Cette minceur est accompagnée d'autres caractéristiques métaboliques qui peuvent être qualifiées de bénéfiques comme une amélioration de la tolérance au glucose, des concentrations plus faibles de lipides circulants et une résistance à l'obésité induite par une diète riche en lipides (Garneau et collab., 2021).

Dans un autre ordre d'idées, nous avons initialement décrit une légère augmentation de la PA dans notre modèle, manifestation qui était associée à une cardiomégalie, une hausse de la compliance aortique, une polydipsie et une polyurie isoosmotique (Garneau et collab., 2016). Nous avons revisité le phénotype cardiovasculaire dans notre lignée de souris en utilisant des approches notamment plus directes et nous avons été surpris de ne pas détecter d'élévation de la PA. Nous avons toutefois remarqué à nouveau des anomalies vasculaires et rénales, notamment certaines modifications dans les propriétés mécaniques des artères résistives et une forme légère de fuite sodée par le rein (Garneau et collab., 2022).

Modèles murins

Dans nos études, nous avons utilisé un modèle de souris disponible auprès de Mutant Mouse Ressource & Research Centers^{xi}, une organisation qui entrepose et distribue des lignées de souris. Cette lignée avait été générée par insertion aléatoire d'un vecteur de type *gene trap* dans la portion codante du gène *Kcc3*, ce qui a pour effet d'introduire un codon stop prématuré dans l'exon 2 et d'interrompre la traduction de l'ARN avant la pleine production du domaine N-terminal (Garneau et collab., 2016; Garneau et collab., 2017; The Jackson Laboratory, s. d.-c).

La mutation que nous utilisons dans l'exon 2 diffère des autres modèles décrits dans la littérature. Nous avons proposé en 2017 une description standardisée des allèles mutés portés par les différents modèles murins inactivés pour *Kcc3* (Garneau et collab., 2017). Ces allèles mènent tous à des troncations de la protéine KCC3 : deux d'entre elles avant la fin de l'exon 3 (*HSyst-Kcc3^{KO}* et *BSyst-Kcc3^{KO}*); une avant la fin de l'exon 4 (*JSyst-Kcc3^{KO}*); une avant la fin de l'exon 7 (*DPvalb-Kcc3^{KO}* ou *DEno2-Kcc3^{KO}* ou *DScn10a-Kcc3^{KO}* ou *DDhh-Kcc3^{KO}*); et une avant la fin de l'exon 18 (*SSyst-Kcc3^{KO}* ou *Sneuro-Kcc3^{KO}*). Dans le cas des deux dernières troncations citées, c'est par le biais du système Cre-lox que la délétion dans le gène *Kcc3* survient dans différentes cellules ciblées, ce qui a mené à la création de modèles où la troncation de KCC3 est systémique (*SSyst-Kcc3^{KO}*), ciblée à la majorité des neurones (*Sneuro-Kcc3^{KO}*) par Shekarabi et collaborateurs (2012) ou encore ciblée à certaines sous-populations neuronales ou gliales par Ding et collaborateurs (2014; *DPvalb-Kcc3^{KO}*, *DEno2-Kcc3^{KO}*, *DScn10a-Kcc3^{KO}* ou *DDhh-Kcc3^{KO}*).

Bien que, par ailleurs, la mutation dans l'exon 18 soit la plus similaire à celle retrouvée chez les patients avec PNSMH dans le nord-est québécois, la construction génétique utilisée semblait mal tolérée chez les animaux témoins (génotype *Kcc3^{flox/flox}* mais n'exprimant pas de recombinaison Cre transgénique), si bien que ceux-ci n'exprimaient que 15 à 20 % des niveaux protéiques normaux de KCC3 dans le cerveau et dans le rein, les deux seuls organes où la quantification a été rapportée. Les souris témoins *Kcc3^{flox/flox}* ne présentent toutefois aucun phénotype observable selon les auteurs de l'étude (Shekarabi et collab., 2012).

^{xi} Les Mutant Mouse Ressource & Research Centers ont leur siège social dans la ville de Chapel Hill (NC, É.-U) et sont supportés par les National Institutes of Health des É.-U. Ils se spécialisent notamment dans la génération de souris porteuses de mutations spontanées ou induites.

Un modèle supplémentaire avait échappé à notre attention en 2017; il s'agit d'un modèle avec une troncation avant la fin du domaine N-terminal de *Kcc3*, et ce, spécifiquement dans les neurones de Purkinje (*sPcp2-Kcc3^{KO}*). Toutefois, lors de sa caractérisation neurologique, les auteurs n'ont détecté aucun phénotype (Seja et collab., 2012). Une série de nouveaux modèles inductibles et réversibles d'inactivation ciblée de *Kcc3* (*fParvb-Kcc3^{KO}* inductible et *fsyst-Kcc3^{KO}* constitutif, mais réversible dans les neurones *Parvb⁺*) ont été décrits cette année, mais aucune mention de traits extraneurologiques n'est faite à leur sujet. Le premier est toutefois décrit comme normal, alors que le second affiche les manifestations typiques de la PNSMH (Flores et Delpire, 2021). À l'exception de cette série de modèles inductibles ou réversibles, toutes les autres lignées d'inactivation de *Kcc3* présentées dans la littérature sont des modèles constitutifs. Une comparaison des lignées murines ayant fait l'objet d'une caractérisation extraneurologique est présentée au Tableau 3.

La lignée *gsyst-Kcc3^{KO}* que nous utilisons a été d'abord produite dans un fond génétique mixte 129/Sv × C57BL/6. Notre équipe a purifié ce modèle en réalisant de nombreux rétrocroisements successifs sur plusieurs années, ce qui a permis de progressivement retirer les influences non spécifiques de variants génétiques à des locus différents de celui occupé par *Kcc3* (Silver, 1995). Le fond génétique choisi dès le départ pour la purification est celui de la souche murine C57BL/6J, l'une des plus importantes maintenues par The Jackson Laboratory^{xii} (s. d.-b). Cette souche de souris correspond au modèle le plus utilisé dans la recherche sur l'obésité et est considérée comme l'une des plus appropriées pour étudier l'effet d'interventions génétiques sur des processus cardiométaboliques (Silver, 1995; Simon et collab., 2013). La souris C57BL/6J est en fait naturellement susceptible de développer des complications lorsque soumise, entre autres, à une diète riche en lipides ou en glucides simples (Drake et collab., 2001; Simon et collab., 2013; Fergusson et collab., 2014). Les différences entre les souches murines de fonds génétiques différents s'expliquent par de nombreux polymorphismes distribués dans le génome. Certains locus et gènes de susceptibilité ont d'ailleurs déjà été identifiés (Hansen et collab., 2004; Ronchi et collab., 2013)

^{xii} L'institut de recherche The Jackson Laboratory a son siège social dans la ville de Bar Harbor (ME, É.-U.).

Tableau 3 Traits phénotypiques d'intérêt extraneurologique décrits dans des lignées de souris inactivées pour *Kcc3*

1 ^{er} auteur année	Modèle réutilisé	Ciblage	Δx^*	Fond génétique	Rétro-croisements [1]	Homozygotie (%) [2]	Masse corporelle	Adiposité	Masse maigre	Muscle	Activité motrice	Dépense énergétique	PA moyenne (mmHg)	Hématocrite	Solutés circulants	Solutés dans les erythrocytes	Diurèse	Solutés urinaires	Soif	Prise alimentaire
Howard 2002		syst	3	129/Sv × C57BL/6	3	87,5	≈				E↓									
Boettger 2003		syst	3	129/Sv × C57BL/6	5	>96,8						d+18								
Adragna 2004	Howard 2002	syst	3	129/Sv × C57BL/6	nm		≈					d+35 n+35		≈	osmo≈ K≈	Na≈			+22	
Rust 2006	Boettger 2003	syst	3	129/Sv × C57BL/6	nm							d+13								
Rust 2007	Boettger 2003	syst	3	129/Sv × C57BL/6	nm		-8							≈						
Shekarabi 2012		syst	18	129/Sv × C57BL/6	6	>98,4	-4				dA+196 dS+104									
		neuro	18	129/Sv × C57BL/6	6	>98,4	-9				dA+219 dS+81									
Garneau 2016		syst	2	C57BL/6J	5	>96,8	-20	-78 Nx					d+8	≈	Na≈ urée≈ créat≈ CO ₂ ≈		+60	créat -36 Na≈ osmo≈	+33	+68
Bowerman 2017	Shekarabi 2012	syst	18	C57BL/6J	nm					PM ≠, amt Nx										
	Shekarabi 2012	neuro	18	C57BL/6J	nm					PM ≠, amt Nx										
Garneau 2021	Garneau 2016	syst	2	C57BL/6J	9	>99,6	-14	-70 RM	-8 RM	-11 à -8 Nx	dA+127 dS+204 nA+31 nS+102	d≈ n+9							+20	≈
Garneau 2022	Garneau 2016	syst	2	C57BL/6J	13	>99,99							d-3 n≈					Na,K,Cl≈ osmo≈ créat≈	≈	

Excepté pour la PA (exprimée en différence absolue), quantifications exprimées en % d'augmentation ou diminution. Case orange, trait mesuré ponctuellement ou sur < 24 h. Case grise, trait mesuré sur 24 h. Case bleue, trait mesuré sur plusieurs jours. ≈, statistiquement non différent. ≠, différente (désorganisée). ↓, diminué. Δx^* , codon stop prématuré dans l'exon x. A, activité ambulatoire. amt, amyotrophie. créat, créatinine. d, diurne; E, exploration. n, nocturne. neuro, neurones. nm, non mentionné. Nx, mesuré à la nécropsie. osmo, osmolalité. PM, plaque motrice. RM, résonance magnétique. S, stéréotypique. syst, systémique. [1] Nombre minimum mentionné, effectués dans la souche C57BL/6 ou C57BL/6J, selon le cas. [2] Calculée d'après l'équation $1 - 0,5^n$, où n est le nombre de rétrocroisements. Travail original.

En comparaison avec les autres équipes qui ont caractérisé des souris inactivées pour *Kcc3*, notre équipe est la seule à avoir purifié le fond génétique avec la souche C57BL/6J et à avoir investigué la physiologie cardiométabolique. Par exemple, une lignée $\text{J}_{\text{syst-}Kcc3^{\text{KO}}}$ était établie dans un fond génétique mixte C3H \times HeDiSnJ (Jiao et collab., 2008). Le plus souvent, les modèles inactivés pour *Kcc3* étaient sur fond génétique mixte 129/Sv \times C57BL/6 au moment de leur description. Parmi ces modèles, au moins neuf ont été caractérisés à des stades précoces ou non précisés de rétrocroisement dans la lignée C57BL/6 (et ce, sans mention du sous-type J ou autre, voir le Tableau 3). Ces modèles font partie de ceux mentionnés dans cette thèse pour leurs anomalies cardiométaboliques discrètes ou plus flagrantes. En revanche, une étude récente a été réalisée avec une lignée $\text{S}_{\text{syst-}Kcc3^{\text{KO}}}$ « maintenue » dans le fond génétique C57BL/6, mais elle s'était penchée principalement sur les effets de l'inactivation de *Kcc3* à la jonction neuromusculaire et sur la description de l'amyotrophie détectée (Bowerman et collab., 2017). Une autre étude très récente centrée sur l'impact temporel de l'inactivation de *Kcc3* dans l'apparition des symptômes neurologiques a été menée avec des lignées purifiées dans le fond génétique C57BL/6J, mais a évalué la fonction neurologique exclusivement (Flores et Delpire, 2021). Dans nos études, les souris caractérisées étaient établies dans un fond génétique C57BL/6J purifié à $> 96,8 \%$ (Garneau et collab., 2016), $>99,6 \%$ (Garneau et collab., 2021) ou $>99,99 \%$ (Garneau et collab., 2022), selon le cas.

Tout cela pris en compte, il est fort probable que certaines des divergences dans les résultats rapportés entre différents manuscrits — parfois par les mêmes équipes ou pour un même modèle animal — soient au moins en partie dues à des interactions variables entre le gène *Kcc3* et différents polymorphismes génétiques présents de manière inévitable parmi les différents modèles animaux, spécialement ceux caractérisés avant l'obtention d'un fond génétique extensivement purifié (Silver, 1995). Un fond génétique hétérogène peut en effet ajouter des effets confondants dans la caractérisation d'un phénotype (Linder, 2006). Par exemple, la réponse immunitaire à un parasite d'une souris inactivée pour un récepteur ($\text{G}_{\text{syst-Tlr9}^{\text{KO}}}$) était distincte de celle des témoins, mais était en fait liée à des modifications génétiques à des locus différents de celui du gène du récepteur d'intérêt (Geurts et collab., 2011). En plus des considérations ayant trait au fond génétique, des différences méthodologiques importantes sont souvent aussi présentes entre les études où des lignées de souris inactivées pour *Kcc3* ont été caractérisées. Il en sera question plus bas dans les sections thématiques.

Neuropathie

De manière importante, nous avons observé que notre modèle $G_{\text{syst-}Kcc3^{KO}}$ est atteint des manifestations périphériques caractéristiques de la PNSMH tel qu'observé dans les autres modèles murins décrits à ce jour. Notamment, nous montrons les mêmes anomalies dans la posture, la démarche et les réflexes. Nous avons également quantifié un déficit fonctionnel grâce à un test de suspension au grillage, au cours duquel les souris $G_{\text{syst-}Kcc3^{KO}}$ montrent une pauvre performance en lien avec leur faiblesse musculaire et leurs défauts de coordination. Nos résultats vont dans le même sens que la mauvaise performance sur la poutre étroite ou tige rotative rapportée dans les lignées $H_{\text{syst-}Kcc3^{KO}}$, $S_{\text{syst-}Kcc3^{KO}}$, $F_{\text{syst-}Kcc3^{KO}}$ et $S_{\text{neuro-}Kcc3^{KO}}$ (Howard et collab., 2002; Sun et collab., 2010; Shekarabi et collab., 2012; Flores et Delpire, 2021) et que le manque de force signalé chez les patients atteints de PNSMH (Andermann et collab., 1972; Larbrisseau et collab., 1984).

Masse et composition corporelles

À l'occasion d'une caractérisation initiale de notre modèle $G_{\text{syst-}Kcc3^{KO}}$, nous avons noté des diminutions hautement significatives de 12,5 % de la masse corporelle et de 3,1 % de la longueur du segment tibial à un âge de 19 à 24 semaines. Les courbes de croissances révélaient également une différence marquée de masse corporelle dès l'âge de 10 semaines et une masse corporelle adulte inférieure par rapport aux souris témoins. Dans notre étude de 2021, nous rapportons une réduction de 13,7 % au même âge. L'ampleur des diminutions de masse corporelle que nous observons est similaire ou légèrement supérieure à celles rapportées par Rust (2007) et Shekarabi (2012). Dans notre colonie, la différence entre les souris $G_{\text{syst-}Kcc3^{KO}}$ et WT s'accroît en fonction de l'âge, principalement parce que les souris $G_{\text{syst-}Kcc3^{KO}}$ accumulent moins de masse grasse, alors que les souris WT du fond génétique C57BL/6J sont susceptibles au gain d'adiposité, quoiqu'à des degrés variables parmi un groupe, tel que déjà décrit (Koza et collab., 2006).

Il n'est pas possible de tirer de conclusion générale entre les traits neurodégénératifs et le phénotype de masse corporelle décrit dans la littérature. Toutefois, les différences de masse corporelle causées par la perte de fonction de $Kcc3$ semblent plus nettes chez les modèles purifiés plus extensivement, à condition d'impliquer des groupes de taille suffisante et d'âge homogène. La prédisposition différente à l'obésité des souris sur fond génétique 129/Sv par rapport à C57BL/6J est assurément

déterminante pour expliquer cette tendance. En accord avec notre hypothèse de travail, les résultats de Shekarabi (2012) suggèrent que des anomalies découlant de l'absence de KCC3 à l'extérieur du système nerveux pourraient accentuer le phénotype de faible masse corporelle et même compromettre la survie à plus long terme.

Dès la première caractérisation de notre modèle *G_{syst}-Kcc3^{KO}*, nous avons aussi rapporté que la faible masse corporelle mesurée est explicable en grande partie par une nette diminution de l'adiposité telle qu'évaluée par la pesée du gras périgonadique à la nécropsie. Ce dépôt adipeux viscéral est parmi les plus volumineux chez la souris, et le plus souvent étudié dans la littérature (Sackmann-Sala et collab., 2012; Chusyd et collab., 2016; Zhang et collab., 2018). À l'occasion d'une caractérisation plus approfondie du phénotype métabolique de notre modèle, nous avons ensuite trouvé que la faible masse corporelle provenait d'une réduction marquée (-70 %) de la masse grasse totale accompagnée d'une diminution légère (-8,3 %) de la masse maigre. Le phénotype de minceur prononcée n'en est toutefois pas un de lipodystrophie, comme en témoignent la distribution des dépôts adipeux sous-cutanés et viscéraux en proportion habituelle, l'absence de dépôts ectopiques et des indices d'utilisation améliorée des substrats énergétiques (voir plus loin).

La masse et la composition corporelles étant des traits quantitatifs sous influences nombreuses, elles demeurent hautement dépendantes de différents locus génétiques, de conditions environnementales et d'interactions gènes-environnement (Brockmann et collab., 2004). Tout comme il l'a été noté parmi la diversité des modèles animaux inactivés pour *Kcc3*, une diminution de masse corporelle ne semble pas universellement observée chez les patients atteints de PNSMH. Dans la cohorte de Auer (2016), les faibles masse et taille corporelles étaient toutefois répandues, ce qui a amené les auteurs à suggérer que ces traits pourraient être dus à un manque d'influences trophiques par les commandes motrices du cerveau. Les parallèles en cette matière sont difficiles à établir avec les modèles murins puisque le mode de locomotion diffère entre ces deux espèces, d'autant plus que les patients sont souvent confinés à un fauteuil roulant ou au lit avant l'âge de 20 ans (Larbrisseau et collab., 1984; Mathieu et collab., 1990; Auer et collab., 2016), alors que nous montrons une grande distance parcourue quotidiennement dans notre modèle *G_{syst}-Kcc3^{KO}*.

Activité locomotrice

Nous sommes d'ailleurs les premiers à rapporter l'activité locomotrice quotidienne dans un modèle murin de PNSMH. En utilisant un système d'hébergement hautement ressemblant à l'environnement habituel des animaux expérimentaux et après avoir pris soin d'inclure une période d'acclimatation complète avant d'effectuer un relevé en continu sur 96 heures, nous avons révélé hors de tout doute une forte augmentation de l'activité ambulatoire et stéréotypique chez les souris $gsyst-Kcc3^{KO}$, et ce, durant les périodes diurne et nocturne. En s'attardant aux résultats de la phase diurne, il est possible de remarquer que l'ampleur de l'hyperactivité ambulatoire de notre modèle est moins prononcée par rapport à ce que Shekarabi (2012) a observé, mais l'hyperactivité stéréotypique de notre modèle était bien plus marquée en comparaison avec celle notée chez les modèles $ssyst-Kcc3^{KO}$ et $sneuro-Kcc3^{KO}$. Ces différences pourraient être explicables par l'absence d'une période d'acclimatation et la courte fenêtre temporelle de mesure dans l'étude de Shekarabi, ou à des capacités différentes de détecter l'activité fine par chacun des systèmes utilisés.

Bien que l'équipe de Howard (2002) ait noté une activité locomotrice faible lors de courtes épreuves d'exploration en champ ouvert dans leur modèle $hsyst-Kcc3^{KO}$ (3×5 minutes), cette observation traduit un déficit exploratoire sans anxiété manifeste compte tenu du patron normal d'occupation de l'espace. De manière intéressante, une quantification de la locomotion sur 90 minutes avait plutôt permis à l'équipe de Shekarabi (2012) de révéler un patron d'hyperactivité ambulatoire et stéréotypique chez les souris $ssyst-Kcc3^{KO}$ et $sneuro-Kcc3^{KO}$. L'hyperactivité ambulatoire touchait les deux lignées de manière équivalente, mais l'accroissement de l'activité stéréotypique était un peu plus prononcé dans la lignée $ssyst-Kcc3^{KO}$, ce qui suggère l'implication de mécanismes extraneurologiques, peut-être musculaires. Il serait d'ailleurs intéressant de tester cette hypothèse en caractérisant le phénotype locomoteur d'une lignée où l'inactivation de *Kcc3* est spécifique au muscle strié, en utilisant par exemple le système Cre-lox et le promoteur de la créatine kinase musculaire (McCarthy et collab., 2012). Ce modèle (qui se nommerait *MCK-Kcc3^{KO}*) permettrait également de vérifier si *KCC3* est indispensable au développement et à la physiologie musculaires.

Tel que mentionné plus haut, le mode locomoteur quadrupède de la souris rend difficile une transposition directe de nos résultats à la situation des patients atteints de PNSMH. Par contre,

puisque la souris $gsyst-Kcc3^{KO}$ conserve sa capacité locomotrice, il apparaît légitime de se demander si l'instauration de programmes adaptés d'activité physique chez les patients avec PNSMH pourrait avoir des effets bénéfiques en ralentissant la progression des atteintes locomotrices et en permettant une certaine préservation de la fonction (Seifert, 2014). Puisque l'hyperactivité locomotrice semble également mener à des bénéfices métaboliques, il serait intéressant de savoir si les patients avec PNSMH pourraient en profiter également, avec ou sans programme d'activité physique. Différents protocoles minimalement invasifs pourraient être imaginés afin d'évaluer le profil métabolique des patients, tels que des tests de tolérance orale, des panels détaillés de métabolites circulants ou même des études avec traceurs isotopiques pour quantifier les flux métaboliques.

Apport et dépense énergétiques

Notre observation initiale d'une polyphagie chez la souris $gsyst-Kcc3^{KO}$ laissait présager des mécanismes importants de malabsorption ou de dissipation calorique (Garneau et collab., 2016). Toutefois, la mesure a probablement été conditionnée par le contexte de mesure aigu dans des cages de diurèse, très différentes du milieu habituel d'hébergement où la nourriture est présentée dans un aspect et une position différente, sans litière ni enrichissement pour favoriser la rétention de chaleur. Nous avons tout de même tenté de vérifier si une dissipation calorique anormale pouvait survenir via les excréta. Grâce à une mesure du contenu énergétique des fèces par bombe calorimétrique, nous n'avons pas détecté de hausse de la quantité quotidienne de calories évacuées par cette voie. La quantification a été compliquée par le besoin de déterminer la quantité quotidienne de fèces produites par chaque souris. Pour faire cette détermination, le type d'hébergement des animaux doit être changé, ce qui amène souvent une diminution de la prise alimentaire, quoiqu'à des échelles variables selon les individus ou les groupes. Nous avons considéré étudier la vitesse du transit intestinal, mais n'avons pas eu l'opportunité de mener ces expériences. Nous avons cependant mesuré la concentration urinaire de glucose normalisée à celle de la créatinine en conditions d'hébergement normal, et n'avons pas détecté de différence entre les génotypes. Entretemps, lors de notre relevé sur 96 heures dans les cages métaboliques, nous avons toutefois noté une consommation équivalente de nourriture, peu importe le génotype, en conditions d'hébergement normales (Garneau et collab., 2021). Nous n'avons donc pas mené plus loin les expériences concernant les excréta et la digestion.

Nous sommes en fait la seule équipe à rapporter l'apport alimentaire d'une lignée de souris inactivée pour *Kcc3*. Chez l'humain, il est possible que certains patients avec PNSMH aient un apport alimentaire inférieur à la normale. À cet effet, un rapport clinique d'une patiente avec agénésie familiale du corps calleux et retard mental (probablement un cas de PNSMH) fait état de problèmes d'alimentation en plus d'une petite taille et d'une faible masse corporelle :

CASE 1.—Carol T., aged 7 years. [...] The patient weighed 3¾ lb. at birth and was always a **feeding problem** [accent ajouté]. [...] Physical examination showed that she was small and **undernourished** [accent ajouté] (weight, 33 lb.) and very severely retarded in mental development. [...] There was no evidence of interest in the surroundings, and no relationship was established with any member of the staff during hospitalization. **Feeding was a difficult problem** [accent ajouté]. (Naiman et Fraser, 1955, p. 182)

De manière concomitante à la mesure de l'apport alimentaire normal et de l'activité locomotrice accrue chez les souris *gsyst-Kcc3^{KO}*, nous avons mesuré une élévation de la dépense énergétique provenant de la phase nocturne. Puisque les taux métaboliques minimums et maximums mesurés sont équivalents entre les génotypes, mais que les souris *gsyst-Kcc3^{KO}* passent moins de temps immobiles et plus de temps actives en comparaison avec les témoins, il semble que le phénotype hypermétabolique observé découle, au moins en partie, du phénotype locomoteur. Il est remarquable qu'une souris de plus petite constitution, mais avec un apport calorique normal, affiche une dépense énergétique plus élevée par rapport à un témoin de masse corporelle supérieure. En effet, l'analyse statistique différenciée de la dépense énergétique selon les mesures corporelles témoigne incontestablement de la présence d'au moins un mécanisme limitant le gain de poids, c'est-à-dire une ou plusieurs formes de dissipation énergétique. Puisque les souris *gsyst-Kcc3^{KO}* (et tous les modèles *syst-Kcc3^{KO}* ou *neuro-Kcc3^{KO}*) sont caractérisées par des tressaillements involontaires ainsi qu'une locomotion désorganisée et sinueuse, la dépense énergétique accrue pourrait être expliquée par des contractions musculaires plus fréquentes que chez les témoins. Ce phénomène a d'ailleurs déjà été observé dans certains désordres humains caractérisés par des mouvements spastiques tels que la paralysie cérébrale (Brunton et Rice, 2012), le syndrome de Schwartz-Jampel (Spaans et collab., 1991), la maladie de Parkinson (Broussolle et collab., 1991) et la chorée de Huntington (Gaba et collab., 2005).

Les mesures de calorimétrie indirecte ont également révélé des valeurs de RER inférieures chez les souris *G_{syst}-Kcc3^{KO}* en comparaison avec les témoins, mais seulement durant la phase diurne. Ce résultat indique une dépendance plus prononcée aux lipides pour la fourniture d'énergie durant la phase inactive. Puisque la phase active est associée à des fluctuations intraindividuelles marquées du niveau d'activation métabolique en fonction du temps, il est fort possible qu'une analyse par périodes de 12 heures ne permette pas de décrire avec finesse le portrait de consommation des substrats énergétiques de chaque sujet, en particulier durant la phase active. La variabilité interindividuelle dans les moments d'engagement dans des activités rend ininterprétable également l'expression du RER en fonction du temps pour un groupe. Il pourrait être intéressant de porter en graphique chaque détermination calorimétrique pour chaque animal en exprimant le RER (en ordonnée) en fonction du niveau d'activité correspondant (en abscisse). La corrélation entre l'activité et le RER pourrait par exemple être déplacée vers le bas si les souris *G_{syst}-Kcc3^{KO}* utilisent une plus grande proportion de lipides. Puisque des échantillonnages gazeux ont été obtenus chaque 5 minutes durant 96 heures pour 13 animaux de deux génotypes, en arriver à tester cette corrélation demanderait l'analyse d'environ 30 000 points à deux coordonnées chacun et nécessiterait une puissance de calcul considérable ou un algorithme adapté et éprouvé que nous n'avons pas pu développer ni obtenir à l'heure actuelle.

Métabolisme lipidique

Les faibles taux circulants de TAG que nous avons retrouvés chez les souris *G_{syst}-Kcc3^{KO}*, tant à jeun que dans les 6 heures suivant une administration orale de lipides, sont en accord avec l'hypothèse d'une utilisation plus marquée des lipides globalement. Comme l'excursion des TAG plasmatiques durant le test de tolérance aux lipides oraux est la résultante des processus d'absorption, de captation tissulaire et d'une éventuelle mise en circulation, il n'est pas possible d'en déduire des conclusions mécanistiques définitives. En considérant cette excursion de pair avec les données de calorimétrie indirecte, il est raisonnable de présumer que l'absorption aiguë des lipides n'est pas compromise dans notre modèle, et qu'une captation périphérique suivie d'une oxydation accrue des lipides contribue à modérer l'augmentation de la triglycéridémie. Ce mécanisme pourrait également expliquer la faible prise de poids de la souris *G_{syst}-Kcc3^{KO}*.

Même sous diète riche en lipides, les souris $G_{\text{syst-}Kcc3^{KO}}$ ont un faible gain de poids tenant compte de la quantité de calories consommées. À cet effet, nous avons également mis en évidence dans l'un de leurs dépôts adipeux viscéraux une augmentation concomitante de l'expression d'enzymes lipogéniques et lipolytiques, ce qui suggère l'utilisation d'un cycle de substrats comme mécanisme de dissipation calorifique. En procédant ainsi à l'assemblage de glycérolipides et à leur dissociation en acides gras et glycérol dans des cycles répétés, les adipocytes utiliseraient continuellement de l'énergie sans s'engager ni dans un programme d'adipogenèse, ni dans la libération massive de substrats énergétiques en circulation. Ce mécanisme de cycle métabolique en apparence « futile » et dilapidant des substrats comme les lipides a déjà été observé chez des modèles de souris présentant une dépense énergétique accrue (Tan et collab., 2016; Worsch et collab., 2018; Poursharifi et collab., 2020)

Afin de confirmer l'implication d'un cycle de substrats dans la dissipation énergétique par la souris $G_{\text{syst-}Kcc3^{KO}}$, il serait possible de recueillir des données fonctionnelles ex vivo à partir de biopsies de tissus adipeux à obtenir dans le cadre d'un protocole identique à celui que nous avons mené. La technologie Seahorse d'Agilent Technologies, inc.^{xiii} (s. d.) rendrait ces expériences possibles en permettant de quantifier le taux métabolique de cellules ou de tissus en culture (Feeley et collab., 2014; Lau et collab., 2015). Ces expériences permettraient aussi d'appuyer nos données d'expression par des mesures directes de l'activité métabolique des organes soupçonnés de contribuer à la dissipation énergétique. Dans une expérience moins complexe, il serait par ailleurs possible de mesurer l'activité enzymatique à partir des biopsies de tissus adipeux ex vivo afin de vérifier si les niveaux d'expression de l'ARN messager se traduisent par une activité accrue de ces enzymes.

Dans le but d'avoir un portrait détaillé de la réponse de la souris $G_{\text{syst-}Kcc3^{KO}}$ à une diète riche en lipides, il serait même possible de répliquer le protocole de diète riche en lipides à l'intérieur du système de cages métaboliques Promethion de Sable Systems, internat.^{xiv} (s. d.). Ce faisant, nous pourrions comparer une grande gamme de paramètres métaboliques in vivo en fonction des deux facteurs étudiés (génotype et diète) et vérifier si les animaux $G_{\text{syst-}Kcc3^{KO}}$ sous diète riche en

^{xiii} La société Agilent Technologies, inc. a son siège social dans la ville de Santa Clara (CA, É.-U.).

^{xiv} La compagnie Sable Systems, internat. a son siège social dans la ville de Las Vegas (NV, É.-U.).

lipides ont effectivement une dépense énergétique accrue. Dans le cas où la dépense énergétique ne serait pas accrue, nous aurions une indication selon laquelle une composante de malabsorption de lipides devrait être examinée plus en détail.

Métabolisme glucidique

Les modifications de l'homéostasie énergétique chez notre souris *Gsyst-Kcc3^{KO}* ne se limitent pas au métabolisme des lipides. Nous observons aussi une nette amélioration de la tolérance au glucose. La réduction de l'excursion glycémique dans son ampleur et l'aire sous la courbe corrigée durant l'épreuve de test de tolérance au glucose oral sont des bons indices d'une meilleure tolérance au glucose (Ayala et collab., 2010; Bowe et collab., 2014; Alquier et Poitout, 2018). De plus, les faibles concentrations d'insuline circulante chez notre modèle durant l'épreuve indiquent une meilleure sensibilité globale à l'insuline, bien que ce dernier paramètre n'ait pas été mesuré directement.

La manière la plus sophistiquée d'évaluer la sensibilité à l'insuline est par clamp euglycémique hyperinsulinémique. Le principe de cette manœuvre est de placer les sujets expérimentaux en condition hyperinsulinémique et de leur infuser la quantité minimale de glucose nécessaire au maintien d'une glycémie stable et prédéterminée. Le taux d'infusion du glucose est alors égal à son taux d'utilisation par l'organisme entier en présence d'insuline (Ayala et collab., 2010; Alquier et Poitout, 2018). Dans sa version la plus élaborée, cette expérimentation nécessite notamment l'implantation de deux cathéters (artériel et veineux) et l'infusion d'érythrocytes compatibles pour compenser les prélèvements sanguins effectués (Ayala et collab., 2011). Certaines difficultés se posent dans le cas d'un modèle qui semble « défendre » une glycémie de jeûne plus basse que la normale : quel doit être le seuil euglycémique fixé? et doit-il être le même pour tous les groupes à l'étude? Les meilleurs experts dans le domaine reconnaissent qu'un choix arbitraire doit être fait, et que ce choix teintera l'interprétation des résultats.

Nous avons réalisé des expériences pilotes de mesure de sensibilité à l'insuline dans notre modèle par des clamps glycémiques et des tests de tolérance à l'insuline intrapéritonéale. Nos résultats préliminaires indiquaient une très grande sensibilité à l'insuline chez les souris *Gsyst-Kcc3^{KO}*, de même qu'une propension à l'hypoglycémie sévère provoquée par l'injection d'insuline.

KCC3 n'est pas le seul CCC ayant généré un intérêt dans la recherche des facteurs influençant l'homéostasie du glucose. Plusieurs CCC sont exprimés dans le pancréas endocrine et rendent possible une composante indépendante de l'ATP dans la sécrétion d'insuline (voir la section 4.2.2 de l'*Introduction*). En effet, les NKCC (voir le Tableau 1 pour une description fonctionnelle) ont un rôle confirmé dans l'accumulation électroneutre de Cl^- par la cellule β pancréatique au-delà du potentiel d'équilibre de l'anion. Un efflux électrogénique subséquent de chlorure contribue à la sécrétion d'insuline (Best, 2005). Le rôle théorique des NKCC dans la fonction pancréatique ne semble pas se traduire aussi simplement *in vivo* comme le suggèrent les phénotypes contrastés d'homéostasie du glucose dans différents modèles murins inactivés pour des NKCC. En effet, tel que présenté plus haut, la souris $\text{FSyst-Nkcc1}^{\text{KO}}$ affiche une amélioration de la tolérance au glucose (Alshahrani et Di Fulvio, 2012), alors que la souris $\text{OSyst-Nkcc2a}^{\text{KO}}$ affiche notamment une détérioration de la tolérance au glucose (Kelly et collab., 2019).

En accord avec leur fonction réciproque par rapport aux NKCC, les KCC sont, eux, soupçonnés de limiter la possibilité d'accumuler le Cl^- dans les cellules α et β puisqu'ils s'y retrouvent. Des résultats obtenus sur des cellules ou des îlots en culture vont dans le sens du modèle théorique : la stimulation pharmacologique des KCC inhibe la sécrétion d'insuline, alors que leur inhibition exerce l'effet opposé. De notre côté, les résultats obtenus *in vivo* ne suggèrent pas de modulation primaire de la sécrétion d'insuline selon notre modèle, mais plutôt un effet lié à une sensibilité périphérique accrue à l'insuline, possiblement en lien avec une hausse de l'activité locomotrice. Il serait par ailleurs intéressant de vérifier si des mécanismes additionnels pourraient expliquer la hausse apparente de la sensibilité à l'insuline. Par exemple, la clairance de l'insuline pourrait être ralentie, ce qui permettrait à l'hormone d'exercer ses effets plus longtemps sur les tissus insulinosensibles. Puisque les mécanismes de clairance de l'insuline impliquent notamment la liaison au récepteur et l'internalisation subséquente (Bojsen-Møller et collab., 2018), nous pourrions imaginer que KCC3 puisse favoriser un processus d'endocytose.

Il faut dire que de nombreuses variables expérimentales diffèrent entre la caractérisation *in vivo* d'un modèle comme le nôtre et de cellules ou structures en culture. Dans l'organisme entier, des joueurs additionnels sont à l'œuvre lors de l'administration orale de glucose, notamment les incrétines, qui favorisent la diminution de la glycémie (Efendic et Portwood, 2004). D'autres protéines ont aussi pu modifier leur expression ou leur activité à la suite de l'ablation chronique de

KCC3 durant le développement. Par exemple, il est concevable que d'autres KCC aient augmenté leur expression dans une réponse compensatoire ou que les NCCC — jouant un rôle réciproque par rapport à KCC3, notamment dans les cellules polarisées (Bazúa-Valenti et collab., 2016) — aient ajusté à la baisse leur expression pour suivre celle de KCC3. Ces ajustements sont typiquement observés chez les souris inactivées pour l'un des CCC (Alshahrani et collab., 2015; Garneau et collab., 2016; Kelly et collab., 2019) et pourraient notamment être impliqués dans la captation de glucose ou la signalisation de l'insuline.

Profil cardiométabolique

L'amélioration du profil métabolique observée chez notre modèle $gsyst-Kcc3^{KO}$ peut avoir des influences sur plusieurs systèmes physiologiques. Il est intéressant de noter que nous observons également dans notre modèle un autre regroupement de traits phénotypiques incluant une PA normale ou basse (par mesure directe; Garneau et collab., 2021), alors que d'autres modèles $gsyst-Kcc3^{KO}$ ont été décrits comme hypertendus (Boettger et collab., 2003; Adragna et collab., 2004; Rust et collab., 2006). Le tableau métabolique décrit dans notre modèle (incluant une faible adiposité ainsi qu'une meilleure tolérance au glucose associée à des niveaux d'insuline réduits) est typiquement relié à une protection cardiovasculaire. Par exemple, le profil sécrétoire des adipocytes moins chargés en lipides (plus d'adiponectine; moins de TNF- α , de leptine, de résistine et de protéine de liaison au rétinol RBP4) est connu pour avoir des effets hypotenseurs et vasorelaxants, en plus de prévenir l'hypertrophie cardiaque (Shek et collab., 1998; Shibata et collab., 2004; Hopkins et collab., 2007; Sriramula et collab., 2008; Ramseyer et Garvin, 2013; Kraus et collab., 2015; Jiang et collab., 2016). Nous avons d'ailleurs mesuré ce profil plus sain d'adipokines à l'occasion d'expériences préliminaires par détection immunologique semiquantitative en circulation ou par PCR quantitative dans des tissus adipeux. De plus, l'insuline peut avoir une action hypertensive (Scherrer et Sartori, 1997), alors que nous montrons dans notre modèle $gsyst-Kcc3^{KO}$ une faible sécrétion d'insuline en réponse au glucose oral.

Pression artérielle de base

Les descriptions hémodynamiques des lignées $syst-Kcc3^{KO}$ dans la littérature antérieure à nos travaux — telles que présentées à la section 1.3.8.2.2 de l'*Introduction* — correspondent à des élévations de 13 à 35 mmHg de la PA moyenne (Boettger et collab., 2003; Adragna et collab.,

2004; Rust et collab., 2006). Chez notre modèle $_{GS}Syst-Kcc3^{KO}$, nous avons originalement détecté une élévation modeste d'environ 8 mmHg de la PA moyenne entre les âges de 8 à 12 semaines (Garneau et collab., 2016). En reprenant les mesures par approche radiotéléométrique dans de plus grands groupes d'animaux plus âgés (19 à 21 semaines) et davantage purifiés sur le plan du fond génétique, nous avons mesuré une diminution marginale de 3 mmHg de la PA moyenne en phase diurne, et des niveaux égaux en phase nocturne (Garneau et collab., 2022). Il demeure que certaines considérations méthodologiques importantes limitent la portée de l'interprétation des différentes descriptions hémodynamiques présentées avant 2022, comme il le sera discuté ci-dessous.

Dans l'étude de Boettger (2003), les groupes expérimentaux étaient plutôt restreints ($n = 5-6$) et hétérogènes (3 à 5 mois d'âge). Une différence de deux mois chez la souris adulte se compare effectivement à une différence de 17 ans chez l'humain (Dutta et Sengupta, 2016). Aussi, la mesure ponctuelle de PA peu de temps après une intervention chirurgicale ne fournit que peu d'informations sur le patron hémodynamique habituel, puisqu'elle ne tient pas compte du patron nocturne-diurne et qu'elle est affectée par le stress péri-chirurgical (incluant les drogues injectées pour l'anesthésie) et le changement des modalités d'hébergement (par le fait d'isoler l'animal et de raccorder le cathéter exteriorisé aux appareils de mesure). Dans le rapport subséquent par le même groupe (Rust et collab., 2006), la cohorte est plus grande et l'âge, moins variable (3 à 4 mois). Dans les deux études, cependant, le fond génétique est passablement mixte entre 129/Sv et C57BL/6, à un niveau d'homozygotie calculé à $> 93 \%$ (Silver, 1995) d'après l'information disponible. Il est à noter que, malgré les conclusions des auteurs à l'effet que l'élévation de PA chez les souris $_{BS}Syst-Kcc3^{KO}$ soit d'origine neurogénique, des mécanismes cardiovasculaires intrinsèques ne peuvent être exclus, puisque les taux circulants d'aldostérone étaient notamment plus élevés chez les souris inactivées (Rust et collab., 2006).

Un deuxième groupe, celui d'Adragna (2004), a caractérisé le phénotype cardiovasculaire de leur lignée $_{HS}Syst-Kcc3^{KO}$, dont la mutation tronquante est similaire par rapport à celle du modèle présenté au paragraphe précédent. Bien que les mesures aient été faites par radiotélémetrie après une période de récupération appropriée dans des groupes d'âge plus avancé et homogène (5 à 6 mois), la taille des groupes était très restreinte ($n = 4$), l'échantillonnage ne s'est pas prolongé au-delà de 24 heures — contrairement à ce que recommandent les meilleures pratiques — et les conditions d'hébergement durant les mesures n'ont pas été précisées. En effet, la stabilisation des

conditions d'hébergement est un point crucial, et des déterminations sur plusieurs jours permettent de mieux conclure sur le véritable phénotype hémodynamique étant donné l'extrême labilité de la PA en réponse aux stress (Alam et collab., 2016; Combe et collab., 2016; Wilde et collab., 2017). À l'instar des études discutées au paragraphe précédent, le fond génétique utilisé par Adragna et collaborateurs (2004) est mixte (129/Sv × C57BL/6) et loin d'un stade purifié (aussi peu que >75 % d'homozygotie calculée d'après les informations disponibles; Silver, 1995).

Dans le cas de notre lignée $G_{syst-Kcc3}^{KO}$, les résultats publiés en 2016 sont les seules ayant été obtenues par une mesure indirecte de la PA (sphygmomanométrie; Garneau et collab., 2016). La présence d'un phénotype hypertensif léger accompagnée d'une hypertrophie cardiaque suggère que la PA pouvait effectivement être plus élevée que la normale et engendrer un travail cardiaque accru (Kaplan et Victor, 2015). Il faut cependant garder en tête que la pression était mesurée à un site artériel périphérique en conditions de contention avec application de chaleur durant le cycle habituel de sommeil des rongeurs (voir la section 3.3.1.1 de l'*Introduction*). Or, il a été montré que les animaux peuvent avoir des réponses hémodynamiques au stress qui sont variables en fonction notamment du génotype ou du fond génétique (Wilde et collab., 2017; Zhao et collab., 2017). En ce sens, les mesures par radiotélémétrie sont avantageuses puisqu'elles sont directes et qu'elles peuvent se faire dans un contexte de perturbation minimale. À noter que la souris $F_{syst-Nkcc1}^{KO}$ avait initialement été rapportée comme hypotendue sur la base de mesures sphygmomanométriques (Flagella et collab., 1999), puis comme normotendue quelque temps après sur la base de mesures radiotélémétriques (Kim et collab., 2008).

Une partie de la discordance entre nos deux caractérisations hémodynamiques pourrait aussi s'expliquer par l'âge différent à la mesure. Effectivement, la première évaluation avait été réalisée à un âge plus jeune (moins de trois mois) que toute autre évaluation hémodynamique présentée pour les modèles similaires. Pour notre modèle, il serait idéal de pouvoir suivre la PA par radiotélémétrie dès l'atteinte d'un poids suffisant pour l'implantation de la sonde, et aussi longtemps que possible pour déterminer l'effet de l'âge sur le profil hémodynamique.

Tel qu'évoqué plus haut, il est possible autrement que le stade de purification plus avancé de notre modèle au moment des mesures radiotélémétriques explique également une partie du phénotype hémodynamique présenté. Enfin, il est à noter que notre modèle $G_{syst-Kcc3}^{KO}$ affiche d'autres traits

phénotypiques typiquement associés à un meilleur contrôle hémodynamique tels qu'une forme légère de fuite ionique urinaire (voir plus loin). Au moment de nos plus récentes déterminations, la pesée du ventricule gauche à la nécropsie ne montrait d'ailleurs plus d'hypertrophie (Garneau et collab., 2022), ce qui pourrait signifier que la purification plus extensive du modèle a pu éliminer des influences non spécifiques et confondantes.

Propriétés vasculaires

Devant l'absence d'un phénotype hypertensif marqué chez notre modèle, en opposition à ce qui a été obtenu par certaines équipes comme celle d'Adragna (2004), nous avons cherché à caractériser plus en détail la physiologie cardiovasculaire dans notre modèle. La fonction et l'anatomie des artères conductives et résistives sont notamment des composantes importantes de la santé cardiovasculaire pouvant même avoir une valeur prédictive. Elles peuvent en effet montrer des atteintes marquées avant l'apparition d'un désordre hypertensif, par exemple (Korner et collab., 1991).

L'effet de l'inactivation de KCC3 sur l'anatomie et la fonction du réseau vasculaire a fait l'objet de peu de caractérisations jusqu'à maintenant. Dans leur manuscrit de 2006, Rust et collaborateurs ne rapportent pas de différence dans leur modèle $\beta_{\text{syst}}\text{-Kcc3}^{\text{KO}}$ quant à la sensibilité de la PA à la stimulation adrénérgique, la réactivité de l'artère saphène ex vivo aux agents vasomodulateurs principaux et le tonus myogénique.

De notre côté, nous avons observé que l'aorte thoracique dans notre modèle $\beta_{\text{syst}}\text{-Kcc3}^{\text{KO}}$ avait une paroi amincie. Lors d'études ex vivo, ces vaisseaux affichaient également une diminution de sensibilité à la stimulation adrénérgique, ce qui semble indiquer une compliance accrue. L'aorte contractée avec un agoniste adrénérgique affichait une vasorelaxation réduite en réponse au furosémide (voir la section 1.3.5.5 de l'*Introduction*) dans le groupe $\beta_{\text{syst}}\text{-Kcc3}^{\text{KO}}$, ce qui suggère aussi une implication de KCC3 dans le maintien de la contraction aortique. Puisque l'aorte est le principal vaisseau conducteur, une élévation de sa compliance pourrait avoir comme effet de diminuer la PA systolique maximale et la pulsatilité du flot telle que suggéré par l'ampleur de la pression pulsée que nous avons mesurée dans la même étude (Garneau et collab., 2016).

Nous avons également étudié l'artère mésentérique de 3^e ordre comme modèle de vaisseau résistif et n'avons pas observé de différence de sensibilité aux agents vasomodulateurs principaux entre les génotypes. La morphologie de l'artère était également similaire, sans évidence de remodelage. Nous avons cependant noté des changements dans les propriétés passives de ces artères dans le groupe *Gsyst-Kcc3^{KO}* en comparaison avec les artères témoins. Sur l'étendue des pressions de perfusion employées, la déformation circonférentielle des artères mésentériques était notamment plus prononcée par rapport au groupe témoin. Aux basses pressions de perfusion, de plus, la compliance et la distensibilité étaient supérieures (Garneau et collab., 2022). Si l'ensemble des vaisseaux résistifs avaient ce comportement *in vivo* et qu'ils prenaient de l'expansion plus facilement, la résistance imposée au passage du sang pourrait être moins importante, ce qui limiterait les augmentations de PA dans le groupe *Gsyst-Kcc3^{KO}*.

Les propriétés vasculaires des patients atteints de PNSMH n'ont jamais été rapportées dans la littérature à notre connaissance. Il pourrait être intéressant d'évaluer la fonction vasculaire par des méthodes minimalement invasives impliquant par exemple l'échographie Doppler et l'imagerie vidéo en réponse à des stimulus physiques ou même pharmacologiques. Les résultats obtenus pourraient fournir des indices importants sur la susceptibilité des patients à vivre des complications reliées à la circulation sanguine et aux variations de PA (Thijssen et collab., 2011).

Pression artérielle sous stress physique aigu

Devant l'absence du phénotype hypertensif attendu dans notre modèle, nous avons également cherché à vérifier si *KCC3* pouvait jouer un rôle dans les systèmes régulant la PA lors d'un stress aigu induit par la contention. Nous n'avons cependant pas observé de différence de PA ou de FC durant une période de contention ni durant la phase de récupération (Garneau et collab., 2022).

Étant donné que le stress d'immobilisation reproduit une partie des conditions qui prévalent durant une mesure de PA par sphygmomanométrie, une réponse tensionnelle accrue chez les souris *Gsyst-Kcc3^{KO}* aurait été attendue. La réponse normale suggère encore que le phénotype hémodynamique de notre lignée s'est normalisé depuis le moment de sa première caractérisation.

Réponse à une diète riche en sel

Puisque plusieurs CCC contribuent au transport sodique dans une grande variété de types cellulaires, en particulier dans le néphron ([Bazúa-Valenti et collab., 2016](#)), nous avons étudié de manière plus globale la réponse de notre modèle animal à un apport diététique accru et prolongé en sel. Ce protocole permettait également de vérifier si notre modèle est plus propice à développer une HTA par expansion volémique. Les animaux *G_{syst}-Kcc3^{KO}* ont présenté une élévation de la PA comparable à celle des témoins, mais ils ont consommé davantage d'eau, en particulier durant la première phase du traitement. La polyurie engendrée par la surcharge sodée chronique semblait plus prononcée chez les animaux *G_{syst}-Kcc3^{KO}* tel qu'indiqué par la plus faible créatininurie, quoique l'osmolalité de l'urine collectée était la même pour les deux génotypes. De fait, l'excrétion urinaire (normalisée à la créatinine) du Na⁺ et du Cl⁻ — fournis en large excès dans la diète — était systématiquement accrue sous diète riche en sel, et encore plus fortement chez les animaux *G_{syst}-Kcc3^{KO}*. L'incapacité des souris *G_{syst}-Kcc3^{KO}* à limiter l'excrétion urinaire de Na⁺, de K⁺ et de Cl⁻ en conditions de polyurie suggère que KCC3 contribue à la réabsorption rénale de ces ions dans les situations où l'équilibre glomérulotubulaire est sollicité.

Les analyses des échantillons de sang prélevés durant ce protocole sont toujours en cours. Dès qu'elles seront disponibles, elles seront incluses à l'article en préparation ([Garneau et collab., 2022](#)).

Préférence au sel

La réponse globale à un traitement hypersodé chez notre modèle murin laisse présager une incapacité à réabsorber la même quantité de solutés que le ferait une souris WT. Nous avons cherché à évaluer si la propension à une fuite sodée se traduisait par des besoins physiologiques accrus en sel. Pour ce faire, nous avons laissé les animaux librement obtenir la quantité de sel qu'ils le souhaitaient tout en gardant la source d'eau normale disponible. Nous avons constaté que, durant ce test de préférence au sel, les souris *G_{syst}-Kcc3^{KO}* ne montraient pas l'aversion habituelle pour une solution concentrée de sel ([Duncan, 1962](#); [Oka et collab., 2013](#)) comme l'ont fait les souris WT. Au contraire, les animaux inactivés pour *Kcc3* ont consommé davantage de solution saline hypertonique que d'eau, tout en y surajoutant une consommation d'eau égale à celle des animaux WT. Les souris *G_{syst}-Kcc3^{KO}* ont donc eu un apport de fluide et de sel accru par rapport aux

animaux WT. De manière intéressante, cette situation était accompagnée d'une élévation de la masse corporelle, légère, mais significative et soutenue, en comparaison avec une relative stabilité de la masse corporelle chez les animaux témoins (Garneau et collab., 2022).

Puisque KCC3 pourrait jouer un rôle important dans l'équilibre glomérulotubulaire, il serait attendu que ce transporteur soit également important dans la réabsorption du Cl^- par le tubule proximal en conditions de contraction volémique. Nous croyons donc qu'en l'absence de KCC3, l'équilibre glomérulotubulaire et la capacité de réabsorption sodée pourraient tous deux être compromis. Les souris $\text{gsyst-Kcc3}^{\text{KO}}$ pourraient ainsi avoir des besoins physiologiques accrus en sel, ce qui aurait pu contribuer à la consommation plus élevée de solution saline hypertonique. Des analyses biochimiques et immunologiques sont en cours dans les échantillons prélevés au cours du test afin d'identifier les voies régulatrices sollicitées.

Il est probable que l'absence de KCC3 se solde également par une perception hédonique différente du goût salé (Ruiz et collab., 2006). Ce transporteur se retrouve entre autres dans les structures centrales qui jouent un rôle dans l'intérêt pour le sel (Pearson et collab., 2001). La recherche du goût salé aurait donc pu expliquer, au moins en partie, l'apport accru en fluides chez les souris $\text{gsyst-Kcc3}^{\text{KO}}$, puisque le sel n'était disponible que sous forme de solution durant le test. Si KCC3 était effectivement impliqué dans la détection ou la régulation de l'apport en sel, il s'agirait alors de rôles nouveaux pour ce transporteur dans l'homéostasie hydrominérale.

Conclusion

Dans ce travail, nous avons mis à profit un modèle animal génétiquement modifié pour examiner des anomalies qui sont extérieures au système nerveux dans une maladie neurodéveloppementale et neurodégénérative, la PNSMH. Quelques atteintes extraneurologiques ont déjà été très sommairement décrites chez les patients atteints de PNSMH et dans les différents modèles murins générés pour comprendre les mécanismes physiopathologiques à l'œuvre. En outre, de faibles masse et taille corporelles ont été décrites chez plusieurs patients avec PNSMH. Une faible masse corporelle, une HTA et une polydipsie avaient notamment été rapportées dans les différentes souris *syst-Kcc3^{KO}* ou *neuro-Kcc3^{KO}*. Nous avons voulu caractériser avec un plus grand degré de détail les atteintes extraneurologiques accompagnant les symptômes neurologiques dans la PNSMH, car nous soupçonnions la présence d'anomalies additionnelles et l'implication de mécanismes extérieurs au système nerveux.

Nous avons trouvé deux grandes grappes de traits phénotypiques extraneurologiques dans notre modèle *gsyst-Kcc3^{KO}*. D'une part, nous avons noté des améliorations dans le profil métabolique, associées à une locomotion et une dépense énergétique accrues et qui semblaient liées à la manière d'utiliser les substrats énergétiques. D'autre part, nous avons remarqué une forme légère de fuite rénale en sel ainsi que des particularités dans la fonction des vaisseaux résistifs qui pourraient tous les deux contribuer à atténuer des élévations de PA. La PA a d'ailleurs été mesurée par méthode directe et s'est révélée normale ou marginalement plus basse dans notre modèle *gsyst-Kcc3^{KO}* en comparaison avec les souris témoins.

Ce modèle *gsyst-Kcc3^{KO}* présente donc des traits cardiométaboliques jamais rapportés par le passé ou parfois même contradictoires avec les trouvailles d'autres équipes. Les raisons de ces différences ne sont pas entièrement connues, mais elles pourraient être multiples. D'abord, il est possible que les conditions expérimentales ou les modèles utilisés par d'autres équipes ne permettent pas de révéler les traits que nous rapportons. Certains paramètres comme l'activité locomotrice, l'apport alimentaire et la PA doivent être étudiés après une acclimatation complète aux modalités d'hébergement associées à la mesure. D'autres différences méthodologiques comme les technologies utilisées ou les choix de protocoles expérimentaux ont pu influencer la possibilité

de déceler certains traits, en particulier s'ils sont évolutifs, labiles ou plus subtils. Enfin, les traits cardiométaboliques peuvent être plus ou moins évidents en fonction du fond génétique choisi pour le modèle, puisque les différentes souches murines disponibles affichent des susceptibilités différentes aux complications associées à l'obésité, le diabète ou l'hypertension.

Malgré tout, nous avons trouvé que l'inactivation de *Kcc3* chez la souris se soldait par certains bénéfices cardiométaboliques, en particulier des améliorations dans l'homéostasie du glucose et une résistance à l'obésité induite par la diète. Notre équipe établit ainsi de nouveaux liens entre KCC3 et le métabolisme énergétique, lesquels pourraient ouvrir des avenues de recherche émergentes dans le traitement de maladies métaboliques. En particulier, il serait intéressant de vérifier si l'inactivation génétique ou pharmacologique de KCC3 ciblée à certains organes d'intérêt métabolique (voir plus loin) est suffisante pour conférer des bénéfices comme nous l'avons observé dans notre modèle *Gsyst-Kcc3^{KO}*.

Dans la même veine, nous avons trouvé que notre modèle *Gsyst-Kcc3^{KO}* affichait une propension à excréter davantage de solutés par le rein, en particulier lors de la consommation d'une diète riche en sel, et ce phénomène pouvait être perçu comme une manière de limiter l'expansion de volume extracellulaire. Ces résultats indiquent que l'inactivation ciblée de *Kcc3* dans le rein pourrait avoir des effets bénéfiques dans le contrôle de la PA. Si un inhibiteur sélectif de KCC3 agissant dans le tubule proximal pouvait être développé, il semble que son effet pourrait être de favoriser la natriurèse et de contrôler certaines formes d'HTA caractérisées par une rétention hydrosodée. Certaines expériences sont toujours en cours pour le manuscrit en préparation, lequel est centré sur le phénotype hydrominéral de la souris *Gsyst-Kcc3^{KO}*.

Les résultats obtenus au sujet de différents systèmes physiologiques dans notre modèle ont déjà permis d'établir plusieurs liens entre KCC3 et la fonction cardiométabolique, mais certaines questions sont encore sans réponse. Le modèle constitutivement et systémiquement inactivé pour *Kcc3* que nous utilisons (*Gsyst-Kcc3^{KO}*) pose certaines limites tel que discuté précédemment, et gagnerait à être complété par l'étude de modèles animaux additionnels. Tel qu'évoqué plus haut, des souris où l'inactivation de *Kcc3* est ciblée à des types cellulaires spécifiques apporteraient un éclairage important sur la contribution de certains organes aux phénotypes observés dans la souris *Gsyst-Kcc3^{KO}*. Ces types cellulaires d'intérêt pour une inactivation ciblée incluent

probablement les rhabdomyocytes (pour évaluer l'implication du muscle dans les désordres moteurs et dans le phénotype métabolique), les adipocytes (pour vérifier si le gain de poids serait similaire à celui de la souris *G_{syst}-Kcc3^{KO}* sous diète riche en lipides) et le tubule proximal du rein (pour évaluer si la réabsorption hydrosodée rénale est normale en conditions basale et après consommation d'une diète riche en sel).

Des modèles murins conditionnels où l'inactivation de *Kcc3* est obtenue ou annulée à différents moments du développement seraient aussi utiles. Grâce à ce genre de modèles, il a déjà été montré que l'absence de KCC3 durant le développement embryonnaire dans certains neurones est suffisante pour engendrer un phénotype correspondant à la PNSMH, que l'inactivation après la naissance ne cause pas de perte de fonction sensorimotrice du système nerveux et qu'un rétablissement d'expression de *Kcc3* après la naissance ne guérit pas la neuropathie (Flores et Delpire, 2021). Il est toutefois possible que l'utilisation de modèles d'inactivation inductibles à différents stades du développement soit utile dans l'étude des traits extraneurologiques puisque les deux catégories de phénotypes pourraient survenir de manière indépendante. Les modèles inductibles permettent notamment de contourner dans une certaine mesure les phénomènes de contrerégulations qui s'installent dans les modèles constitutifs. En effet, l'ablation aiguë d'une protéine dans un modèle inductible ne laisse souvent pas le temps aux mécanismes compensateurs de se mettre en place et peuvent révéler de manière plus franche l'implication de la protéine ciblée dans un processus (Lewandoski, 2001). Ces modèles restent néanmoins plus complexes à mettre en place dans les bonnes conditions.

Nos résultats soulignent également la nécessité de mieux décrire l'anatomophysiologie cardiométabolique chez les patients atteints de PNSMH. Il est possible que devant les lourdes anomalies neurologiques et posturales qui les affligent, des atteintes plus subtiles soient passées inaperçues. Maintenant que les traitements de support pour ces patients se perfectionnent (Gauvreau et collab., 2006) et que leur espérance de vie est également appelée à se prolonger, il apparaît important de mieux connaître les traits métaboliques, cardiovasculaires et rénaux qui les caractérisent, dans le but d'améliorer leurs plans de traitement et leur qualité de vie.

Références bibliographiques

- Addison, O., Marcus, R. L., Lastayo, P. C. et Ryan, A. S. (2014). Intermuscular fat: A review of the consequences and causes. *International Journal of Endocrinology*, 2014, 309570. <https://doi.org/10.1155/2014/309570>
- Adragna, N. C., White, R. E., Orlov, S. N. et Lauf, P. K. (2000). K-Cl cotransport in vascular smooth muscle and erythrocytes: Possible implication in vasodilation. *American Journal of Physiology: Cell Physiology*, 278(2), C381-390. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.2000.278.2.C381>
- Adragna, N. C., Chen, Y., Delpire, E., Lauf, P. K. et Morris, M. (2004). Hypertension in K-Cl cotransporter-3 knockout mice. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 559, 379-385. https://doi.org/10.1007/0-387-23752-6_35
- Agilent Technologies Inc. (s. d.). *How Agilent Seahorse XF analyzers work*. <https://www.agilent.com/en/products/cell-analysis/how-seahorse-xf-analyzers-work>
- Alam, M. A., Parks, C. et Mancarella, S. (2016). Long-term blood pressure measurement in freely moving mice using telemetry. *Journal of Visualized Experiments*, (111). <https://doi.org/10.3791/53991>
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. et Walter, P. (2008). *Molecular Biology of the Cell* (5^e éd.). Garland Science.
- Alessi, D. R., Zhang, J., Khanna, A., Hochdörfer, T., Shang, Y. et Kahle, K. T. (2014). The WNK-SPAK/OSR1 pathway: master regulator of cation-chloride cotransporters. *Science Signaling*, 7(334), re3. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2005365>
- Almundarij, T. I., Smyers, M. E., Spriggs, A., Heemstra, L. A., Beltz, L., Dyne, E., Ridenour, C. et Novak, C. M. (2016). Physical activity, energy expenditure, and defense of body weight in melanocortin 4 receptor-deficient male rats. *Scientific Reports*, 6, 37435. <https://doi.org/10.1038/srep37435>
- Alquier, T. et Poitout, V. (2018). Considerations and guidelines for mouse metabolic phenotyping in diabetes research. *Diabetologia*, 61(3), 526-538. <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4495-9>
- Alshahrani, S. et Di Fulvio, M. (2012). Enhanced insulin secretion and improved glucose tolerance in mice with homozygous inactivation of the Na⁺K⁺2Cl⁻ co-transporter 1. *Journal of Endocrinology*, 215(1), 59-70. <https://doi.org/10.1530/JOE-12-0244>
- Alshahrani, S., Almutairi, M. M., Kursan, S., Dias-Junior, E., Almiahuob, M. M., Aguilar-Bryan, L. et Di Fulvio, M. (2015). Increased *Slc12a1* expression in β -cells and improved glucose disposal in *Slc12a2* heterozygous mice. *Journal of Endocrinology*, 227(3), 153-165. <https://doi.org/10.1530/JOE-15-0327>
- Ampère, A.-M. (1814). Lettre de M. Ampère à M. le comte Berthollet sur la détermination des proportions dans lesquelles les corps se combinent d'après le nombre et la disposition respective des molécules dont les parties intégrantes sont composées. *Annales de chimie*, 90(1), 43-86.

- Andermann, E., Andermann, F., Joubert, M., Melancon, D., Karpati, G. et Carpenter, S. (1975). Three familial midline malformation syndromes of the central nervous system: agenesis of the corpus callosum and anterior horn-cell disease; agenesis of cerebellar vermis; and atrophy of the cerebellar vermis. *Birth Defects Original Article Series*, 11(2), 269-293.
- Andermann, F., Andermann, E., Joubert, M., Karpati, G., Cartpenter, S. et Melançon, D. (1972). Familial agenesis of the corpus callosum with anterior horn cell disease: a syndrome of mental retardation, areflexia and paraparesis. *Transactions of the American Neurological Association*, 97, 242-244.
- Anisimov, V. N., Popovich, I. G., Zabezhinski, M. A., Egormin, P. A., Yurova, M. N., Semenchenko, A. V., Tyndyk, M. L., Panchenko, A. V., Trashkov, A. P., Vasiliev, A. G. et Khaitsev, N. V. (2015). Sex differences in aging, life span and spontaneous tumorigenesis in 129/Sv mice neonatally exposed to metformin. *Cell Cycle*, 14(1), 46-55. <https://doi.org/10.4161/15384101.2014.973308>
- Auer, R. N., Laganière, J. L., Robitaille, Y. O., Richardson, J., Dion, P. A., Rouleau, G. A. et Shekarabi, M. (2016). KCC3 axonopathy: neuropathological features in the central and peripheral nervous system. *Modern Pathology*, 29(9), 962-976. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2016.90>
- Avogadro, A. (1811). Essai d'une maniere de determiner les masses relatives des molecules elementaires des corps, et les proportions selon lesquelles elles entrent dans ces combinaisons. *Journal de physique, de chimie et d'histoire naturelle*, 73, 58-76.
- Ayala, J. E., Samuel, V. T., Morton, G. J., Obici, S., Croniger, C. M., Shulman, G. I., Wasserman, D. H., McGuinness, O. P. et Consortium, N. I. H. M. M. P. C. (2010). Standard operating procedures for describing and performing metabolic tests of glucose homeostasis in mice. *Disease Models & Mechanisms*, 3(9-10), 525-534. <https://doi.org/10.1242/dmm.006239>
- Ayala, J. E., Bracy, D. P., Malabanan, C., James, F. D., Ansari, T., Fueger, P. T., McGuinness, O. P. et Wasserman, D. H. (2011). Hyperinsulinemic-euglycemic clamps in conscious, unrestrained mice. *Journal of Visualized Experiments*, (57). <https://doi.org/10.3791/3188>
- Bartter, F. C., Pronove, P., Gill, J. R. et MacCardle, R. C. (1962). Hyperplasia of the juxtaglomerular complex with hyperaldosteronism and hypokalemic alkalosis. *The American Journal of Medicine*, 33(6), 811-828. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(62\)90214-0](https://doi.org/10.1016/0002-9343(62)90214-0)
- Battley, E. H. (1995). The advantages and disadvantages of direct and indirect calorimetry. *Thermochimica Acta*, 250(2), 337-352. [https://doi.org/10.1016/0040-6031\(94\)01963-h](https://doi.org/10.1016/0040-6031(94)01963-h)
- Baumann, C. W., Kwak, D. et Thompson, L. V. (2018). Assessing onset, prevalence and survival in mice using a frailty phenotype. *Aging*, 10(12), 4042-4053. <https://doi.org/10.18632/aging.101692>
- Bazúa-Valenti, S., Castaneda-Bueno, M. et Gamba, G. (2016). Physiological role of SLC12 family members in the kidney. *American Journal of Physiology: Renal Physiology*, 311(1), F131-144. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00071.2016>

- Bergeron, M. J., Gagnon, É., Wallendorff, B., Lapointe, J. Y. et Isenring, P. (2003). Ammonium transport and pH regulation by K⁺-Cl⁻ cotransporters. *American Journal of Physiology: Renal Physiology*, 285(1), F68-78. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00032.2003>
- Berthoud, H. R., Seeley, R. J. et Roberts, S. B. (2021). Physiology of energy intake in the weight-reduced state. *Obesity*, 29 Suppl 1, S25-S30. <https://doi.org/10.1002/oby.23080>
- Best, L. (2005). Glucose-induced electrical activity in rat pancreatic beta-cells: dependence on intracellular chloride concentration. *Journal of Physiology*, 568(Pt 1), 137-144. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.093740>
- Bichet, D. G. (2019). Regulation of thirst and vasopressin release. *Annual Review of Physiology*, 81, 359-373. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-020518-114556>
- Boettger, T., Rust, M. B., Maier, H., Seidenbecher, T., Schweizer, M., Keating, D. J., Faulhaber, J., Ehmke, H., Pfeiffer, C., Scheel, O., Lemcke, B., Horst, J., Leuwer, R., Pape, H. C., Volkl, H., Hubner, C. A. et Jentsch, T. J. (2003). Loss of K-Cl co-transporter KCC3 causes deafness, neurodegeneration and reduced seizure threshold. *The EMBO Journal*, 22(20), 5422-5434. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg519>
- Boguski, M. S., Lowe, T. M. et Tolstoshev, C. M. (1993). dbEST — database for "expressed sequence tags". *Nature Genetics*, 4(4), 332-333. <https://doi.org/10.1038/ng0893-332>
- Bojsen-Møller, K. N., Lundsgaard, A. M., Madsbad, S., Kiens, B. et Holst, J. J. (2018). Hepatic insulin clearance in regulation of systemic insulin concentrations — Role of carbohydrate and energy availability. *Diabetes*, 67(11), 2129-2136. <https://doi.org/10.2337/db18-0539>
- Bowe, J. E., Franklin, Z. J., Hauge-Evans, A. C., King, A. J., Persaud, S. J. et Jones, P. M. (2014). Metabolic phenotyping guidelines: Assessing glucose homeostasis in rodent models. *Journal of Endocrinology*, 222(3), G13-25. <https://doi.org/10.1530/JOE-14-0182>
- Bowerman, M., Salsac, C., Bernard, V., Soulard, C., Dionne, A., Coque, E., Benlefki, S., Hince, P., Dion, P. A., Butler-Browne, G., Camu, W., Bouchard, J. P., Delpire, E., Rouleau, G. A., Raoul, C. et Scamps, F. (2017). KCC3 loss-of-function contributes to Andermann syndrome by inducing activity-dependent neuromuscular junction defects. *Neurobiology of Disease*, 106, 35-48. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2017.06.013>
- Brockmann, G. A., Karatayli, E., Haley, C. S., Renne, U., Rottmann, O. J. et Karle, S. (2004). QTLs for pre- and postweaning body weight and body composition in selected mice. *Mammalian Genome*, 15(8), 593-609. <https://doi.org/10.1007/s00335-004-3026-4>
- Broussolle, E., Borson, F., Gonzalez de Suso, J. M., Chayvialle, J. A., Beylot, M. et Chazot, G. (1991). Augmentation de la dépense énergétique au cours de la maladie de Parkinson. *Revue neurologique*, 147(1), 35-48.
- Bruford, E. A., Braschi, B., Denny, P., Jones, T. E. M., Seal, R. L. et Tweedie, S. (2020). Guidelines for human gene nomenclature. *Nature Genetics*, 52(8), 754-758. <https://doi.org/10.1038/s41588-020-0669-3>
- Brunton, L. K. et Rice, C. L. (2012). Fatigue in cerebral palsy: A critical review. *Developmental Neurorehabilitation*, 15(1), 54-62. <https://doi.org/10.3109/17518423.2011.629633>

- Bureau international des poids et mesures. (2019). *Le Système international d'unités* (9^e éd.). <https://www.bipm.org/documents/20126/41483022/SI-Brochure-9-FR.pdf/bb7be5ff-4b2f-3834-f46a-5b4af3669870?version=1.13&download=true>
- Byrom, F. B. et Wilson, C. (1938). A plethysmographic method for measuring systolic blood pressure in the intact rat. *Journal of Physiology*, 93(3), 301-304. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1938.sp003641>
- Byun, N. et Delpire, E. (2007). Axonal and periaxonal swelling precede peripheral neurodegeneration in KCC3 knockout mice. *Neurobiology of Disease*, 28(1), 39-51. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2007.06.014>
- Cabib, S., Puglisi-Allegra, S. et Oliverio, A. (1985). A genetic analysis of stereotypy in the mouse: Dopaminergic plasticity following chronic stress. *Behavioral and Neural Biology*, 44(2), 239-248. [https://doi.org/10.1016/s0163-1047\(85\)90254-7](https://doi.org/10.1016/s0163-1047(85)90254-7)
- Caron, L., Rousseau, F., Gagnon, E. et Isenring, P. (2000). Cloning and functional characterization of a cation-Cl⁻ cotransporter-interacting protein. *Journal of Biological Chemistry*, 275(41), 32027-32036. <https://doi.org/10.1074/jbc.M000108200>
- Cassimeris, L., Plopper, G. et Lingappa, V. R. (2011). *Lewin's Cells* (2^e éd.). Jones and Bartlett Publishers.
- Chakrapani, S. et Auerbach, A. (2005). A speed limit for conformational change of an allosteric membrane protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(1), 87-92. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406777102>
- Chaudhuri, T., Chintalapati, J. et Hosur, M. V. (2021). Identification of 3'-UTR single nucleotide variants and prediction of select protein imbalance in mesial temporal lobe epilepsy patients. *PLOS One*, 16(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0252475>
- Cheval, L. et Doucet, A. (1990). Measurement of Na-K-ATPase-mediated rubidium influx in single segments of rat nephron. *American Journal of Physiology*, 259(1 Pt 2), F111-121. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1990.259.1.F111>
- Chew, T. A., Orlando, B. J., Zhang, J., Latorraca, N. R., Wang, A., Hollingsworth, S. A., Chen, D. H., Dror, R. O., Liao, M. et Feng, L. (2019). Structure and mechanism of the cation-chloride cotransporter NKCC1. *Nature*, 572(7770), 488-492. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1438-2>
- Chi, G., Ebenhoch, R., Man, H., Tang, H., Tremblay, L. E., Reggiano, G., Qiu, X., Bohstedt, T., Liko, I., Almeida, F. G., Garneau, A. P., Wang, D., McKinley, G., Moreau, C. P., Bountra, K. D., Abrusci, P., Mukhopadhyay, S. M. M., Fernandez-Cid, A., Slimani, S., Lavoie, J. L., Burgess-Brown, N. A., Tehan, B., DiMaio, F., Jazayeri, A., Isenring, P., Robinson, C. V. et Dürr, K. L. (2021). Phospho-regulation, nucleotide binding and ion access control in potassium-chloride cotransporters. *The EMBO Journal*, 40(14), e107294. <https://doi.org/10.15252/embj.2020107294>
- Chi, X., Li, X., Chen, Y., Zhang, Y., Su, Q. et Zhou, Q. (2021). Cryo-EM structures of the full-length human KCC2 and KCC3 cation-chloride cotransporters. *Cell Research*, 31(4), 482-484. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-00437-x>

- Chung, N., Park, M. Y., Kim, J., Park, H. Y., Hwang, H., Lee, C. H., Han, J. S., So, J., Park, J. et Lim, K. (2018). Non-exercise activity thermogenesis (NEAT): a component of total daily energy expenditure. *Journal of Exercise Nutrition & Biochemistry*, 22(2), 23-30. <https://doi.org/10.20463/jenb.2018.0013>
- Chusyd, D. E., Wang, D., Huffman, D. M. et Nagy, T. R. (2016). Relationships between rodent white adipose fat pads and human white adipose fat depots. *Frontiers in Nutrition*, 3, 10. <https://doi.org/10.3389/fnut.2016.00010>
- Combe, R., Mudgett, J., El Fertak, L., Champy, M. F., Ayme-Dietrich, E., Petit-Demoulière, B., Sorg, T., Herault, Y., Madwed, J. B. et Monassier, L. (2016). How does circadian rhythm impact salt sensitivity of blood pressure in mice? A study in two close C57Bl/6 substrains. *PLOS One*, 11(4), e0153472. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153472>
- Cornell, B. (2016). *Nephrons*. BioNinja. <http://ib.bioninja.com.au>
- Costa, A. R., Pinto-Costa, R., Sousa, S. C. et Sousa, M. M. (2018). The regulation of axon diameter: From axonal circumferential contractility to activity-dependent axon swelling. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11, 319. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00319>
- Daigle, N. D., Carpentier, G. A., Frenette-Cotton, R., Simard, M. G., Lefoll, M. H., Noël, M., Caron, L., Noël, J. et Isenring, P. (2009). Molecular characterization of a human cation-Cl⁻ cotransporter (SLC12A8A, CCC9A) that promotes polyamine and amino acid transport. *Journal of Cellular Physiology*, 220(3), 680-689. <https://doi.org/10.1002/jcp.21814>
- Danziger, J. et Zeidel, M. L. (2015). Osmotic homeostasis. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 10(5), 852-862. <https://doi.org/10.2215/CJN.10741013>
- Davies, S. L., Roussa, E., Le Rouzic, P., Thevenod, F., Alper, S. L., Best, L. et Brown, P. D. (2004). Expression of K⁺-Cl⁻ cotransporters in the alpha-cells of rat endocrine pancreas. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1667(1), 7-14. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2004.08.005>
- de Araujo, I. E., Schatzker, M. et Small, D. M. (2020). Rethinking food reward. *Annual Review of Psychology*, 71, 139-164. <https://doi.org/10.1146/annurev-psych-122216-011643>
- De Braekeleer, M., Dallaire, A. et Mathieu, J. (1993). Genetic epidemiology of sensorimotor polyneuropathy with or without agenesis of the corpus callosum in northeastern Quebec. *Human Genetics*, 91(3), 223-227. <https://doi.org/10.1007/BF00218260>
- de Wardener, H. E., He, F. J. et MacGregor, G. A. (2004). Plasma sodium and hypertension. *Kidney International*, 66(6), 2454-2466. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2004.66018.x>
- Décarie-Spain, L. et Kanoski, S. E. (2021). Ghrelin and glucagon-like peptide-1: A gut-brain axis battle for food reward. *Nutrients*, 13(3). <https://doi.org/10.3390/nu13030977>
- Delpire, E. et Gagnon, K. B. (2018). Water homeostasis and cell volume maintenance and regulation. *Current Topics in Membranes*, 81, 3-52. <https://doi.org/10.1016/bs.ctm.2018.08.001>
- Di Fulvio, M., Lauf, P. K., Shah, S. et Adragna, N. C. (2003). NONOates regulate KCl cotransporter-1 and -3 mRNA expression in vascular smooth muscle cells. *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology*, 284(5), H1686-1692. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00710.2002>

- Di Fulvio, M. et Aguilar-Bryan, L. (2019). Chloride transporters and channels in β -cell physiology: Revisiting a 40-year-old model. *Biochemical Society Transactions*, 47(6), 1843-1855. <https://doi.org/10.1042/BST20190513>
- Ding, J., Ponce-Coria, J. et Delpire, E. (2013). A trafficking-deficient mutant of KCC3 reveals dominant-negative effects on K-Cl cotransport function. *PLoS One*, 8(4), e61112. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061112>
- Ding, J. et Delpire, E. (2014). Deletion of KCC3 in parvalbumin neurons leads to locomotor deficit in a conditional mouse model of peripheral neuropathy associated with agenesis of the corpus callosum. *Behavioural Brain Research*, 274, 128-136. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.08.005>
- Drake, T. A., Schadt, E., Hannani, K., Kabo, J. M., Krass, K., Colinayo, V., Greaser, L. E., 3rd, Goldin, J. et Lusic, A. J. (2001). Genetic loci determining bone density in mice with diet-induced atherosclerosis. *Physiological Genomics*, 5(4), 205-215. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.2001.5.4.205>
- Dulon, D., Aran, J. M. et Schacht, J. (1988). Potassium-depolarization induces motility in isolated outer hair cells by an osmotic mechanism. *Hearing Research*, 32(2-3), 123-129. [https://doi.org/10.1016/0378-5955\(88\)90084-6](https://doi.org/10.1016/0378-5955(88)90084-6)
- Duncan, C. (1962). Salt preferences of birds and mammals. *Physiological Zoology*, 35(2), 120-132.
- Dupré, N., Howard, H. C., Mathieu, J., Karpati, G., Vanasse, M., Bouchard, J. P., Carpenter, S. et Rouleau, G. A. (2003). Hereditary motor and sensory neuropathy with agenesis of the corpus callosum. *Annals of Neurology*, 54(1), 9-18. <https://doi.org/10.1002/ana.77777>
- Duschek, S., Hoffmann, A., Reyes Del Paso, G. A. et Ettinger, U. (2017). Autonomic cardiovascular control and executive function in chronic hypotension. *Annals of Behavioral Medicine*, 51(3), 442-453. <https://doi.org/10.1007/s12160-016-9868-7>
- Dutta, S. et Sengupta, P. (2016). Men and mice: Relating their ages. *Life Sciences*, 152, 244-248. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.10.025>
- Dyck, P. (1975). Inherited neuronal degeneration and atrophy affecting peripheral motor, sensory, and autonomic neurons. *Peripheral Neuropathy*, 2, 825-867.
- Ecob-Prince, M. S. et Leberer, E. (1989). Parvalbumin in mouse muscle in vivo and in vitro. *Differentiation*, 40(1), 10-16. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.1989.tb00808.x>
- Efendic, S. et Portwood, N. (2004). Overview of incretin hormones. *Hormone and Metabolic Research*, 36(11-12), 742-746. <https://doi.org/10.1055/s-2004-826157>
- Eisener-Dorman, A. F., Lawrence, D. A. et Bolivar, V. J. (2009). Cautionary insights on knockout mouse studies: The gene or not the gene? *Brain, Behavior, and Immunity*, 23(3), 318-324. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2008.09.001>
- Ellory, J. C., Flatman, P. W. et Stewart, G. W. (1983). Inhibition of human red cell sodium and potassium transport by divalent cations. *Journal of Physiology*, 340, 1-17. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1983.sp014746>

- Evans, R. L. et Turner, R. J. (1998). Evidence for a physiological role of NH_4^+ transport on the secretory $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ cotransporter. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 245(2), 301-306. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.8428>
- Falcao, S., Solomon, C., Monat, C., Bérubé, J., Gutkowska, J. et Lavoie, J. L. (2009). Impact of diet and stress on the development of preeclampsia-like symptoms in p57kip2 mice. *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology*, 296(1), H119-126. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01011.2008>
- Feeley, K. P., Westbrook, D. G., Bray, A. W. et Ballinger, S. W. (2014). An ex-vivo model for evaluating bioenergetics in aortic rings. *Redox Biology*, 2, 1003-1007. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2014.08.008>
- Feihl, F., Liaudet, L., Waeber, B. et Levy, B. I. (2006). Hypertension: a disease of the microcirculation? *Hypertension*, 48(6), 1012-1017. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000249510.20326.72>
- Ferdous, M. Z., Miller, L. N., Agbor, L. N., Saritas, T., Singer, J. D., Sigmund, C. D. et McCormick, J. A. (2017). Mutant Cullin 3 causes familial hyperkalemic hypertension via dominant effects. *JCI Insight*, 2(24). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.96700>
- Fergusson, G., Éthier, M., Guévremont, M., Chrétien, C., Attané, C., Joly, E., Fioramonti, X., Prentki, M., Poitout, V. et Alquier, T. (2014). Defective insulin secretory response to intravenous glucose in C57Bl/6J compared to C57Bl/6N mice. *Molecular Metabolism*, 3(9), 848-854. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2014.09.006>
- Filteau, M. J., Pourcher, E., Bouchard, R. H., Baruch, P., Mathieu, J., Bédard, F., Simard, N. et Vincent, P. (1991). Corpus callosum agenesis and psychosis in Andermann syndrome. *Archives of Neurology*, 48(12), 1275-1280. <https://doi.org/10.1001/archneur.1991.00530240079027>
- Flagella, M., Clarke, L. L., Miller, M. L., Erway, L. C., Giannella, R. A., Andringa, A., Gawenis, L. R., Kramer, J., Duffy, J. J., Doetschman, T., Lorenz, J. N., Yamoah, E. N., Cardell, E. L. et Shull, G. E. (1999). Mice lacking the basolateral Na-K-2Cl cotransporter have impaired epithelial chloride secretion and are profoundly deaf. *Journal of Biological Chemistry*, 274(38), 26946-26955. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.38.26946>
- Flores, B., Schornak, C. C. et Delpire, E. (2019). A role for KCC3 in maintaining cell volume of peripheral nerve fibers. *Neurochemistry International*, 123, 114-124. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2018.01.009>
- Flores, B. et Delpire, E. (2021). Temporal manipulation of KCC3 expression in juvenile or adult mice suggests irreversible developmental deficit in hereditary motor sensory neuropathy with agenesis of the corpus callosum. *American Journal of Physiology: Cell Physiology*, 320(5), C722-C730. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00594.2020>
- Flurkey, K., Curren, J. M. et Harrison, D. E. (2007). Mouse Models in Aging Research. Dans J. G. Fox, M. T. Davisson, F. W. Quimby, S. W. Barthold, C. E. Newcomer et Abigail L. Smith (dir.), *The Mouse in Biomedical Research* (2^e éd., vol. 3). American College of Laboratory Animal Medicine. <https://doi.org/10.1016/B978-012369454-6/50074-1>

- Forss-Petter, S., Danielson, P. E., Catsicas, S., Battenberg, E., Price, J., Nerenberg, M. et Sutcliffe, J. G. (1990). Transgenic mice expressing beta-galactosidase in mature neurons under neuron-specific enolase promoter control. *Neuron*, 5(2), 187-197. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(90\)90308-3](https://doi.org/10.1016/0896-6273(90)90308-3)
- Frenette-Cotton, R., Marcoux, A. A., Garneau, A. P., Noël, M. et Isenring, P. (2018). Phosphoregulation of K⁺-Cl⁻ cotransporters during cell swelling: Novel insights. *Journal of Cellular Physiology*, 233(1), 396-408. <https://doi.org/10.1002/jcp.25899>
- Friesen, D. E., Baracos, V. E. et Tuszynski, J. A. (2015). Modeling the energetic cost of cancer as a result of altered energy metabolism: implications for cachexia. *Theoretical Biology & Medical Modelling*, 12, 17. <https://doi.org/10.1186/s12976-015-0015-0>
- Fujii, T., Takahashi, Y., Itomi, Y., Fujita, K., Morii, M., Tabuchi, Y., Asano, S., Tsukada, K., Takeguchi, N. et Sakai, H. (2008). K⁺-Cl⁻ cotransporter-3a up-regulates Na⁺,K⁺-ATPase in lipid rafts of gastric luminal parietal cells. *Journal of Biological Chemistry*, 283(11), 6869-6877. <https://doi.org/10.1074/jbc.M708429200>
- Gaba, A. M., Zhang, K., Marder, K., Moskowitz, C. B., Werner, P. et Boozer, C. N. (2005). Energy balance in early-stage Huntington disease. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81(6), 1335-1341. <https://doi.org/10.1093/ajcn/81.6.1335>
- Gagnon, K. B. et Delpire, E. (2013). Physiology of SLC12 transporters: lessons from inherited human genetic mutations and genetically engineered mouse knockouts. *American Journal of Physiology: Cell Physiology*, 304(8), C693-714. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00350.2012>
- Gamba, G. (2005). Molecular physiology and pathophysiology of electroneutral cation-chloride cotransporters. *Physiological Reviews*, 85(2), 423-493. <https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2004>
- Garneau, A. P., Marcoux, A. A., Noël, M., Frenette-Cotton, R., Drolet, M. C., Couet, J., Larivière, R. et Isenring, P. (2016). Ablation of potassium-chloride cotransporter type 3 (*Kcc3*) in mouse causes multiple cardiovascular defects and isosmotic polyuria. *PLOS One*, 11(5), e0154398. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154398>
- Garneau, A. P., Marcoux, A. A., Frenette-Cotton, R., Mac-Way, F., Lavoie, J. L. et Isenring, P. (2017). Molecular insights into the normal operation, regulation, and multisystemic roles of K⁺-Cl⁻ cotransporter 3 (KCC3). *American Journal of Physiology: Cell Physiology*, 313(5), C516-C532. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00106.2017>
- Garneau, A. P., Marcoux, A. A., Slimani, S., Tremblay, L. E., Frenette-Cotton, R., Mac-Way, F. et Isenring, P. (2019). Physiological roles and molecular mechanisms of K⁺-Cl⁻ cotransport in the mammalian kidney and cardiovascular system: where are we? *Journal of Physiology*, 597(6), 1451-1465. <https://doi.org/10.1113/JP276807>
- Garneau, A. P., Pepin, É., Noël, M., Elias, P., Cossette, S., Isenring, P. et Lavoie, J. L. (2021). Increased metabolic rate and lipid wasting in a mouse model of K-Cl cotransporter 3 inactivation are associated with marked leanness and improved metabolic profile [Document soumis pour publication]. *Molecular Metabolism* (MOLMET-S-21-00955).

- Garneau, A. P., Pepin, É., Noël, M., Elias, P., Haydock, L., Cossette, S., Lavoie, J. L. et Isenring, P. (2022). Blood pressure regulation and renal salt handling in a mouse model inactivated for K-Cl cotransporter type 3 [Document en préparation].
- Gauvreau, C., Brisson, J.-D. et Dupré, N. (2006, 2020). Hereditary motor and sensory neuropathy with agenesis of the corpus callosum. Dans M. P. Adam, H. H. Ardinger, R. A. Pagon et S. E. Wallace (dir.), *GeneReviews®*. University of Washington. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1372/>
- Gerelsaikhhan, T. et Turner, R. J. (2000). Transmembrane topology of the secretory Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter NKCC1 studied by in vitro translation. *Journal of Biological Chemistry*, 275(51), 40471-40477. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007751200>
- Geurts, N., Martens, E., Verhenne, S., Lays, N., Thijs, G., Magez, S., Cauwe, B., Li, S., Heremans, H., Opdenakker, G. et Van den Steen, P. E. (2011). Insufficiently defined genetic background confounds phenotypes in transgenic studies as exemplified by malaria infection in Tlr9 knockout mice. *PLOS One*, 6(11), e27131. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027131>
- Gibbons, G. H. et Dzau, V. J. (1994). The emerging concept of vascular remodeling. *The New England Journal of Medicine*, 330(20), 1431-1438. <https://doi.org/10.1056/NEJM199405193302008>
- Grimm, D. (2006). Mouse genetics. A mouse for every gene. *Science*, 312(5782), 1862-1866. <https://doi.org/10.1126/science.312.5782.1862>
- Groupe canadien d'endocrinologie pédiatrique. (2014). *Les courbes de croissance de l'OMS pour le Canada*. <https://cpeg-gcep.net/fr/content/les-courbes-de-croissance-de-loms-pour-le-canada>
- Gruionu, G., Hoying, J. B., Pries, A. R. et Secomb, T. W. (2012). Structural remodeling of the mouse gracilis artery: Coordinated changes in diameter and medial area maintain circumferential stress. *Microcirculation*, 19(7), 610-618. <https://doi.org/10.1111/j.1549-8719.2012.00194.x>
- Gu, J. W., Anand, V., Shek, E. W., Moore, M. C., Brady, A. L., Kelly, W. C. et Adair, T. H. (1998). Sodium induces hypertrophy of cultured myocardial myoblasts and vascular smooth muscle cells. *Hypertension*, 31(5), 1083-1087. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.31.5.1083>
- Gurumurthy, C. B. et Lloyd, K. C. K. (2019). Generating mouse models for biomedical research: Technological advances. *Disease Models & Mechanisms*, 12(1). <https://doi.org/10.1242/dmm.029462>
- Guyton, A. C. (1990). The surprising kidney-fluid mechanism for pressure control — its infinite gain! *Hypertension*, 16(6), 725-730. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.16.6.725>
- Häberle, D. A. et von Baeyer, H. (1983). Characteristics of glomerulotubular balance. *American Journal of Physiology*, 244(4), F355-366. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1983.244.4.F355>
- Hall, B., Limaye, A. et Kulkarni, A. B. (2009). Overview: Generation of gene knockout mice. *Current Protocols in Cell Biology*, Chapter 19, Unit 19.12 19.12.11-17. <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb1912s44>

- Hall, J. E. (2016). *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology* (13^e éd.). Elsevier.
- Hansen, P. B., Jensen, B. L. et Skott, O. (1998). Chloride regulates afferent arteriolar contraction in response to depolarization. *Hypertension*, 32(6), 1066-1070. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.32.6.1066>
- Hansen, P. B., Yang, T., Huang, Y., Mizel, D., Briggs, J. et Schnermann, J. (2004). Plasma renin in mice with one or two renin genes. *Acta Physiologica Scandinavica*, 181(4), 431-437. <https://doi.org/10.1111/j.1365-201X.2004.01315.x>
- Hartmann, A. M., Tesch, D., Nothwang, H. G. et Bininda-Emonds, O. R. (2014). Evolution of the cation chloride cotransporter family: ancient origins, gene losses, and subfunctionalization through duplication. *Molecular Biology and Evolution*, 31(2), 434-447. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst225>
- Hartmann, P., Ramseier, A., Gudat, F., Mihatsch, M. J. et Polasek, W. (1994). Das Normgewicht des Gehirns beim Erwachsenen in Abhängigkeit von Alter, Geschlecht, Körpergröße und Gewicht [Normal weight of the brain in adults in relation to age, sex, body height and weight]. *Pathologie*, 15(3), 165-170. <https://doi.org/10.1007/s002920050040>
- Hediger, M. A., Romero, M. F., Peng, J. B., Rolfs, A., Takanaga, H. et Bruford, E. A. (2004). The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 447(5), 465-468. <https://doi.org/10.1007/s00424-003-1192-y>
- Herring, N. et Paterson, D. J. (2018). *Levick's Introduction to Cardiovascular Physiology* (6^e éd.). CRC Press.
- Hiki, K., D'Andrea, R. J., Furze, J., Crawford, J., Woollatt, E., Sutherland, G. R., Vadas, M. A. et Gamble, J. R. (1999). Cloning, characterization, and chromosomal location of a novel human K⁺-Cl⁻ cotransporter. *Journal of Biological Chemistry*, 274(15), 10661-10667. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.15.10661>
- Hoffmann, E. K., Lambert, I. H. et Pedersen, S. F. (2009). Physiology of cell volume regulation in vertebrates. *Physiological Reviews*, 89(1), 193-277. <https://doi.org/10.1152/physrev.00037.2007>
- Hopkins, T. A., Ouchi, N., Shibata, R. et Walsh, K. (2007). Adiponectin actions in the cardiovascular system. *Cardiovascular Research*, 74(1), 11-18. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2006.10.009>
- Howard, H. C., Mount, D. B., Rochefort, D., Byun, N., Dupre, N., Lu, J., Fan, X., Song, L., Riviere, J. B., Prevost, C., Horst, J., Simonati, A., Lemcke, B., Welch, R., England, R., Zhan, F. Q., Mercado, A., Siesser, W. B., George, A. L., Jr., McDonald, M. P., Bouchard, J. P., Mathieu, J., Delpire, E. et Rouleau, G. A. (2002). The K-Cl cotransporter KCC3 is mutant in a severe peripheral neuropathy associated with agenesis of the corpus callosum. *Nature Genetics*, 32(3), 384-392. <https://doi.org/10.1038/ng1002>
- Hsu, Y. M., Chou, C. Y., Chen, H. H., Lee, W. Y., Chen, Y. F., Lin, P. W., Alper, S. L., Ellory, J. C. et Shen, M. R. (2007). IGF-1 upregulates electroneutral K-Cl cotransporter KCC3 and KCC4 which are differentially required for breast cancer cell proliferation and invasiveness. *Journal of Cellular Physiology*, 210(3), 626-636. <https://doi.org/10.1002/jcp.20859>

- Huetteman, D. A. et Bogie, H. (2009). Direct blood pressure monitoring in laboratory rodents via implantable radio telemetry. *Methods in Molecular Biology*, 573, 57-73. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-247-6_4
- Institut national de la santé et de la recherche médicale. (2004). *Syndrome d'agénésie du corps calleux-neuropathie*. Orphanet: une base de données en ligne sur les maladies rares et les médicaments orphelins. https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?lng=FR&Expert=1496
- International Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice et Rat Genome and Nomenclature Committee. (2021). *Guidelines for nomenclature of genes, genetic markers, alleles, and mutations in mouse and rat*. <http://www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/gene.shtml>
- Issekutz, B., Jr. et Rodahl, K. (1961). Respiratory quotient during exercise. *Journal of Applied Physiology*, 16, 606-610. <https://doi.org/10.1152/jappl.1961.16.4.606>
- Ivakine, E. A., Acton, B. A., Mahadevan, V., Ormond, J., Tang, M., Pressey, J. C., Huang, M. Y., Ng, D., Delpire, E., Salter, M. W., Woodin, M. A. et McInnes, R. R. (2013). Neto2 is a KCC2 interacting protein required for neuronal Cl⁻ regulation in hippocampal neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(9), 3561-3566. <https://doi.org/10.1073/pnas.1212907110>
- Iwamoto, T., Watanabe, Y., Kita, S. et Blaustein, M. P. (2007). Na⁺/Ca²⁺ exchange inhibitors: A new class of calcium regulators. *Cardiovascular & Hematological Disorders Drug Targets*, 7(3), 188-198. <https://doi.org/10.2174/187152907781745288>
- Javed, K. et Broer, S. (2019). Mice lacking the intestinal and renal neutral amino acid transporter SLC6A19 demonstrate the relationship between dietary protein intake and amino acid malabsorption. *Nutrients*, 11(9). <https://doi.org/10.3390/nu11092024>
- Jennings, M. L. et Adame, M. F. (2001). Direct estimate of 1:1 stoichiometry of K⁺-Cl⁻ cotransport in rabbit erythrocytes. *American Journal of Physiology: Cell Physiology*, 281(3), C825-832. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.2001.281.3.C825>
- Jiang, Y., Lu, L., Hu, Y., Li, Q., An, C., Yu, X., Shu, L., Chen, A., Niu, C., Zhou, L. et Yang, Z. (2016). Resistin induces hypertension and insulin resistance in mice via a TLR4-dependent pathway. *Scientific Reports*, 6, 22193. <https://doi.org/10.1038/srep22193>
- Jiao, Y., Jin, X., Yan, J., Zhang, C., Jiao, F., Li, X., Roe, B. A., Mount, D. B. et Gu, W. (2008). A deletion mutation in Slc12a6 is associated with neuromuscular disease in gaxp mice. *Genomics*, 91(5), 407-414. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2007.12.010>
- Just, A., Faulhaber, J. et Ehmke, H. (2000). Autonomic cardiovascular control in conscious mice. *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 279(6), R2214-2221. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.2000.279.6.R2214>
- Kahle, K. T., Rinehart, J. et Lifton, R. P. (2010). Phosphoregulation of the Na-K-2Cl and K-Cl cotransporters by the WNK kinases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1802(12), 1150-1158. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.07.009>

- Kahle, K. T., Flores, B., Bharucha-Goebel, D., Zhang, J., Donkervoort, S., Hegde, M., Hussain, G., Duran, D., Liang, B., Sun, D., Bonnemann, C. G. et Delpire, E. (2016). Peripheral motor neuropathy is associated with defective kinase regulation of the KCC3 cotransporter. *Science Signaling*, 9(439), ra77. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aae0546>
- Kakazu, Y., Uchida, S., Nakagawa, T., Akaike, N. et Nabekura, J. (2000). Reversibility and cation selectivity of the K⁺-Cl⁻ cotransport in rat central neurons. *Journal of Neurophysiology*, 84(1), 281-288. <https://doi.org/10.1152/jn.2000.84.1.281>
- Kaplan, N. M. et Victor, R. G. (2015). *Kaplan's Clinical Hypertension* (11^e éd.). Wolters Kluwer.
- Keller, J. et Layer, P. (2014). The pathophysiology of malabsorption. *Viszeralmedizin*, 30(3), 150-154. <https://doi.org/10.1159/000364794>
- Kelly, L., Almutairi, M. M., Kursan, S., Pacheco, R., Dias-Junior, E., Castrop, H. et Di Fulvio, M. (2019). Impaired glucose tolerance, glucagon, and insulin responses in mice lacking the loop diuretic-sensitive *Nkcc2a* transporter. *American Journal of Physiology: Cell Physiology*, 317(4), C843-C856. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00144.2019>
- Kent, M. (2000). *Advanced Biology*. Oxford University Press.
- Kim, S. M., Eisner, C., Faulhaber-Walter, R., Mizel, D., Wall, S. M., Briggs, J. P. et Schnermann, J. (2008). Salt sensitivity of blood pressure in NKCC1-deficient mice. *American Journal of Physiology: Renal Physiology*, 295(4), F1230-1238. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.90392.2008>
- Kochli, A., Tenenbaum-Rakover, Y. et Leshem, M. (2005). Increased salt appetite in patients with congenital adrenal hyperplasia 21-hydroxylase deficiency. *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 288(6), R1673-1681. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00713.2004>
- Korner, P. I., Angus, J. A., Bobik, A. et Jennings, G. L. (1991). Amplifier function of resistance vessels and the left ventricle in hypertension. *Journal of Hypertension Supplement*, 9(2), S31-40; discussion S40-31. <https://doi.org/10.1097/00004872-199112002-00005>
- Koster, A., Stenholm, S., Alley, D. E., Kim, L. J., Simonsick, E. M., Kanaya, A. M., Visser, M., Houston, D. K., Nicklas, B. J., Tylavsky, F. A., Satterfield, S., Goodpaster, B. H., Ferrucci, L., Harris, T. B. et Health, A. B. C. S. (2010). Body fat distribution and inflammation among obese older adults with and without metabolic syndrome. *Obesity*, 18(12), 2354-2361. <https://doi.org/10.1038/oby.2010.86>
- Koza, R. A., Nikonova, L., Hogan, J., Rim, J. S., Mendoza, T., Faulk, C., Skaf, J. et Kozak, L. P. (2006). Changes in gene expression foreshadow diet-induced obesity in genetically identical mice. *PLOS Genetics*, 2(5), e81. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020081>
- Kraus, B. J., Sartoretto, J. L., Polak, P., Hosooka, T., Shiroto, T., Eskurza, I., Lee, S. A., Jiang, H., Michel, T. et Kahn, B. B. (2015). Novel role for retinol-binding protein 4 in the regulation of blood pressure. *The FASEB Journal*, 29(8), 3133-3140. <https://doi.org/10.1096/fj.14-266064>
- Krege, J. H., Hodgin, J. B., Hagaman, J. R. et Smithies, O. (1995). A noninvasive computerized tail-cuff system for measuring blood pressure in mice. *Hypertension*, 25(5), 1111-1115. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.25.5.1111>

- Kültz, D. et Csonka, L. (1999). What sets the TonE during osmotic stress? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(5), 1814-1816. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.5.1814>
- Kursan, S., McMillen, T. S., Beesetty, P., Dias-Junior, E., Almutairi, M. M., Sajib, A. A., Kozak, J. A., Aguilar-Bryan, L. et Di Fulvio, M. (2017). The neuronal K⁺Cl⁻ co-transporter 2 (*Slc12a5*) modulates insulin secretion. *Scientific Reports*, 7(1), 1732. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01814-0>
- Laberge, A. M. (2007). La prévalence et la distribution des maladies génétiques au Québec: L'impact du passé sur le présent. *Médecine sciences*, 23(11), 997-1001. <https://doi.org/10.1051/medsci/20072311997>
- Lapointe, J. Y., Bell, P. D. et Cardinal, J. (1990). Direct evidence for apical Na⁺:2Cl⁻:K⁺ cotransport in macula densa cells. *American Journal of Physiology*, 258(5 Pt 2), F1466-1469. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1990.258.5.F1466>
- Larbrisseau, A., Vanasse, M., Brochu, P. et Jasmin, G. (1984). The Andermann syndrome: agenesis of the corpus callosum associated with mental retardation and progressive sensorimotor neuropathy. *Canadian Journal of Neurological Sciences*, 11(2), 257-261. <https://doi.org/10.1017/s0317167100045509>
- Lau, P., Tuong, Z. K., Wang, S. C., Fitzsimmons, R. L., Goode, J. M., Thomas, G. P., Cowin, G. J., Pearen, M. A., Mardon, K., Stow, J. L. et Muscat, G. E. (2015). Rora deficiency and decreased adiposity are associated with induction of thermogenic gene expression in subcutaneous white adipose and brown adipose tissue. *American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism*, 308(2), E159-171. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00056.2014>
- Lauf, P. K. (1983). Thiol-dependent passive K/Cl transport in sheep red cells: I. Dependence on chloride and external ions. *Journal of Membrane Biology*, 73(3), 237-246. <https://doi.org/10.1007/BF01870538>
- Lauf, P. K., Erdmann, A. et Adragna, N. C. (1994). K-Cl cotransport, pH, and role of Mg in volume-clamped low-K sheep erythrocytes: three equilibrium states. *American Journal of Physiology*, 266(1 Pt 1), C95-103. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1994.266.1.C95>
- Lauf, P. K., Adragna, N. C., Dupré, N., Bouchard, J. P. et Rouleau, G. A. (2006). K-Cl cotransport in red blood cells from patients with KCC3 isoform mutants. *Biochemistry and Cell Biology*, 84(6), 1034-1044. <https://doi.org/10.1139/o06-203>
- Laurant, P., Touyz, R. M. et Schiffrin, E. L. (1997). Effect of pressurization on mechanical properties of mesenteric small arteries from spontaneously hypertensive rats. *Journal of Vascular Research*, 34(2), 117-125. <https://doi.org/10.1159/000159209>
- Lavoie, J. L. (2006). Pression artérielle chez la souris avec un nouveau transmetteur miniaturisé. *Sciences et techniques de l'animal de laboratoire*, 31(3/4), 227-229.
- Le Rouzic, P., Ivanov, T. R., Stanley, P. J., Baudoin, F. M., Chan, F., Pinteaux, E., Brown, P. D. et Luckman, S. M. (2006). KCC3 and KCC4 expression in rat adult forebrain. *Brain Research*, 1110(1), 39-45. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.06.055>

- Lee, H. A., Baek, I., Seok, Y. M., Yang, E., Cho, H. M., Lee, D. Y., Hong, S. H. et Kim, I. K. (2010). Promoter hypomethylation upregulates Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter 1 in spontaneously hypertensive rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 396(2), 252-257. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.04.074>
- Leonard, A. M., Chafe, L. L., Montani, J. P. et Van Vliet, B. N. (2006). Increased salt-sensitivity in endothelial nitric oxide synthase-knockout mice. *American Journal of Hypertension*, 19(12), 1264-1269. <https://doi.org/10.1016/j.amjhyper.2006.05.025>
- Les Laboratoires Servier. (s. d.). *Servier Medical Art*. <https://smart.servier.com/>
- Leto, D. et Saltiel, A. R. (2012). Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT4. *Nature Reviews: Molecular Cell Biology*, 13(6), 383-396. <https://doi.org/10.1038/nrm3351>
- Leung, A. A., Bushnik, T., Hennessy, D., McAlister, F. A. et Manuel, D. G. (2009, 20 février). *Facteurs de risque de l'hypertension au Canada* (publication n° 82-003-X). Statistique Canada. <https://www150.statcan.gc.ca/n1/pub/82-003-x/2019002/article/00001-fra.htm>
- Lewandoski, M. (2001). Conditional control of gene expression in the mouse. *Nature Reviews: Genetics*, 2(10), 743-755. <https://doi.org/10.1038/35093537>
- Lewis, M. H., Tanimura, Y., Lee, L. W. et Bodfish, J. W. (2007). Animal models of restricted repetitive behavior in autism. *Behavioural Brain Research*, 176(1), 66-74. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.08.023>
- Liang, K., Wei, L. et Chen, L. (2017). Exocytosis, endocytosis, and their coupling in excitable cells. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10, 109. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00109>
- Lifton, R. P., Gharavi, A. G. et Geller, D. S. (2001). Molecular mechanisms of human hypertension. *Cell*, 104(4), 545-556. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00241-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00241-0)
- Lighton, J. R. B. (2018). *Measuring Metabolic Rates: A Manual for Scientists* (2^e éd.). Oxford University Press.
- Lin, L., Yee, S. W., Kim, R. B. et Giacomini, K. M. (2015). SLC transporters as therapeutic targets: emerging opportunities. *Nature Reviews: Drug Discovery*, 14(8), 543-560. <https://doi.org/10.1038/nrd4626>
- Lin, S. H., Cheng, N. L., Hsu, Y. J. et Halperin, M. L. (2004). Intrafamilial phenotype variability in patients with Gitelman syndrome having the same mutations in their thiazide-sensitive sodium/chloride cotransporter. *American Journal of Kidney Diseases*, 43(2), 304-312. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2003.10.018>
- Linder, C. C. (2006). Genetic variables that influence phenotype. *ILAR Journal*, 47(2), 132-140. <https://doi.org/10.1093/ilar.47.2.132>
- Liu, S., Chang, S., Han, B., Xu, L., Zhang, M., Zhao, C., Yang, W., Wang, F., Li, J., Delpire, E., Ye, S., Bai, X. C. et Guo, J. (2019). Cryo-EM structures of the human cation-chloride cotransporter KCC1. *Science*, 366(6464), 505-508. <https://doi.org/10.1126/science.aay3129>
- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Bretscher, A., Ploegh, H. et Matsudaira, P. T. (2008). *Molecular Cell Biology* (6^e éd.). W. H. Freeman and Company.

- Lucas, O., Hilaire, C., Delpire, E. et Scamps, F. (2012). KCC3-dependent chloride extrusion in adult sensory neurons. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 50(3-4), 211-220. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2012.05.005>
- Lytle, C. et Forbush, B., 3rd. (1992). The Na-K-Cl cotransport protein of shark rectal gland. II. Regulation by direct phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 267(35), 25438-25443.
- Lytle, C., McManus, T. J. et Haas, M. (1998). A model of Na-K-2Cl cotransport based on ordered ion binding and glide symmetry. *American Journal of Physiology*, 274(2), C299-309. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1998.274.2.C299>
- Malha, L. et Mann, S. J. (2016). Loop diuretics in the treatment of hypertension. *Current Hypertension Reports*, 18(4), 27. <https://doi.org/10.1007/s11906-016-0636-7>
- Maltête, D. (2016). Adult-onset stereotypical motor behaviors. *Revue neurologique*, 172(8-9), 477-482. <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2016.07.002>
- Marcoux, A. A., Slimani, S., Tremblay, L. E., Frenette-Cotton, R., Garneau, A. P. et Isenring, P. (2019). Endocytic recycling of Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransporter type 2: importance of exon 4. *Journal of Physiology*, 597(16), 4263-4276. <https://doi.org/10.1113/JP278024>
- Mathieu, J., Bédard, F., Prévost, C. et Langevin, P. (1990). Neuropathie sensitivo-motrice héréditaire avec ou sans agénésie du corps calleux: Étude radiologique et clinique de 64 cas. *Canadian Journal of Neurological Sciences*, 17(2), 103-108. <https://doi.org/10.1017/S0317167100030298>
- Mattes, R. D. (1997). The taste for salt in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, 65(2 Suppl), 692S-697S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/65.2.692S>
- Maughan, R. J., Watson, P. et Shirreffs, S. M. (2015). Implications of active lifestyles and environmental factors for water needs and consequences of failure to meet those needs. *Nutrition Reviews*, 73 Suppl 2, 130-140. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuv051>
- McArdle, W. D., Katch, F. I. et Katch, V. L. (2015). *Exercise Physiology: Nutrition, Energy, and Human Performance* (8^e éd.). Wolters Kluwer.
- McCarthy, J. J., Srikuea, R., Kirby, T. J., Peterson, C. A. et Esser, K. A. (2012). Inducible Cre transgenic mouse strain for skeletal muscle-specific gene targeting. *Skeletal Muscle*, 2(1), 8. <https://doi.org/10.1186/2044-5040-2-8>
- McKusick, V. A., Petersen, M. B. et Kniffin, C. L. (1986, 2016). *Agenesis of the corpus callosum with peripheral neuropathy*; ACCPN. Online Mendelian Inheritance in Man Database. <https://www.omim.org/entry/218000>
- Mecawi, A. d. S., Ruginsk, S. G., Elias, L. L. K., Varanda, W. A. et Antunes-Rodrigues, J. (2015). Neuroendocrine regulation of hydromineral homeostasis. *Comprehensive Physiology*, 5(3), 1465-1516. <https://doi.org/10.1002/cphy.c140031>
- Melo, Z., Cruz-Rangel, S., Bautista, R., Vazquez, N., Castaneda-Bueno, M., Mount, D. B., Pasantes-Morales, H., Mercado, A. et Gamba, G. (2013). Molecular evidence for a role for K⁺-Cl⁻ cotransporters in the kidney. *American Journal of Physiology: Renal Physiology*, 305(10), F1402-1411. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00390.2013>

- Menkes, J. H., Philippart, M. et Clark, D. B. (1964). Hereditary partial agenesis of corpus callosum: Biochemical and pathological studies. *Archives of Neurology*, 11, 198-208. <https://doi.org/10.1001/archneur.1964.00460200094009>
- Mercado, A., Song, L., Vazquez, N., Mount, D. B. et Gamba, G. (2000). Functional comparison of the K⁺-Cl⁻ cotransporters KCC1 and KCC4. *Journal of Biological Chemistry*, 275(39), 30326-30334. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003112200>
- Mercado, A., Vazquez, N., Song, L., Cortes, R., Enck, A. H., Welch, R., Delpire, E., Gamba, G. et Mount, D. B. (2005). NH₂-terminal heterogeneity in the KCC3 K⁺-Cl⁻ cotransporter. *American Journal of Physiology: Renal Physiology*, 289(6), F1246-1261. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00464.2004>
- Mills, P. A., Huetteman, D. A., Brockway, B. P., Zwiers, L. M., Gelsema, A. J., Schwartz, R. S. et Kramer, K. (2000). A new method for measurement of blood pressure, heart rate, and activity in the mouse by radiotelemetry. *Journal of Applied Physiology*, 88(5), 1537-1544. <https://doi.org/10.1152/jappl.2000.88.5.1537>
- Millward, D. J. et Garlick, P. J. (1976). The energy cost of growth. *Proceedings of the Nutrition Society*, 35(3), 339-349. <https://doi.org/10.1079/pns19760054>
- Moore-Hoon, M. L. et Turner, R. J. (1998). Molecular and topological characterization of the rat parotid Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter1. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1373(1), 261-269. [https://doi.org/10.1016/s0005-2736\(98\)00112-6](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(98)00112-6)
- Moore-Hoon, M. L. et Turner, R. J. (2000). The structural unit of the secretory Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter (NKCC1) is a homodimer. *Biochemistry*, 39(13), 3718-3724. <https://doi.org/10.1021/bi992301v>
- Moraes, T. F. et Reithmeier, R. A. (2012). Membrane transport metabolons. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1818(11), 2687-2706. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.06.007>
- Morissette, J. (1991). La consanguinité dans la population de Charlevoix (1680-1852). Dans G. Bouchard et M. De Braekeleer (dir.), *Histoire d'un génome* (p. 107-120). Presses de l'Université du Québec.
- Moser, D., Ekawardhani, S., Kumsta, R., Palmason, H., Bock, C., Athanassiadou, Z., Lesch, K. P. et Meyer, J. (2009). Functional analysis of a potassium-chloride co-transporter 3 (SLC12A6) promoter polymorphism leading to an additional DNA methylation site. *Neuropsychopharmacology*, 34(2), 458-467. <https://doi.org/10.1038/npp.2008.77>
- Mount, D. B., Mercado, A., Song, L., Xu, J., George, A. L., Jr., Delpire, E. et Gamba, G. (1999). Cloning and characterization of KCC3 and KCC4, new members of the cation-chloride cotransporter gene family. *Journal of Biological Chemistry*, 274(23), 16355-16362. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.23.16355>
- Mulvany, M. J. (1999). Vascular remodelling of resistance vessels: Can we define this? *Cardiovascular Research*, 41(1), 9-13. [https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(98\)00289-2](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(98)00289-2)
- Murawski, I. J., Maina, R. W. et Gupta, I. R. (2010). The relationship between nephron number, kidney size and body weight in two inbred mouse strains. *Organogenesis*, 6(3), 189-194. <https://doi.org/10.4161/org.6.3.12125>

- Myers, R. E. (1965). The neocortical commissures and interhemispheric transmission of information. Dans E. G. Ettlinger (dir.), *Functions of the Corpus Callosum* (p. 1-17). J. A. Churchill.
- Naiman, J. et Fraser, F. C. (1955). Agenesis of the corpus callosum; a report of two cases in siblings. *AMA Archives of Neurology and Psychiatry*, 74(2), 182-185. <https://doi.org/10.1001/archneurpsyc.1955.02330140066013>
- National Center for Biotechnology Information. (2004). Style Points and Conventions. Dans *The NCBI Style Guide*. Bethesda. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK988/>
- National Institutes of Health. (s. d.). *National Center for Biotechnology Information Databases*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- Neel, J. V. (1962). Diabetes mellitus: a "thrifty" genotype rendered detrimental by "progress"? *American Journal of Human Genetics*, 14, 353-362.
- Neri, G., Boccutto, L. et Stevenson, R. E. (2019). *Overgrowth Syndromes: A Clinical Guide*. Oxford University Press.
- Newsholme, E. A. et Crabtree, B. (1976). Substrate cycles in metabolic regulation and in heat generation. *Biochemical Society Symposia*, (41), 61-109.
- Noon, J. P., Walker, B. R., Webb, D. J., Shore, A. C., Holton, D. W., Edwards, H. V. et Watt, G. C. (1997). Impaired microvascular dilatation and capillary rarefaction in young adults with a predisposition to high blood pressure. *Journal of Clinical Investigation*, 99(8), 1873-1879. <https://doi.org/10.1172/JCI119354>
- Novak, J., Bailoo, J. D., Melotti, L. et Wurbel, H. (2016). Effect of cage-induced stereotypies on measures of affective state and recurrent perseveration in CD-1 and C57BL/6 mice. *PLOS One*, 11(5), e0153203. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153203>
- O'Donnell, M. E., Martinez, A. et Sun, D. (1995). Endothelial Na-K-Cl cotransport regulation by tonicity and hormones: phosphorylation of cotransport protein. *American Journal of Physiology*, 269(6 Pt 1), C1513-1523. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1995.269.6.C1513>
- O'Shaughnessy, K. M. et Karet, F. E. (2004). Salt handling and hypertension. *Journal of Clinical Investigation*, 113(8), 1075-1081. <https://doi.org/10.1172/JCI21560>
- Oka, Y., Butnaru, M., von Buchholtz, L., Ryba, N. J. et Zuker, C. S. (2013). High salt recruits aversive taste pathways. *Nature*, 494(7438), 472-475. <https://doi.org/10.1038/nature11905>
- Oppermann, M., Mizel, D., Kim, S. M., Chen, L., Faulhaber-Walter, R., Huang, Y., Li, C., Deng, C., Briggs, J., Schnermann, J. et Castrop, H. (2007). Renal function in mice with targeted disruption of the A isoform of the Na-K-2Cl co-transporter. *Journal of the American Society of Nephrology*, 18(2), 440-448. <https://doi.org/10.1681/ASN.2006091070>
- Pearson, M. M., Lu, J., Mount, D. B. et Delpire, E. (2001). Localization of the K⁺-Cl⁻ cotransporter, KCC3, in the central and peripheral nervous systems: expression in the choroid plexus, large neurons and white matter tracts. *Neuroscience*, 103(2), 481-491. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(00\)00567-4](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(00)00567-4)

- Pedersen, T. H., Riisager, A., de Paoli, F. V., Chen, T. Y. et Nielsen, O. B. (2016). Role of physiological ClC-1 Cl⁻ ion channel regulation for the excitability and function of working skeletal muscle. *Journal of General Physiology*, 147(4), 291-308. <https://doi.org/10.1085/jgp.201611582>
- Peretti, N., Marcil, V., Drouin, E. et Levy, E. (2005). Mechanisms of lipid malabsorption in cystic fibrosis: The impact of essential fatty acids deficiency. *Nutrition & Metabolism*, 2(1), 11. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-2-11>
- Peyronnard, J. M., Lapointe, L., Bouchard, J. P., Lamontagne, A., Lemieux, B. et Barbeau, A. (1976). Nerve conduction studies and electromyography in Friedreich's ataxia. *Canadian Journal of Neurological Sciences*, 3(4), 313-317. <https://doi.org/10.1017/s0317167100025518>
- Pilgrim, J. A. (1994). Psychological aspects of high and low blood pressure. *Psychological Medicine*, 24(1), 9-14. <https://doi.org/10.1017/s0033291700026787>
- Pizzorno, J. (2015). The kidney dysfunction epidemic, part 1: Causes. *Integrative Medicine*, 14(6), 8-13.
- Poiseuille, J. L. (1844). *Recherches expérimentales sur le mouvement des liquides dans les tubes de très-petits diamètres*. Imprimerie Royale.
- Poortmans, J. et Boisseau, N. (2017). *Biochimie des activités physiques et sportives* (3^e éd.). De Boeck Supérieur.
- Poursharifi, P., Attané, C., Mugabo, Y., Al-Mass, A., Ghosh, A., Schmitt, C., Zhao, S., Guida, J., Lussier, R., Erb, H., Chénier, I., Peyot, M. L., Joly, E., Noll, C., Carpentier, A. C., Madiraju, S. R. M. et Prentki, M. (2020). Adipose ABHD6 regulates tolerance to cold and thermogenic programs. *JCI Insight*, 5(24). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.140294>
- Prentki, M. et Madiraju, S. R. (2008). Glycerolipid metabolism and signaling in health and disease. *Endocrine Reviews*, 29(6), 647-676. <https://doi.org/10.1210/er.2008-0007>
- Price, E. R. et Mager, E. M. (2020). Respiratory quotient: Effects of fatty acid composition. *Journal of Experimental Zoology Part A, Ecological and Integrative Physiology*, 333(9), 613-618. <https://doi.org/10.1002/jez.2422>
- Prut, L. et Belzung, C. (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: A review. *European Journal of Pharmacology*, 463(1-3), 3-33. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(03\)01272-x](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(03)01272-x)

- Rabi, D. M., McBrien, K. A., Sapir-Pichhadze, R., Nakhla, M., Ahmed, S. B., Dumanski, S. M., Butalia, S., Leung, A. A., Harris, K. C., Cloutier, L., Zarnke, K. B., Ruzicka, M., Hiremath, S., Feldman, R. D., Tobe, S. W., Campbell, T. S., Bacon, S. L., Nerenberg, K. A., Dresser, G. K., Fournier, A., Burgess, E., Lindsay, P., Rabkin, S. W., Prebtani, A. P. H., Grover, S., Honos, G., Alfonsi, J. E., Arcand, J., Audibert, F., Benoit, G., Bittman, J., Bolli, P., Cote, A. M., Dionne, J., Don-Wauchope, A., Edwards, C., Firoz, T., Gabor, J. Y., Gilbert, R. E., Gregoire, J. C., Gryn, S. E., Gupta, M., Hannah-Shmouni, F., Hegele, R. A., Herman, R. J., Hill, M. D., Howlett, J. G., Hundemer, G. L., Jones, C., Kaczorowski, J., Khan, N. A., Kuyper, L. M., Lamarre-Cliche, M., Lavoie, K. L., Leiter, L. A., Lewanczuk, R., Logan, A. G., Magee, L. A., Mangat, B. K., McFarlane, P. A., McLean, D., Michaud, A., Milot, A., Moe, G. W., Penner, S. B., Pipe, A., Poppe, A. Y., Rey, E., Roerecke, M., Schiffrin, E. L., Selby, P., Sharma, M., Shoamanesh, A., Sivapalan, P., Townsend, R. R., Tran, K., Trudeau, L., Tsuyuki, R. T., Vallee, M., Woo, V., Bell, A. D. et Daskalopoulou, S. S. (2020). Hypertension Canada's 2020 Comprehensive Guidelines for the Prevention, Diagnosis, Risk Assessment, and Treatment of Hypertension in Adults and Children. *Canadian Journal of Cardiology*, 36(5), 596-624. <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2020.02.086>
- Race, J. E., Makhlouf, F. N., Logue, P. J., Wilson, F. H., Dunham, P. B. et Holtzman, E. J. (1999). Molecular cloning and functional characterization of KCC3, a new K-Cl cotransporter. *American Journal of Physiology*, 277(6), C1210-1219. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1999.277.6.C1210>
- Ramseyer, V. D. et Garvin, J. L. (2013). Tumor necrosis factor- α : Regulation of renal function and blood pressure. *American Journal of Physiology: Renal Physiology*, 304(10), F1231-1242. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00557.2012>
- Randall, D., Burggen, W. W. et French, K. (2002). *Eckert Animal Physiology: Mechanisms and Adaptations* (5^e éd.). W. H. Freeman and Company.
- Rautureau, Y. et Schiffrin, E. L. (2012). Endothelin in hypertension: An update. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 21(2), 128-136. <https://doi.org/10.1097/MNH.0b013e32834f0092>
- Reissinger, A., Ludwig, M., Utsch, B., Prömse, A., Baulmann, J., Weisser, B., Vetter, H., Kramer, H. J. et Bokemeyer, D. (2002). Novel NCCT gene mutations as a cause of Gitelman's syndrome and a systematic review of mutant and polymorphic NCCT alleles. *Kidney and Blood Pressure Research*, 25(6), 354-362. <https://doi.org/10.1159/000068695>
- Renna, N. F., de Las Heras, N. et Miatello, R. M. (2013). Pathophysiology of vascular remodeling in hypertension. *International Journal of Hypertension*, 2013, 808353. <https://doi.org/10.1155/2013/808353>
- Rinehart, J., Maksimova, Y. D., Tanis, J. E., Stone, K. L., Hodson, C. A., Zhang, J., Risinger, M., Pan, W., Wu, D., Colangelo, C. M., Forbush, B., Joiner, C. H., Gulcicek, E. E., Gallagher, P. G. et Lifton, R. P. (2009). Sites of regulated phosphorylation that control K-Cl cotransporter activity. *Cell*, 138(3), 525-536. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.05.031>
- Rivera, C., Voipio, J., Payne, J. A., Ruusuvuori, E., Lahtinen, H., Lamsa, K., Pirvola, U., Saarma, M. et Kaila, K. (1999). The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature*, 397(6716), 251-255. <https://doi.org/10.1038/16697>

- Rodriguez-Iturbe, B., Romero, F. et Johnson, R. J. (2007). Pathophysiological mechanisms of salt-dependent hypertension. *American Journal of Kidney Diseases*, 50(4), 655-672. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2007.05.025>
- Ronchi, J. A., Figueira, T. R., Ravagnani, F. G., Oliveira, H. C., Vercesi, A. E. et Castilho, R. F. (2013). A spontaneous mutation in the nicotinamide nucleotide transhydrogenase gene of C57BL/6J mice results in mitochondrial redox abnormalities. *Free Radical Biology and Medicine*, 63, 446-456. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.049>
- Rosenfeld, G. (1906). Fett und Kohlenhydrate [Lipides et glucides]. *Berliner klinische Wochenschrift*, (43), 978-981.
- Rosengren, A., Tibblin, G. et Wilhelmsen, L. (1993). Low systolic blood pressure and self perceived wellbeing in middle aged men. *The BMJ*, 306(6872), 243-246. <https://doi.org/10.1136/bmj.306.6872.243>
- Ruiz, C., Gutknecht, S., Delay, E. et Kinnamon, S. (2006). Detection of NaCl and KCl in TRPV1 knockout mice. *Chemical Senses*, 31(9), 813-820. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjl024>
- Rust, M. B., Faulhaber, J., Budack, M. K., Pfeffer, C., Maritzen, T., Didie, M., Beck, F. X., Boettger, T., Schubert, R., Ehmke, H., Jentsch, T. J. et Hubner, C. A. (2006). Neurogenic mechanisms contribute to hypertension in mice with disruption of the K-Cl cotransporter KCC3. *Circulation Research*, 98(4), 549-556. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000204449.83861.22>
- Rust, M. B., Alper, S. L., Rudhard, Y., Shmukler, B. E., Vicente, R., Brugnara, C., Trudel, M., Jentsch, T. J. et Hubner, C. A. (2007). Disruption of erythroid K-Cl cotransporters alters erythrocyte volume and partially rescues erythrocyte dehydration in SAD mice. *Journal of Clinical Investigation*, 117(6), 1708-1717. <https://doi.org/10.1172/JCI30630>
- Sable Systems Int. (s. d.). *Promethion Line*. <https://www.sablesys.com/products/promethion-line/>
- Sackmann-Sala, L., Berryman, D. E., Munn, R. D., Lubbers, E. R. et Kopchick, J. J. (2012). Heterogeneity among white adipose tissue depots in male C57BL/6J mice. *Obesity*, 20(1), 101-111. <https://doi.org/10.1038/oby.2011.235>
- Saier, M. H., Jr. (2000). A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(2), 354-411. <https://doi.org/10.1128/mubr.64.2.354-411.2000>
- Salin-Cantegrel, A., Riviere, J. B., Shekarabi, M., Rasheed, S., Dacal, S., Laganriere, J., Gaudet, R., Rochefort, D., Lesca, G., Gaspar, C., Dion, P. A., Lapointe, J. Y. et Rouleau, G. A. (2011). Transit defect of potassium-chloride Co-transporter 3 is a major pathogenic mechanism in hereditary motor and sensory neuropathy with agenesis of the corpus callosum. *Journal of Biological Chemistry*, 286(32), 28456-28465. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.226894>
- Salway, J. G. (2017). *Metabolism at a Glance* (4^e éd.). Wiley-Blackwell.
- Sanada, H., Jones, J. E. et Jose, P. A. (2011). Genetics of salt-sensitive hypertension. *Current Hypertension Reports*, 13(1), 55-66. <https://doi.org/10.1007/s11906-010-0167-6>
- Sato, C., Sato, M., Iwasaki, A., Doi, T. et Engel, A. (1998). The sodium channel has four domains surrounding a central pore. *Journal of Structural Biology*, 121(3), 314-325. <https://doi.org/10.1006/jsbi.1998.3990>

- Scherrer, U. et Sartori, C. (1997). Insulin as a vascular and sympathoexcitatory hormone: Implications for blood pressure regulation, insulin sensitivity, and cardiovascular morbidity. *Circulation*, 96(11), 4104-4113. <https://doi.org/10.1161/01.cir.96.11.4104>
- Schiffrin, E. L. et Hayoz, D. (1997). How to assess vascular remodelling in small and medium-sized muscular arteries in humans. *Journal of Hypertension*, 15(6), 571-584. <https://doi.org/10.1097/00004872-199715060-00002>
- Schiffrin, E. L. (2004). Remodeling of resistance arteries in essential hypertension and effects of antihypertensive treatment. *American Journal of Hypertension*, 17(12 Pt 1), 1192-1200. <https://doi.org/10.1016/j.amjhyper.2004.05.023>
- Schlatter, E., Salomonsson, M., Persson, A. E. et Greger, R. (1989). Macula densa cells sense luminal NaCl concentration via furosemide sensitive Na⁺2Cl-K⁺ cotransport. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 414(3), 286-290. <https://doi.org/10.1007/BF00584628>
- Schoch, S., Cibelli, G. et Thiel, G. (1996). Neuron-specific gene expression of synapsin I. Major role of a negative regulatory mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 271(6), 3317-3323. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.6.3317>
- Schoner, W. et Scheiner-Bobis, G. (2007). Endogenous and exogenous cardiac glycosides: their roles in hypertension, salt metabolism, and cell growth. *American Journal of Physiology: Cell Physiology*, 293(2), C509-536. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00098.2007>
- Seifert, T. (2014). Exercise and neurologic disease. *Continuum: Lifelong Learning in Neurology*, 20(6 Sports Neurology), 1667-1682. <https://doi.org/10.1212/01.CON.0000458967.63518.92>
- Seja, P., Schonewille, M., Spitzmaul, G., Badura, A., Klein, I., Rudhard, Y., Wisden, W., Hübner, C. A., De Zeeuw, C. I. et Jentsch, T. J. (2012). Raising cytosolic Cl⁻ in cerebellar granule cells affects their excitability and vestibulo-ocular learning. *The EMBO Journal*, 31(5), 1217-1230. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.488>
- Shaer, A. J. (2001). Inherited primary renal tubular hypokalemic alkalosis: A review of Gitelman and Bartter syndromes. *American Journal of the Medical Sciences*, 322(6), 316-332. <https://doi.org/10.1097/00000441-200112000-00004>
- Sharif-Naeini, R., Folgering, J. H., Bichet, D., Duprat, F., Delmas, P., Patel, A. et Honore, E. (2010). Sensing pressure in the cardiovascular system: Gq-coupled mechanoreceptors and TRP channels. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 48(1), 83-89. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.03.020>
- Sharma, S., Hashmi, M. F. et Bhattacharya, P. T. (2021). *Hypotension*. StatPearls. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499961/>
- Shek, E. W., Brands, M. W. et Hall, J. E. (1998). Chronic leptin infusion increases arterial pressure. *Hypertension*, 31(1 Pt 2), 409-414. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.31.1.409>

- Shekarabi, M., Moldrich, R. X., Rasheed, S., Salin-Cantegrel, A., Laganière, J., Rochefort, D., Hince, P., Huot, K., Gaudet, R., Kurniawan, N., Sotocinal, S. G., Ritchie, J., Dion, P. A., Mogil, J. S., Richards, L. J. et Rouleau, G. A. (2012). Loss of neuronal potassium/chloride cotransporter 3 (KCC3) is responsible for the degenerative phenotype in a conditional mouse model of hereditary motor and sensory neuropathy associated with agenesis of the corpus callosum. *Journal of Neuroscience*, 32(11), 3865-3876. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3679-11.2012>
- Shen, M. R., Chou, C. Y., Hsu, K. F., Liu, H. S., Dunham, P. B., Holtzman, E. J. et Ellory, J. C. (2001). The KCl cotransporter isoform KCC3 can play an important role in cell growth regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(25), 14714-14719. <https://doi.org/10.1073/pnas.251388798>
- Sheward, W. J., Naylor, E., Knowles-Barley, S., Armstrong, J. D., Brooker, G. A., Seckl, J. R., Turek, F. W., Holmes, M. C., Zee, P. C. et Harmar, A. J. (2010). Circadian control of mouse heart rate and blood pressure by the suprachiasmatic nuclei: behavioral effects are more significant than direct outputs. *PLOS One*, 5(3), e9783. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009783>
- Shibata, R., Ouchi, N., Kihara, S., Sato, K., Funahashi, T. et Walsh, K. (2004). Adiponectin stimulates angiogenesis in response to tissue ischemia through stimulation of AMP-activated protein kinase signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 279(27), 28670-28674. <https://doi.org/10.1074/jbc.M402558200>
- Shulman, G. I. (2014). Ectopic fat in insulin resistance, dyslipidemia, and cardiometabolic disease. *The New England Journal of Medicine*, 371(12), 1131-1141. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1011035>
- Sievers, F. et Higgins, D. G. (2014). Clustal Omega, accurate alignment of very large numbers of sequences. *Methods in Molecular Biology*, 1079, 105-116. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-646-7_6
- Sigel, E. (1990). Use of *Xenopus* oocytes for the functional expression of plasma membrane proteins. *Journal of Membrane Biology*, 117(3), 201-221. <https://doi.org/10.1007/bf01868451>
- Silver, L. M. (1995). *Mouse Genetics: Concepts and Applications*. Oxford University Press.
- Simard, C. F., Brunet, G. M., Daigle, N. D., Montminy, V., Caron, L. et Isenring, P. (2004). Self-interacting domains in the C terminus of a cation-Cl⁻ cotransporter described for the first time. *Journal of Biological Chemistry*, 279(39), 40769-40777. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406458200>
- Simard, C. F., Bergeron, M. J., Frenette-Cotton, R., Carpentier, G. A., Pelchat, M. E., Caron, L. et Isenring, P. (2007). Homooligomeric and heterooligomeric associations between K⁺-Cl⁻ cotransporter isoforms and between K⁺-Cl⁻ and Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransporters. *Journal of Biological Chemistry*, 282(25), 18083-18093. <https://doi.org/10.1074/jbc.M607811200>
- Simon, D. B., Karet, F. E., Hamdan, J. M., DiPietro, A., Sanjad, S. A. et Lifton, R. P. (1996). Bartter's syndrome, hypokalaemic alkalosis with hypercalciuria, is caused by mutations in the Na-K-2Cl cotransporter NKCC2. *Nature Genetics*, 13(2), 183-188. <https://doi.org/10.1038/ng0696-183>

- Simon, M. M., Greenaway, S., White, J. K., Fuchs, H., Gailus-Durner, V., Wells, S., Sorg, T., Wong, K., Bedu, E., Cartwright, E. J., Dacquin, R., Djebali, S., Estabel, J., Graw, J., Ingham, N. J., Jackson, I. J., Lengeling, A., Mandillo, S., Marvel, J., Meziane, H., Preitner, F., Puk, O., Roux, M., Adams, D. J., Atkins, S., Ayadi, A., Becker, L., Blake, A., Brooker, D., Cater, H., Champy, M. F., Combe, R., Danecek, P., di Fenza, A., Gates, H., Gerdin, A. K., Golini, E., Hancock, J. M., Hans, W., Hölter, S. M., Hough, T., Jurdic, P., Keane, T. M., Morgan, H., Müller, W., Neff, F., Nicholson, G., Pasche, B., Roberson, L. A., Rozman, J., Sanderson, M., Santos, L., Selloum, M., Shannon, C., Southwell, A., Tocchini-Valentini, G. P., Vancollie, V. E., Westerberg, H., Wurst, W., Zi, M., Yalcin, B., Ramirez-Solis, R., Steel, K. P., Mallon, A. M., de Angelis, M. H., Herculat, Y. et Brown, S. D. (2013). A comparative phenotypic and genomic analysis of C57BL/6J and C57BL/6N mouse strains. *Genome Biology*, 14(7), R82. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-7-r82>
- Simon, P., Dupuis, R. et Costentin, J. (1994). Thigmotaxis as an index of anxiety in mice. Influence of dopaminergic transmissions. *Behavioural Brain Research*, 61(1), 59-64. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(94\)90008-6](https://doi.org/10.1016/0166-4328(94)90008-6)
- Škop, V., Liu, N., Guo, J., Gavrilova, O. et Reitman, M. L. (2020). The contribution of the mouse tail to thermoregulation is modest. *American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism*, 319(2), E438-E446. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00133.2020>
- Sohn, J. W. (2015). Network of hypothalamic neurons that control appetite. *BMB Reports*, 48(4), 229-233. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2015.48.4.272>
- Sommer, N., Strielkov, I., Pak, O. et Weissmann, N. (2016). Oxygen sensing and signal transduction in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *European Respiratory Journal*, 47(1), 288-303. <https://doi.org/10.1183/13993003.00945-2015>
- Spaans, F., Wagenmakers, A., Saris, W., Reekers, A., Theunissen, P. et Cremers, H. (1991). Procainamide therapy, physical performance and energy expenditure in the Schwartz-Jampel syndrome. *Neuromuscular Disorders*, 1(5), 371-374. [https://doi.org/10.1016/0960-8966\(91\)90124-b](https://doi.org/10.1016/0960-8966(91)90124-b)
- Speakman, J. R. (2013). Measuring energy metabolism in the mouse - theoretical, practical, and analytical considerations. *Frontiers in Physiology*, 4, 34. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00034>
- Sriramula, S., Haque, M., Majid, D. S. et Francis, J. (2008). Involvement of tumor necrosis factor- α in angiotensin II-mediated effects on salt appetite, hypertension, and cardiac hypertrophy. *Hypertension*, 51(5), 1345-1351. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.102152>
- Stanhewicz, A. E. et Kenney, W. L. (2015). Determinants of water and sodium intake and output. *Nutrition Reviews*, 73 Suppl 2, 73-82. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuv033>
- Stein, W. D. et Litman, T. (2015). *Channels, Carriers, and Pumps: An Introduction to Membrane Transport* (2^e éd.). Elsevier/Academic Press.
- Stone, L. J. et Pangborn, R. M. (1990). Preferences and intake measures of salt and sugar, and their relation to personality traits. *Appetite*, 15(1), 63-79. [https://doi.org/10.1016/0195-6663\(90\)90100-m](https://doi.org/10.1016/0195-6663(90)90100-m)

- Sun, Y. T., Lin, T. S., Tzeng, S. F., Delpire, E. et Shen, M. R. (2010). Deficiency of electroneutral K⁺-Cl⁻ cotransporter 3 causes a disruption in impulse propagation along peripheral nerves. *Glia*, 58(13), 1544-1552. <https://doi.org/10.1002/glia.21028>
- Sun, Y. T., Shieh, C. C., Delpire, E. et Shen, M. R. (2012). K⁺-Cl⁻ cotransport mediates the bactericidal activity of neutrophils by regulating NADPH oxidase activation. *Journal of Physiology*, 590(14), 3231-3243. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.225300>
- Takahashi, N., Chernavvsky, D. R., Gomez, R. A., Igarashi, P., Gitelman, H. J. et Smithies, O. (2000). Uncompensated polyuria in a mouse model of Bartter's syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(10), 5434-5439. <https://doi.org/10.1073/pnas.090091297>
- Tan, P., Blais, C., Nguyen, T. M., Schiller, P. W., Gutkowska, J. et Lavoie, J. L. (2016). Prorenin/renin receptor blockade promotes a healthy fat distribution in obese mice. *Obesity*, 24(9), 1946-1954. <https://doi.org/10.1002/oby.21592>
- The Jackson Laboratory. (1966). *Biology of the Laboratory Mouse* (2^e éd.). Dover Publications, Inc.
- The Jackson Laboratory. (s. d.-a). *Pvalb Gene Detail*. Gene Expression Database at the Mouse Genome Informatics website. <http://www.informatics.jax.org/marker/MGI:97821>
- The Jackson Laboratory. (s. d.-b). *C57BL/6J strain details*. <https://www.jax.org/strain/000664>
- The Jackson Laboratory. (s. d.-c). *Slc12a6^{Gt(OST458419)Lex} gene trapped allele detail*. Mouse Genome Database at the Mouse Genome Informatics website. <http://www.informatics.jax.org/allele/key/36252>
- Thijssen, D. H., Black, M. A., Pyke, K. E., Padilla, J., Atkinson, G., Harris, R. A., Parker, B., Widlansky, M. E., Tschakovsky, M. E. et Green, D. J. (2011). Assessment of flow-mediated dilation in humans: A methodological and physiological guideline. *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology*, 300(1), H2-12. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00471.2010>
- Thomson, S. C. et Blantz, R. C. (2008). Glomerulotubular balance, tubuloglomerular feedback, and salt homeostasis. *Journal of the American Society of Nephrology*, 19(12), 2272-2275. <https://doi.org/10.1681/ASN.2007121326>
- Tong, L. (2005). Acetyl-coenzyme A carboxylase: crucial metabolic enzyme and attractive target for drug discovery. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(16), 1784-1803. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5121-4>
- van der Vusse, G. J. (2009). Albumin as fatty acid transporter. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 24(4), 300-307. <https://doi.org/10.2133/dmpk.24.300>
- Van Poucke, M., Stee, K., Sonck, L., Stock, E., Bosseler, L., Van Dorpe, J., Van Nieuwerburgh, F., Deforce, D., Peelman, L. J., Van Ham, L., Bhatti, S. F. M. et Broeckx, B. J. G. (2019). Truncating SLC12A6 variants cause different clinical phenotypes in humans and dogs. *European Journal of Human Genetics*, 27(10), 1561-1568. <https://doi.org/10.1038/s41431-019-0432-3>

- Van Vliet, B. N., Chafe, L. L., Antic, V., Schnyder-Candrian, S. et Montani, J. P. (2000). Direct and indirect methods used to study arterial blood pressure. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 44(2), 361-373. [https://doi.org/10.1016/s1056-8719\(00\)00126-x](https://doi.org/10.1016/s1056-8719(00)00126-x)
- Van Vliet, B. N., McGuire, J., Chafe, L., Leonard, A., Joshi, A. et Montani, J. P. (2006). Phenotyping the level of blood pressure by telemetry in mice. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 33(11), 1007-1015. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2006.04479.x>
- Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., Smith, H. O., Yandell, M., Evans, C. A., Holt, R. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P., Ballew, R. M., Huson, D. H., Wortman, J. R., Zhang, Q., Kodira, C. D., Zheng, X. H., Chen, L., Skupski, M., Subramanian, G., Thomas, P. D., Zhang, J., Gabor Miklos, G. L., Nelson, C., Broder, S., Clark, A. G., Nadeau, J., McKusick, V. A., Zinder, N., Levine, A. J., Roberts, R. J., Simon, M., Slayman, C., Hunkapiller, M., Bolanos, R., Delcher, A., Dew, I., Fasulo, D., Flanigan, M., Florea, L., Halpern, A., Hannenhalli, S., Kravitz, S., Levy, S., Mobarry, C., Reinert, K., Remington, K., Abu-Threideh, J., Beasley, E., Biddick, K., Bonazzi, V., Brandon, R., Cargill, M., Chandramouliswaran, I., Charlab, R., Chaturvedi, K., Deng, Z., Di Francesco, V., Dunn, P., Eilbeck, K., Evangelista, C., Gabrielian, A. E., Gan, W., Ge, W., Gong, F., Gu, Z., Guan, P., Heiman, T. J., Higgins, M. E., Ji, R. R., Ke, Z., Ketchum, K. A., Lai, Z., Lei, Y., Li, Z., Li, J., Liang, Y., Lin, X., Lu, F., Merkulov, G. V., Milshina, N., Moore, H. M., Naik, A. K., Narayan, V. A., Neelam, B., Nusskern, D., Rusch, D. B., Salzberg, S., Shao, W., Shue, B., Sun, J., Wang, Z., Wang, A., Wang, X., Wang, J., Wei, M., Wides, R., Xiao, C., Yan, C., Yao, A., Ye, J., Zhan, M., Zhang, W., Zhang, H., Zhao, Q., Zheng, L., Zhong, F., Zhong, W., Zhu, S., Zhao, S., Gilbert, D., Baumhueter, S., Spier, G., Carter, C., Cravchik, A., Woodage, T., Ali, F., An, H., Awe, A., Baldwin, D., Baden, H., Barnstead, M., Barrow, I., Beeson, K., Busam, D., Carver, A., Center, A., Cheng, M. L., Curry, L., Danaher, S., Davenport, L., Desilets, R., Dietz, S., Dodson, K., Doup, L., Ferreira, S., Garg, N., Gluecksmann, A., Hart, B., Haynes, J., Haynes, C., Heiner, C., Hladun, S., Hostin, D., Houck, J., Howland, T., Ibegwam, C., Johnson, J., Kalush, F., Kline, L., Koduru, S., Love, A., Mann, F., May, D., McCawley, S., McIntosh, T., McMullen, I., Moy, M., Moy, L., Murphy, B., Nelson, K., Pfannkoch, C., Pratts, E., Puri, V., Qureshi, H., Reardon, M., Rodriguez, R., Rogers, Y. H., Romblad, D., Ruhfel, B., Scott, R., Sitter, C., Smallwood, M., Stewart, E., Strong, R., Suh, E., Thomas, R., Tint, N. N., Tse, S., Vech, C., Wang, G., Wetter, J., Williams, S., Williams, M., Windsor, S., Winn-Deen, E., Wolfe, K., Zaveri, J., Zaveri, K., Abril, J. F., Guigo, R., Campbell, M. J., Sjolander, K. V., Karlak, B., Kejariwal, A., Mi, H., Lazareva, B., Hatton, T., Narechania, A., Diemer, K., Muruganujan, A., Guo, N., Sato, S., Bafna, V., Istrail, S., Lippert, R., Schwartz, R., Walenz, B., Yooseph, S., Allen, D., Basu, A., Baxendale, J., Blick, L., Caminha, M., Carnes-Stine, J., Caulk, P., Chiang, Y. H., Coyne, M., Dahlke, C., Mays, A., Dombroski, M., Donnelly, M., Ely, D., Esparham, S., Fosler, C., Gire, H., Glanowski, S., Glasser, K., Glodek, A., Gorokhov, M., Graham, K., Gropman, B., Harris, M., Heil, J., Henderson, S., Hoover, J., Jennings, D., Jordan, C., Jordan, J., Kasha, J., Kagan, L., Kraft, C., Levitsky, A., Lewis, M., Liu, X., Lopez, J., Ma, D., Majoros, W., McDaniel, J., Murphy, S., Newman, M., Nguyen, T., Nguyen, N., Nodell, M., Pan, S., Peck, J., Peterson, M., Rowe, W., Sanders, R., Scott, J., Simpson, M., Smith, T., Sprague, A., Stockwell, T., Turner, R., Venter, E., Wang, M., Wen, M., Wu, D., Wu, M., Xia, A., Zandieh, A. et Zhu, X. (2001). The sequence of the human genome. *Science*, 291(5507), 1304-1351. <https://doi.org/10.1126/science.1058040>

- Vidal-Petiot, E., Elvira-Matelot, E., Mutig, K., Soukaseum, C., Baudrie, V., Wu, S., Cheval, L., Huc, E., Cambillau, M., Bachmann, S., Doucet, A., Jeunemaitre, X. et Hadchouel, J. (2013). WNK1-related familial hyperkalemic hypertension results from an increased expression of L-WNK1 specifically in the distal nephron. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(35), 14366-14371. <https://doi.org/10.1073/pnas.1304230110>
- Visitech Systems Inc. (s. d.). *BP-2000 blood pressure analysis system™*. <http://www.visitechsystems.com/>
- Voet, D. et Voet, J. G. (2016). *Biochimie* (traduit par L. Domenjoud; 3^e éd.). De Boeck Supérieur. (ouvrage original publié en 2010)
- Wall, S. M., Trinh, H. N. et Woodward, K. E. (1995). Heterogeneity of NH₄⁺ transport in mouse inner medullary collecting duct cells. *American Journal of Physiology*, 269(4 Pt 2), F536-544. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1995.269.4.F536>
- Wang, B., Rong, X., Duerr, M. A., Hermanson, D. J., Hedde, P. N., Wong, J. S., Vallim, T. Q., Cravatt, B. F., Gratton, E., Ford, D. A. et Tontonoz, P. (2016). Intestinal phospholipid remodeling is required for dietary-lipid uptake and survival on a high-fat diet. *Cell Metabolism*, 23(3), 492-504. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.01.001>
- Wang, H. et Eckel, R. H. (2009). Lipoprotein lipase: From gene to obesity. *American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism*, 297(2), E271-288. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90920.2008>
- Wang, T., Delpire, E., Giebisch, G., Hebert, S. C. et Mount, D. B. (2003, 11 au 15 avril 2003). *Impaired fluid and bicarbonate absorption in proximal tubules (PT) of KCC3 knockout mice* [Communication par affiche]. Experimental Biology 2003 Annual Meeting, San Diego, CA, É.-U. Publié dans *FASEB J*, 17(4 S1), A464.
- Wang, T., Weinbaum, S. et Weinstein, A. M. (2017). Regulation of glomerulotubular balance: Flow-activated proximal tubule function. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 469(5-6), 643-654. <https://doi.org/10.1007/s00424-017-1960-8>
- Weir, J. B. (1949). New methods for calculating metabolic rate with special reference to protein metabolism. *Journal of Physiology*, 109(1-2), 1-9. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1949.sp004363>
- Wesson, L. G., Jr., Anslow, W. P., Jr. et Smith, H. W. (1948). The excretion of strong electrolytes. *Bulletin of the New York Academy of Medicine*, 24(9), 586-606.
- Wilde, E., Aubdool, A. A., Thakore, P., Baldissera, L., Jr., Alawi, K. M., Keeble, J., Nandi, M. et Brain, S. D. (2017). Tail-cuff technique and its influence on central blood pressure in the mouse. *Journal of the American Heart Association*, 6(6). <https://doi.org/10.1161/JAHA.116.005204>
- Wilson, F. H., Disse-Nicodeme, S., Choate, K. A., Ishikawa, K., Nelson-Williams, C., Desitter, I., Gunel, M., Milford, D. V., Lipkin, G. W., Achard, J. M., Feely, M. P., Dussol, B., Berland, Y., Unwin, R. J., Mayan, H., Simon, D. B., Farfel, Z., Jeunemaitre, X. et Lifton, R. P. (2001). Human hypertension caused by mutations in WNK kinases. *Science*, 293(5532), 1107-1112. <https://doi.org/10.1126/science.1062844>

- Wilson, F. H., Kahle, K. T., Sabath, E., Lalioti, M. D., Rapson, A. K., Hoover, R. S., Hebert, S. C., Gamba, G. et Lifton, R. P. (2003). Molecular pathogenesis of inherited hypertension with hyperkalemia: the Na-Cl cotransporter is inhibited by wild-type but not mutant WNK4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(2), 680-684. <https://doi.org/10.1073/pnas.242735399>
- Worsch, S., Heikenwalder, M., Hauner, H. et Bader, B. L. (2018). Dietary n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids upregulate energy dissipating metabolic pathways conveying anti-obesogenic effects in mice. *Nutrition & Metabolism*, 15, 65. <https://doi.org/10.1186/s12986-018-0291-x>
- Xie, Y., Chang, S., Zhao, C., Wang, F., Liu, S., Wang, J., Delpire, E., Ye, S. et Guo, J. (2020). Structures and an activation mechanism of human potassium-chloride cotransporters. *Science Advances*, 6(50). <https://doi.org/10.1126/sciadv.abc5883>
- Yanai, S. et Endo, S. (2021). Functional aging in male C57BL/6J mice across the life-span: A systematic behavioral analysis of motor, emotional, and memory function to define an aging phenotype. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 13, 697621. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.697621>
- Young, D. B. (2010). *Control of Cardiac Output*. Morgan & Claypool Life Sciences.
- Zacchigna, L., Vecchione, C., Notte, A., Cordenonsi, M., Dupont, S., Maretto, S., Cifelli, G., Ferrari, A., Maffei, A., Fabbro, C., Braghetta, P., Marino, G., Selvetella, G., Aretini, A., Colonnese, C., Bettarini, U., Russo, G., Soligo, S., Adorno, M., Bonaldo, P., Volpin, D., Piccolo, S., Lembo, G. et Bressan, G. M. (2006). Emilin1 links TGF-beta maturation to blood pressure homeostasis. *Cell*, 124(5), 929-942. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.12.035>
- Zellweger, H. (1952). Agenesis corporis callosi [Agenesis of the corpus callosum]. *Helvetica Paediatrica Acta*, 7(2), 136-155.
- Zhang, F., Hao, G., Shao, M., Nham, K., An, Y., Wang, Q., Zhu, Y., Kusminski, C. M., Hassan, G., Gupta, R. K., Zhai, Q., Sun, X., Scherer, P. E. et Oz, O. K. (2018). An adipose tissue atlas: An image-guided identification of human-like BAT and beige depots in rodents. *Cell Metabolism*, 27(1), 252-262 e253. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.12.004>
- Zhang, J., Lauf, P. K. et Adragna, N. C. (2003). Platelet-derived growth factor regulates K-Cl cotransport in vascular smooth muscle cells. *American Journal of Physiology: Cell Physiology*, 284(3), C674-680. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00312.2002>
- Zhang, J., Xu, D., Nie, J., Cao, J., Zhai, Y., Tong, D. et Shi, Y. (2014). Monoacylglycerol acyltransferase-2 is a tetrameric enzyme that selectively heterodimerizes with diacylglycerol acyltransferase-1. *Journal of Biological Chemistry*, 289(15), 10909-10918. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.530022>
- Zhao, W., Zhao, T., Chen, Y., Bhattacharya, S. K., Lu, L. et Sun, Y. (2017). Differential expression of hypertensive phenotypes in BXD mouse strains in response to angiotensin II. *American Journal of Hypertension*, 31(1), 108-114. <https://doi.org/10.1093/ajh/hpx144>
- Zhao, X., Ho, D., Gao, S., Hong, C., Vatner, D. E. et Vatner, S. F. (2011). Arterial pressure monitoring in mice. *Current Protocols in Mouse Biology*, 1, 105-122. <https://doi.org/10.1002/9780470942390.mo100149>

Ziegler, E. (1958). Bosartige, familiäre, fruhsinfantile Krampfkrankheit, teilweise verbunden mit familiärer Balkenaplasie [Malignant familial early infantile convulsive disorders, partial relation with aplasia of corpus callosum]. *Helvetica Paediatrica Acta*, 13(2), 169-184.

Annexe 1 : Équations décrivant les paramètres cardiovasculaires

Tel que mentionné à la section 3 de l'*Introduction*, la pression artérielle (PA) peut être définie comme une fonction du débit cardiaque (DC) et de la résistance périphérique (RP) :

$$PA \propto DC \times RP \quad \text{Équation 1}$$

Le DC peut être décomposé en ses déterminants, c'est-à-dire qu'il est une fonction de la fréquence cardiaque (FC) et du volume d'éjection systolique (VES) :

$$DC = FC \times VES \quad \text{Équation 2}$$

Tel que mentionné à la section 3.3.2 de l'*Introduction*, les propriétés mécaniques passives des vaisseaux peuvent être évaluées à l'aide d'un artériographe en condition de déplétion calcique. À partir des changements de diamètres associés aux changements de pression de perfusion, il est possible de quantifier différentes propriétés de même que leur dépendance à la pression.

Par exemple, la tension pariétale (*circumferential wall stress* ou σ) modélise la force s'exerçant sur la circonférence du vaisseau à une pression donnée :

$$\text{Tension pariétale} = \frac{\text{Pression} \times \text{Diamètre}_{\text{interne}}}{2 \times \text{Paroi}} \times \text{Coefficient} \quad \text{Équation 3}$$

Le coefficient permet de convertir des mesures de dimension et de pression en mesures de force s'appliquant sur une surface (tenant compte que $1 \text{ mmHg} \cong 133,4 \text{ dyn} \cdot \text{cm}^{-2}$; [Laurant et collab., 1997](#)). Une élévation de tension pariétale peut être indicative d'un manque d'adaptation de la paroi vasculaire aux conditions hémodynamiques et précède habituellement une réponse hypertrophique ([Gruionu et collab., 2012](#)).

Un autre indicateur important des propriétés de la paroi vasculaire est la relation entre la déformation circonférentielle (*circumferential strain* ou ε) et la pression de perfusion. La

déformation circonférentielle se calcule sur un écart donné de pression en exprimant le changement de dimension du vaisseau par rapport à la dimension initiale (Laurant et collab., 1997) :

$$\text{Déformation circonférentielle} = \frac{\Delta \text{diamètre}_{\text{interne}}}{\text{Diamètre}_{\text{interne à pression nulle}}} \quad \text{Équation 4}$$

Un vaisseau plus déformable sera caractérisé par une variation plus marquée de la déformation circonférentielle en réponse à l'augmentation de la PA, alors qu'un vaisseau rigide se déformera moins (Laurant et collab., 1997).

Il a été question (à la section 3.2.1.2 de l'*Introduction*) de la compliance des vaisseaux dans le cadre d'une autorégulation par le diamètre. Il est possible de calculer, toujours sur un écart donné de pression, la propension naturelle d'une artère à augmenter en dimension pour chaque incrément d'une unité de pression (Hall, 2016), et ce, sans égard à la réponse myogénique qui s'en suivrait naturellement :

$$\text{Compliance} = \frac{\Delta \text{volume}}{\Delta \text{pression}} \quad \text{Équation 5}$$

La compliance donne un indice sur les propriétés élastiques d'un vaisseau et sa teneur en fibres élastiques ou rigides. Toutefois, puisque le calibre initial d'un vaisseau conditionne fortement la capacité de celui-ci à changer de dimension, il est courant de calculer la distensibilité afin d'exprimer la compliance relative à la dimension initiale en pourcentage (Hall, 2016) :

$$\text{Distensibilité} = \frac{\text{Compliance}}{\text{Volume initial}} \times 100 \% = \frac{\Delta \text{volume}}{\Delta \text{pression} \times \text{Volume initial}} \times 100 \% \quad \text{Équation 6}$$

Ce paramètre dérivé de la compliance permet d'apprécier les propriétés d'un vaisseau sans égard à son calibre et donc de faire des comparaisons entre des sujets dont les vaisseaux sont différents en conditions initiales, ou même entre des territoires vasculaires distincts chez un même sujet. La distensibilité est une propriété essentielle des artères conductives, et une perte de distensibilité est typiquement associée à une hausse de la PA pulsée (Korner et collab., 1991).

L'observation des vaisseaux dans un système artériographique permet également de mesurer, en conditions physiologiques, la réactivité vasculaire à des agents vasomodulateurs. Par exemple, le

pourcentage de contraction d'un vaisseau correspond à la diminution fractionnelle du diamètre interne en comparaison avec le diamètre initial (Laurant et collab., 1997) :

$$\text{Contraction} = \frac{\Delta \text{diamètre}_{\text{interne}}}{\text{Diamètre}_{\text{interne initial}}} \times 100 \% \quad \text{Équation 7}$$

La caractérisation de la relaxation d'un vaisseau nécessite une précontraction. La pratique la plus courante est de fournir, après évaluation de la réactivité à la norépinéphrine (NÉ), une dose de cet agent associée à une contraction sous-maximale (70 à 80 % selon la source) de ce même vaisseau de manière à maximiser le potentiel de relaxation. Le pourcentage de relaxation est ensuite calculé d'après le changement qu'il représente relativement à la précontraction obtenue (Laurant et collab., 1997; Herring et Paterson, 2018) :

$$\text{Relaxation} = \frac{\Delta \text{diamètre}_{\text{interne}}}{\text{Précontraction}} \times 100 \% = \frac{\Delta \text{diamètre}_{\text{interne}}}{\text{Diamètre}_{\text{interne avec NÉ}} - \text{Diamètre}_{\text{interne initial}}} \times 100 \% \quad \text{Équation 8}$$

Annexe 2 : Réponses cardiovasculaires attribuables à l'agonisme adrénérgique

Tableau 4 Principaux effets cardiovasculaires de l'activation des récepteurs adrénérgiques

Type	Couplage	Distribution	Effets principaux
α_1	G_q	Vaisseaux	↑ contraction; hypertrophie
		Cœur	↑ contraction; hypertrophie
		Tubule proximal	Réabsorption hydrosodée
α_{2A}	G_i	Terminaisons sympathiques	Rétroinhibition des catécholamines
		Bulbe rachidien	Suppression sympathique
α_{2B}	G_i	Vaisseaux résistifs	↑ contraction
α_{2C}	G_i	Terminaisons sympathiques	Rétroinhibition des catécholamines
β_1	G_s	Cœur	↑ contractilité; ↑ fréquence cardiaque
β_2	G_s	Cellules juxtaglomérulaires	Sécrétion de rénine
		Certaines artères [1]	↓ contraction
β_3	G_s	[2]	[2]

Note. ↑, augmentation. G_i , protéine G inhibitrice de l'adénylate cyclase. G_q , protéine G activant la phospholipase C. G_s , protéine G stimulant l'adénylate cyclase. Les sous-types α_{1A} , α_{1B} et α_{1D} ne sont pas détaillés ici pour des raisons de simplicité.

[1] Principalement les artères coronaires, hépatiques et celles des muscles squelettiques.

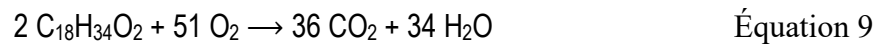
[2] Le récepteur β_3 n'est pas connu pour influencer directement la fonction cardiovasculaire ou rénale; il est surtout impliqué dans la réponse thermorégulatrice.

(Informations tirées de [Hall, 2016](#); [Herring et Paterson, 2018](#)).

Annexe 3 : Précisions quant au quotient respiratoire

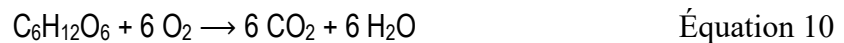
La section 4.3.2.3 de l'*Introduction* évoque la notion de quotient respiratoire (QR). Le présent annexe vise à présenter des exemples permettant de calculer le QR pour des substrats énergétiques courants et fait ressortir les différences entre les lipides et les glucides.

Dans le cas de l'acide gras le plus abondamment oxydé dans l'organisme, l'acide oléique (acide cis-octadéc-9-énoïque, 18:1 cis-9), la réaction d'oxydation complète est :



Le QR associé à l'acide oléique vaut donc 0,71 ([Kent, 2000](#); [Price et Mager, 2020](#)). Selon la formule chimique de chaque acide gras, le QR varie entre 0,69 et 0,73, et la valeur de 0,7 est typiquement associée à une situation où une cellule oxyde exclusivement des lipides ou, plus précisément, des acides gras ([McArdle et collab., 2015](#)).

En ce qui concerne le glucose, l'équation décrivant l'oxydation complète de chaque molécule est :



Le QR associé à une oxydation exclusive de glucose est de 1. Comme la structure chimique des glucides suit généralement la formule $(\text{CH}_2\text{O})_n$, les proportions relatives de dioxygène consommé et de dioxyde de carbone produits lors de l'oxydation des glucides ne varient sensiblement pas ([Voet et Voet, 2016](#)).

Il ressort de cela que les lipides, en particulier les acides gras saturés, sont des molécules riches en carbone et pauvres en oxygène, donc passablement réduites du point de vue oxydoréducteur ([McArdle et collab., 2015](#); [Voet et Voet, 2016](#)). La combustion complète d'un acide gras nécessite de grandes quantités d'oxygène pour chaque atome de carbone de substrat en comparaison avec d'autres nutriments comme les glucides. Cette différence s'explique par le fait que les produits directs de l'oxydation des substrats énergétiques composés de carbone, d'hydrogène et d'oxygène sont le dioxyde de carbone et l'eau. Dans le cas d'un substrat énergétique riche en hydrogène et pauvre en oxygène comme un acide gras, chaque atome de carbone de l'acide gras devra

obligatoirement être combiné à une molécule de dioxygène provenant de l'air inspiré, ce qui produira une quantité équimolaire de dioxyde de carbone. De plus, les atomes d'hydrogène de l'acide gras devront, eux, être combinés à des molécules de dioxygène additionnelles pour former de l'eau. Ainsi, l'oxydation complète d'un acide gras nécessite plus de molécules de dioxygène par rapport au nombre de molécules de dioxyde de carbone produites ([McArdle et collab., 2015](#); [Salway, 2017](#)).