

2m11.2630.2

Université de Montréal

**Clonage et caractérisation d'un nouveau gène, *Hypertension-related-calcium-regulated gene (HCaRG)* exprimé chez le rat et l'humain**

par

Sylvie Richard

Département de Médecine

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès sciences (M.Sc.)

en Sciences Biomédicales

Mai, 1998

© Sylvie Richard, 1998



3 08 24 1998

W  
4  
U58  
1998  
V.070

L'Université de Montréal

Étude et caractérisation d'un nouveau gène (l'apoptase) - relation - alchimie - relation  
pour (HCR) exprimé chez le rat et l'humain

par  
Sylvie Richard  
Département de Médecine  
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Maître ès sciences (M.Sc.)  
en Sciences Biomédicales

Mai 1998

© Sylvie Richard, 1998



Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

**Clonage et caractérisation d'un nouveau gène, *Hypertension-related-calcium-regulated gene (HCaRG)* exprimé chez le rat et l'humain**

présenté par:

Sylvie Richard

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

.....	Dr. André Lacroix	président-rapporteur
.....	Dr. Johanne Tremblay	directrice de recherche
.....	Dr. John Chan	examineur externe

Mémoire accepté le : .....

## SOMMAIRE

L'ion calcium est un premier et second messenger cellulaire dans une grande variété de fonctions importantes telles, la prolifération et la division cellulaire, la régulation des flux ioniques, la sécrétion et la contraction. Une balance calcique négative a été notée dans l'hypertension expérimentale et certaines formes d'hypertension humaine représentée par une concentration de calcium intracellulaire élevée en présence d'une concentration de calcium extracellulaire faible. Cette augmentation de calcium intracellulaire a été reliée, entre autres, à l'hypercontractilité des cellules du muscle lisse vasculaire favorisant l'augmentation de la pression artérielle. Notre groupe a cloné un nouveau gène régulé négativement par le calcium extracellulaire, comme la parathormone (PTH), dont l'expression est accrue dans les cellules de parathyroïde de rats SHR comparativement aux témoins normotendus (WKY). Nous l'avons donc nommé le *Hypertension-related-calcium-regulated gene* (HCaRG). Les objectifs de ce projet était de cloner et de séquencer le cDNA humain de HCaRG et de déterminer son expression chez l'humain. De plus, il était dans notre intérêt de localiser le gène de HCaRG sur les chromosomes du rat et de l'humain et de débiter des études fonctionnelles de la protéine HCaRG. Nous avons amplifié le gène de HCaRG par PCR à partir du DNA génomique extrait de lymphocytes humains. Ce fragment a été cloné et séquencé. L'expression de HCaRG chez l'humain a été vérifiée par RT-PCR dans des extraits de RNA totaux de plusieurs tissus normaux et pathologiques. La localisation chromosomique de HCaRG a été accomplie à l'aide d'un panel de rats recombinants consanguins (RIS) après avoir déterminé la carte de restriction de HCaRG des rats SHR et BN.*lx* effectuée en utilisant six enzymes de restriction différentes. Finalement, l'effet de la surexpression de la protéine HCaRG a été étudiée sur l'activité du cotransporteur  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  dans des cellules eucaryotes (COS-7) transfectées avec un plasmide d'expression contenant HCaRG. Par PCR, nous avons amplifié et cloné un fragment de 900pb de HCaRG humain dont 505pb ont été séquencés. Une comparaison des séquences de HCaRG humain et de rat a révélé une homologie de 77% en acides nucléiques et de 86% en acides aminés. Le codon d'initiation de la traduction ainsi que le motif apparenté au *EF-hand* sont tout les deux conservés dans la séquence humaine.

L'expression de HCaRG a été démontrée par RT-PCR dans plusieurs tissus humains normaux particulièrement dans une parathyroïde, les surrénales, le pancréas, les lymphocytes, le sein, l'estomac et le colon ainsi que dans des tissus pathologiques notamment les glandes parathyroïdes hyperplasiques et adénomateuses, les surrénales provenant d'un patient atteint d'un phéochromocytome, un cancer du sein, du colon et de l'estomac. Un polymorphisme de restriction (RFLP) de 10Kpb a été révélé entre les rats SHR et BN.*lx*. Les rats RIS qui ont été génotypés pour ce RFLP a permis de localiser HCaRG sur le chromosome 7 du rat entre les marqueurs CYP11B2 et Myc. Cette région du chromosome est synténique à la région q21-q24 du chromosome 8 humain. Les études fonctionnelles initiales ont porté sur l'effet de HCaRG sur les transporteurs ioniques. Ainsi, l'activité du cotransporteur  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  déterminé par l'influx de  $^{86}\text{Rb}$  montre qu'une augmentation de l'osmolarité du milieu d'incubation de 320 à 370mosm par exemple, active le cotransporteur de 25% dans les cellules COS-7 non transfectées ou transfectées sans DNA ou avec le plasmide pcDNAneoI seul. Cependant, la surexpression de HCaRG inhibe cette activation du cotransport importante pour ramener la cellule à sa volémie normale.

osmolarité (mosmoles)	cellules non transfectées	cellules transfectées sans DNA	cellules transfectées avec plasmide pcDNAneoI seul	cellules transfectées avec plasmide pcDNAneoI contenant HCaRG
320	68,4 ± 2,1	68,5 ± 6,0	66,5 ± 6,5	61,2 ± 11,1
370	82,7 ± 3,0	76,9 ± 11,4	84,9 ± 6,3	65,5 ± 2,1

En conclusion, HCaRG est exprimé dans plusieurs tissus humains normaux et pathologiques. Le motif apparenté au *EF-hand* est conservé dans la séquence de HCaRG humain suggérant une activité de liaison du calcium. Par ailleurs, HCaRG est localisé sur le chromosome humain 8q21-q24, dans un locus exprimant plusieurs pathologies humaines des reins et des os suggérant que HCaRG pourrait être impliqué dans ces maladies. Finalement, des anomalies du transport d'ions sont observés dans l'hypertension artérielle suggérant que HCaRG pourrait être impliqué dans la régulation anormale du cotransporteur  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ .

## TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES.....	V
LISTE DES TABLEAUX.....	VIII
LISTE DES FIGURES .....	IX
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	XI
REMERCIEMENTS.....	XIII
<b>I-REVUE DE LA LITTÉRATURE.....</b>	<b>1</b>
<b>1. Le rôle physiologique du calcium .....</b>	<b>1</b>
1.1 Implication du calcium dans les phénomènes cellulaires.....	1
1.2 L'homéostasie calcique dans l'organisme.....	4
<i>A) Le système endocrinien .....</i>	<i>5</i>
<i>B) Organes effecteurs.....</i>	<i>9</i>
1.3 La glande parathyroïde, rôle central dans l'homéostasie du calcium.....	18
<i>A) Facteurs qui influencent la sécrétion de l'hormone PTH.....</i>	<i>18</i>
<i>B) Facteurs qui influencent l'expression du gène de la PTH.....</i>	<i>21</i>
<i>C) Organes principaux impliqués dans l'élimination de la PTH.....</i>	<i>22</i>
1.4 Les gènes régulés négativement par le calcium extracellulaire .....	23
<b>2. Les récepteurs du calcium .....</b>	<b>25</b>
2.1 Clonage des récepteurs pouvant détecter les variations de calcium.....	25
2.2 Structure et fonction des récepteurs du calcium.....	28
<i>A) Structure .....</i>	<i>28</i>
<i>B) Fonction.....</i>	<i>28</i>
<i>C) Régulation de leur expression.....</i>	<i>30</i>
<i>D) Rôle dans la maladie .....</i>	<i>31</i>
<b>3. Les protéines intracellulaires liant le calcium .....</b>	<b>33</b>
3.1 Familles de protéines.....	33
<i>A) La famille des protéines EF-hand .....</i>	<i>33</i>
<i>B) La famille des protéines dépendantes du calcium liant les phospholipides     (annexines et protéines possédant une région C2).....</i>	<i>34</i>
<i>C) La famille des protéines responsables du stockage du calcium.....</i>	<i>35</i>
3.2 Types de liaison du calcium.....	35
<i>A) Forte affinité.....</i>	<i>35</i>
<i>B) Faible affinité .....</i>	<i>36</i>
3.3 Rôle de ces protéines dans les fonctions cellulaires.....	36

<i>A) La famille des protéines EF-hand</i> .....	36
<i>B) La famille des protéines dépendantes du calcium liant les phospholipides (annexines et protéines possédant une région C2)</i> .....	38
<i>C) La famille des protéines responsable du stockage du calcium</i> .....	38
3.4 Études des anomalies du calcium dans l'hypertension artérielle .....	38
<i>A) La membrane cellulaire, origine des anomalies du métabolisme ionique</i> .....	38
<i>B) Le transport de l'ion calcium dans l'hypertension artérielle</i> .....	39
<i>C) Le rôle du sodium dans l'hypertension artérielle</i> .....	42
<i>D) Les mécanismes de séquestration du calcium intracellulaire dans l'hypertension artérielle</i> .....	47
<i>E) Le métabolisme du calcium extracellulaire dans l'hypertension artérielle</i> .....	47
<i>F) Les protéines liant le calcium dans l'hypertension artérielle</i> .....	48
<b>4. La Génétique</b> .....	<b>51</b>
4.1 Modèles animaux .....	52
<b>5. Études initiales de HCaRG</b> .....	<b>54</b>
<b>II-MATÉRIEL &amp; MÉTHODES</b> .....	<b>57</b>
<b>1. Études fonctionnelles de HCaRG de rat</b> .....	<b>57</b>
1.1 Culture cellulaire .....	57
1.2 Préparation du plasmide et de l'insert.....	57
1.3 Transfection pour les études des transporteurs d'ions .....	58
1.4 Mesure de l'efficacité de la transfection (activité $\beta$ -galactosidase) .....	59
1.5 Vérification de l'expression de HCaRG.....	60
1.6 Étude du cotransporteur $\text{Na}^+\text{K}^+2\text{Cl}^-$ (expérience type) .....	60
1.7 Étude de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{H}^+$ .....	62
1.8 Étude de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ .....	62
1.9 Dosage des protéines.....	63
<b>2. Clonage et séquençage de HCaRG humain</b> .....	<b>63</b>
2.1 Clonage de HCaRG humain.....	63
2.2 Séquençage de HCaRG humain .....	64
<b>3. Études d'expression de HCaRG chez l'humain</b> .....	<b>64</b>
3.1 RT-PCR.....	64
3.2 Expression de la protéine HCaRG in vitro.....	65
<b>4. Localisation chromosomique de HCaRG humain</b> .....	<b>66</b>
4.1 Carte de restriction .....	66
4.2 Génotypage des rats recombinants consanguins (RIS) .....	67

<b>III-RÉSULTATS .....</b>	<b>68</b>
<b>1. Études de HCaRG de rat.....</b>	<b>68</b>
1.1 Étude du cotransporteur $\text{Na}^+\text{K}^+2\text{Cl}^-$ dans des cellules transfectées avec HCaRG .....	68
<b>2. Études de HCaRG humain.....</b>	<b>76</b>
2.1 Clonage et séquençage de la région codante du gène de HCaRG humain.....	76
2.2 Études d'expression de HCaRG chez l'humain .....	82
2.3 Expression de la protéine HCaRG <i>in vitro</i> .....	90
<b>IV-DISCUSSION.....</b>	<b>98</b>
<b>1. L'homéostasie ionique dans l'hypertension.....</b>	<b>98</b>
1.1 Anomalies de la concentration intracellulaire des ions sodium et calcium dans l'hypertension.....	98
1.2 Anomalies de l'absorption de calcium par les rein et les intestins.....	99
1.3. Anomalies du transport ionique dans l'hypertension.....	100
1.4. HCaRG comme modulateur du cotransporteur $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ .....	102
<b>2. Métabolisme du calcium dans l'hypertension .....</b>	<b>107</b>
2.1. Hormones calciotropiques et la glande parathyroïde .....	107
2.2. Densité osseuse dans l'hypertension.....	110
2.3. Protéines intracellulaires liant le calcium dans l'hypertension .....	111
<b>3. La sécrétion, le calcium et l'hypertension artérielle .....</b>	<b>113</b>
3.1. Calcium et exocytose .....	113
<b>4. Analyses génétiques de HCaRG.....</b>	<b>118</b>
<b>V-CONCLUSIONS.....</b>	<b>120</b>
<b>VI-RÉFÉRENCES .....</b>	<b>122</b>
<b>VII-ANNEXE 1 .....</b>	<b>159</b>
<b>1. Manuscrit de HCaRG.....</b>	<b>159</b>



**LISTE DES TABLEAUX**

- Tableau I:** Liste des récepteurs sensibles au calcium récemment clonés **p. 27**
- Tableau II:** Effet de la surexpression de HCaRG dans des cellules eucaryotes sur les flux de sodium et de calcium **p. 70**
- Tableau III:** Évaluation qualitative de l'expression du mRNA de HCaRG dans différents tissus chez le rat et l'humain en utilisant la parathyroïde comme point de comparaison **p. 87**
- Tableau IV:** Analyse de l'association du polymorphisme de HCaRG avec des phénotypes intermédiaires de l'hypertension artérielle chez les rats recombinants consanguins **p. 96**

## LISTE DES FIGURES

- Figure 1:** Structure du plasmide pcDNAneoI p. 57
- Figure 2:** Expression de HCaRG par RT-PCR dans les cellules non transfectées, transfectées sans DNA, transfectées avec le plasmide pcDNAneoI seul et transfectées avec le plasmide pcDNAneoI contenant HcaRG p. 72
- Figure 3:** Effet de la transfection de HCaRG dans des cellules COS-7
- a:** sur l'activité du cotransporteur  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  p. 74
- b:** sur la perméabilité passive du rubidium ( $^{86}\text{Rb}$ ) p. 74
- Figure 4:** Alignement des séquences en acides nucléiques de HCaRG humain et de rat p. 79
- Figure 5a:** Alignement des séquences en acides aminés de HCaRG humain et de rat p. 81
- b:** Comparaison de la séquence du motif apparenté au *EF-hand* de HCaRG avec les motifs *EF-hand* de la calmoduline, de la troponine C et de la protéine liant l'actine. p. 81
- Figure 6:** Expression de HCaRG par RT-PCR chez l'humain
- a:** dans une parathyroïde normale, une surrénale normale et une surrénale d'un patient atteint d'un phéochromocytome. p. 84
- b:** dans une parathyroïde d'un patient atteint d'hyperparathyroïdie primaire et d'un patient atteint d'hyperparathyroïdie secondaire p. 84
- c:** dans la portion endocrine du pancréas p. 84

- Figure 7:** Expression de HCaRG par RT-PCR chez l'humain
- a:** dans un cancer du colon, un cancer de l'estomac et un cancer du sein **p. 86**
  - b:** dans des lymphocytes de patients hypertendus **p. 86**
- Figure 8:** Expression de la protéine HCaRG par transcription couplée à la traduction *in vitro* **p. 89**
- Figure 9a:** Carte de restriction du gène de HCaRG des souches de rats SHR et BN.*lx* **p. 92**
- b:** Génotypage des rats recombinants consanguins (RIS) pour le polymorphisme de HcaRG **p. 92**
- Figure10:** Localisation chromosomique de HCaRG chez le rat et l'humain **p. 94**

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACTB	protéine liant l'actine
ATP	adénosine triphosphate
BN.1	rats normotendus <i>Brown Norway</i>
BoPCaR	<i>Bovine parathyroid calcium receptor</i>
CaBP9k	calbindine-9K
CaBP28	calbindine-28K
CAII	anhydrase carbonique II
cAMP	adénosine 3', 5'-monophosphate ou AMP cyclique
cDNA	acide désoxyribonucléique complémentaire
Cellules C	cellules parafolliculaires de la glande thyroïde
CaM	calmoduline
cGMP	guanosine 3', 5'-monophosphate ou GMP cyclique
CGRP	<i>calcitonin-gene-related peptide</i>
CPA	<i>calmodulin phosphodiesterase activator</i>
CMV	<i>cytomegalovirus</i>
CaR	récepteur du calcium
CT	calcitonine
C-terminal(aux)	carboxy-terminal(aux)
DAG	diacylglycérol
DNA	acide désoxyribonucléique
EDTA	acide éthylènediamine tetracétique
HBH	hélice-boucle-hélice
HCaRG	<i>Hypertension-related-calcium-regulated gene</i>
HHF	hypercalcémie hypocalciurique familiale
HNS	hypercalcémie néonatale sévère
HuKCaR	<i>Human kidney calcium receptor</i>
HumCaR	<i>Human calcium receptor</i>
IL-6	Interleukine-6
IMCAL	<i>Integral Membrane Calcium-binding protein</i>
IP <sub>3</sub>	inositol trisphosphate
KDa	KiloDalton
Kpb	Kilo paires de bases
µg	microgramme
µL	microlitre
mg	milligramme
mM	millimole/litre
mosm	milliosmole
mRNA	acide ribonucléique messenger
nCARE	<i>negative calcium response element</i>
ng	nanogramme
N-terminal(aux)	amino-terminal(aux)
PAGE	<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>
pb	paires de bases
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>

PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDE	phosphodiesterase
p.e.	pas effectué
PHF	<i>parathyroid hypertensive factor</i>
PIP <sub>2</sub>	phosphatidyl inositol bisphosphate
PKA	protéine kinase A
PKC	protéine kinase C
PLA <sub>2</sub>	phospholipase A <sub>2</sub>
PLC	phospholipase C
PTH	parathormone
RaKCaR	<i>rat kidney calcium receptor</i>
rANP	peptide natriurétique de l'oreillette de rat
RE	réticulum endoplasmique
RFLP	<i>restriction fragment length polymorphism</i>
RIS	<i>recombinant inbred strain</i>
RS	réticulum sarcoplasmique
RT	<i>reverse transcriptase</i>
SDS	sodium dodécyl sulfate
SHR	rats spontanément hypertendus
SHRsp	rats spontanément hypertendus susceptibles aux accidents cérébraux vasculaires
SPTC	cellules de parathyroïdes de rats spontanément hypertendus
ssDNA	acide désoxyribonucléique de sperme de saumon
SV-40	virus sémien 40
TPC	troponine C
VEC	cellules endothéliales vasculaires
VDR	récepteur à la vitamine D
VSMC	cellules du muscle lisse vasculaire
WKY	rats normotendus Wistar-Kyoto
WPTC	cellules de parathyroïdes de rats normotendus Wistar-Kyoto
1,25 (OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	métabolite actif de la vitamine D
5'UTR	5' non traduite
<sup>86</sup> Rb	isotope <sup>86</sup> rubidium
<sup>42</sup> K	isotope <sup>42</sup> potassium

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier ma directrice de mémoire, Dr Johanne Tremblay pour son encouragement et sa disponibilité tout au cours de mes deux années de maîtrise. Son sens critique ainsi que son vaste champ de connaissance m'ont permis d'achever avec succès la rédaction de ce mémoire. Et au Dr Pavel Hamet pour ses conseils et ses commentaires constructifs lors du processus d'écriture.

A mes collègues de travail, Suzanne, Dr Jia, Rocio, Marie-Josée, Pierre, Carole, Gilles, Monique et Régis vos conseils ainsi que votre expérience ont grandement participé au fondement et à l'enrichissement de mes connaissances.

Un merci tout spécial à ma famille, vos mots d'encouragement m'ont certainement aidé tout au long de mon cheminement académique surtout dans les moments les plus décisifs. Votre patience et votre volonté sans fin ont été fort appréciés. Sachez que sans vous, je ne serais pas rendue où j'en suis, un gros merci.

Je tiens également à remercier la Société Québécoise d'Hypertension Artérielle qui m'a accordé une bourse me permettant d'accomplir ce travail.

## **I-REVUE DE LA LITTÉRATURE**

### **1. Le rôle physiologique du calcium**

#### **1.1 Implication du calcium dans les phénomènes cellulaires**

La plupart des fonctions cellulaires sont régulées par l'homéostasie des ions, en particulier de l'ion calcium. En effet, l'ion calcium est très versatile en ce qui a trait à ses rôles biologiques. Celui-ci a été impliqué comme second messenger intracellulaire dans diverses fonctions cellulaires dont la prolifération, la division, la régulation de l'expression des gènes, la régulation des flux ioniques, la libération des neurotransmetteurs, la sécrétion, la contraction et la transduction des signaux intracellulaires (1-12). Le calcium extracellulaire a aussi été impliqué dans la stabilisation des membranes cellulaires et la coagulation sanguine (13-17). L'approfondissement des connaissances sur la participation du calcium dans autant de phénomènes intracellulaires qu'extracellulaires a fait du calcium un grand sujet d'études ces dernières années.

Plusieurs second messagers sont impliqués dans les voies de transduction du signal intracellulaire. En fait, ces seconds messagers sont des marqueurs de la stimulation cellulaire. Une des voies de signalisation importante se produit via des récepteurs couplés aux protéines G. Ces récepteurs sont typiquement composés de sept passages transmembranaires. Les protéines G sont des protéines hétérotrimériques dont les trois sous-unités sont appelées  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . Plusieurs protéines G ont des fonctions distinctes, par exemple la protéine  $G_s$  est stimulatrice tandis que la protéine  $G_i$  est inhibitrice (18,19). Lorsque la protéine G est stimulée, la sous-unité  $\alpha$  se détache du complexe trimérique et va activer un effecteur. L'effecteur peut varier selon le type de protéine G qui est stimulé. Les protéines G finissent par activer plusieurs événements cellulaires qui vont favoriser l'augmentation de la concentration des second messagers intracellulaires. Les deux seconds messagers principaux touchés par les protéines G sont l'AMP cyclique (cAMP) et l'ion calcium (18,19). Le cAMP est produit via une enzyme liée à la membrane plasmique,

l'adenylyl cyclase. Le cAMP agit en activant une protéine kinase appelée protéine kinase A (PKA). Les substrats de la PKA varient selon le type cellulaire expliquant pourquoi les effets du cAMP varient d'une cellule à l'autre. L'augmentation de la concentration du calcium cytosolique est assurée par la stimulation de l'enzyme phospholipase C (PLC) via une protéine  $G_q$ . La PLC activée hydrolyse un phosphoinositide de la membrane cellulaire le phosphatidyl inositol bisphosphate ( $PIP_2$ ) en inositol trisphosphate ( $IP_3$ ) et en diacylglycérol (DAG). L' $IP_3$  stimule des récepteurs situés sur les organelles responsable du stockage du calcium dans le cytoplasme (e.g. réticulum endoplasmique ou sarcoplasmique) permettant la mobilisation du calcium. Le DAG est responsable de l'activation d'une protéine kinase cytosolique, la protéine kinase C (PKC). Lorsqu'activée, la PKC phosphoryle des protéines cibles sur des résidus sérine ou thréonine entraînant ensuite une réponse cellulaire (20,21).

Le calcium joue un rôle prépondérant dans la contraction des cellules du muscle squelettique (3,22), du muscle lisse vasculaire (4,22-25) et du muscle cardiaque (22). Le stimulus principal pour la contraction de ces cellules est l'augmentation de la concentration cytosolique de calcium. La voie de signalisation de la PLC est alors impliquée. Rappelons que ses second messagers sont impliqués dans la libération du calcium emmagasiné dans le réticulum sarcoplasmique et possiblement dans l'activation de l'échangeur  $Na^+/H^+$  situé dans la membrane cellulaire (26,27). Ceci mène ultimement à la contraction des cellules du muscle lisse vasculaire. La PKC, quant à elle, a été impliqué dans les processus de phosphorylation des protéines liant l'actine. Elle agirait comme régulatrice de la contraction des cellules du muscle lisse vasculaire (28) et de la transmission du signal provenant de facteurs mitogéniques conduisant à une réponse proliférative (29). Il est intéressant de noter qu'une cascade d'effet est entamée par le calcium à son propre profit, c.-à-d. une augmentation des niveaux intracellulaires de calcium .

Le calcium a été impliqué également dans le processus de stimulus-sécrétion des cellules endocrines et exocrines (3,6-8,22,30-34). Il est documenté dans la littérature que les étapes de sécrétion dépendantes du calcium dans les terminaisons nerveuses sont



achevées par deux protéines spécifiques liant le calcium, la synaptotagmine et le CAPS, *Ca-activated protein for secretion* (3,8). Ces dernières interagissent avec les phospholipides acides de la surface interne de la bicouche lipidique et du cytosquelette. Dans les cellules chromaffines des surrénales, une activation directe des récepteurs nicotiniques et cholinergiques dépolarise la membrane cellulaire et active des canaux calciques sensibles au voltage. Ceci résulte en une augmentation du niveau de calcium intracellulaire. Cette augmentation est un stimulus puissant pour l'exocytose des vésicules sécrétoires (3,6,7,30) favorisant la libération des catécholamines. De plus, des protéines liant le calcium de la famille des S-100 semblent favoriser la sécrétion de l'insuline des cellules des îlots de Langerhans (3,31). La sécrétion de neurotransmetteurs (acide  $\gamma$ -aminobutyrique et acétylcholine par exemple) par les terminaisons nerveuses est également dépendante d'une augmentation rapide des niveaux intracellulaires de calcium. Ainsi, plusieurs protéines liant le calcium et des organelles impliquées dans le stockage du calcium se retrouvent dans les terminaisons nerveuses (35,36).

La prolifération cellulaire est un autre phénomène très dépendant du calcium. Rappelons que plusieurs pathologies prolifératives peuvent présenter un dérèglement de l'équilibre calcique telles le cancer, l'athérosclérose et l'hypertension (1,3,37-40). Le contrôle de la prolifération par le calcium extracellulaire est médié par l'activation d'une protéine kinase dépendante de la calmoduline la *Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase* et d'une phosphoprotéine phosphatase 2B (calcineurin) (41,42). Une étude menée par Boynton *et al.* (43) a démontré que la synthèse de DNA pouvait être initiée en augmentant le calcium dans le milieu de culture de 20 $\mu$ M à 1,25mM. L'importance du calcium dans la mitogénèse est aussi appuyée par le fait que l'application de bloqueurs des canaux calciques inhibe la prolifération cellulaire (41,44). Le groupe de Ko (45) a démontré que les anticalciques diltiazem et néfidipine, inhibent l'incorporation de thymidine tritiée (<sup>3</sup>H-thymidine) dans le DNA des cellules musculaires lisses vasculaires (VSMC) en culture stimulées par l'angiotensine II et le PDGF BB, *Platelet Derived Growth Factor BB*. L'angiotensine II est connu pour induire l'hypertrophie et/ou l'hyperplasie des VSMC

(46,47) tandis que le PDGF BB est un facteur mitogénique dans plusieurs types cellulaires incluant les VSMC (48,49). De plus, des évidences démontrent que les niveaux de calcium nucléaire augmentent de façon importante lors de stimuli mitogéniques (50). Finalement, des membres de la famille des protéines liant le calcium, les S-100, semblent plus exprimés dans des tumeurs telles que les cancers du sein, du colon et de la thyroïde (51).

Une interaction très étroite existe entre les ions calcium et sodium (52). Ces interactions se produisent au niveau cellulaire principalement via l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  et la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase (23,53-55). L'échangeur fonctionne dans une direction seulement, c.-à-d. la sortie d'un ion calcium pour l'entrée de trois ions sodium alors que la pompe favorise l'entrée d'un ion potassium pour la sortie d'un ion sodium. L'activité de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  est indirectement contrôlée par le gradient électrochimique d'ions maintenu par l'hydrolyse de l'ATP par la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase (54,55). Comme pour toutes les cellules contractiles incluant les cellules cardiaques, une augmentation rapide de la concentration de calcium cytosolique est le stimulus favorisant la contraction. L'interaction entre les ion sodium et calcium est primordiale pour ramener les taux intracellulaires de calcium à leur état de base. Une interaction existe aussi entre le magnésium et le calcium. Effectivement, le magnésium influence plusieurs transporteurs d'ions, notamment l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (56). Dans le rein, la concentration de magnésium de la région péri-tubulaire de la partie ascendante de l'anse de Henle contrôle l'absorption de magnésium de même que celle du calcium (57).

## 1.2 L'homéostasie calcique dans l'organisme

Vu les rôles très diversifiés du calcium dans les cellules, la régulation de celui-ci se doit d'être parfaitement contrôlée. En effet, une variété d'hormones sont impliquées dans la régulation de sa concentration tant à l'intérieur qu'à l'extérieur de la cellule. Dans l'organisme, 98 à 99% du calcium se retrouve dans l'os et dans les dents sous forme de sels de phosphate de calcium (hydroxyapatite). Une grande partie de cette réserve de calcium est stable et peut être mobilisée lentement alors qu'une petite fraction seulement peut être

utilisée rapidement. La majorité du calcium extracellulaire est sous forme lié, soit à des protéines plasmatiques anioniques (e.g. albumine) soit à des phospholipides membranaires (16,58). L'homéostasie calcique de l'organisme repose sur deux systèmes agissant en synergie, on retrouve en premier lieu le système endocrinien comprenant la parathormone (PTH), la calcitonine (CT), le 1,25 dihydroxycholécalférol ( $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ), le *calcitonin gene related peptide* (CGRP) et les oestrogènes. En deuxième lieu, ce sont les organes effecteurs comme les intestins, les reins, les os et la glande thyroïde.

### A) Le système endocrinien

#### *La parathormone (PTH) et la vitamine D ( $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ )*

Le système hormonal principal est la parathyroïde qui synthétise la PTH. La sécrétion de la PTH est sous le contrôle intrinsèque du niveau de calcium extracellulaire. Cette hormone est particulière par le fait qu'elle est négativement régulée par le calcium extracellulaire, c.-à-d. sa sécrétion est augmentée par l'hypocalcémie et est diminuée dans le cas d'hypercalcémie. En fait, la PTH est l'hormone initiatrice du processus de retour à la normale de la calcémie. L'augmentation plasmatique de la PTH est un stimulus puissant pour la production de la vitamine D ( $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ) par les cellules des tubules proximaux du rein. Cette dernière, qui est le métabolite le plus actif du cholécalférol, entre dans la circulation et se fixe sur des récepteurs spécifiques dans plusieurs organes cibles tels les épithéliums du rein et de l'intestin. À ce niveau, la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  agit en augmentant la synthèse de protéines liant le calcium, la calbindine 28K (CaBP28K) et la IMCAL, *Integral Membrane Calcium-binding protein*. Suite à la liaison du calcium sur les protéines, il y a augmentation de l'absorption rénale et intestinale du calcium (41,59-65).

Toujours en état d'hypocalcémie, la PTH et la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  peuvent augmenter l'activité des ostéoclastes (66-68) et favoriser ainsi la mobilisation du calcium de l'os. Il est suggéré que ces hormones peuvent aussi augmenter le nombre d'ostéoclastes en favorisant la différenciation et/ou la fusion de leur précurseurs mononucléaires (cellules hématopoïétiques de la lignée des monocytes-macrophages) (69,70). Cependant, ces deux

hormones semblent agir indirectement puisqu'aucun récepteur à la PTH ni à la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  n'a été démontré sur les ostéoclastes matures (71).

Simultanément, la PTH et la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  inhibent directement les ostéoblastes afin de privilégier la résorption osseuse (71). En fait, il a été proposé que les signaux arrivant de la PTH et de la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  stimuleraient la production d'un facteur par les ostéoblastes, le *Osteoclast-Differentiation Factor*. Ce facteur, comme son nom l'indique, serait responsable de la différenciation des cellules progénitrices des ostéoclastes (69). La PTH le fait via un récepteur membranaire spécifique couplé aux protéines G (69,72). L'association de la PTH à son récepteur stimule la production de cAMP via l'adénylyl cyclase. Rappelons que l'effet final du cAMP est d'activer la PKA (60,69). La  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  induit la production d'IL-6 par les ostéoblastes via le récepteur VDR, *vitamin D receptor*. L'IL-6 serait responsable de la prolifération et de la différenciation des ostéoclastes (69,70,73). De plus, la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  produit une augmentation transitoire du calcium intracellulaire qui agit comme second messager médiant les actions inhibitrices de la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . Il est connu qu'un des effets des hormones calcitropiques sur leur organes cibles est d'augmenter les niveaux de calcium intracellulaire (59,60). Des récepteurs à la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ont été identifiés dans les cellules musculaires lisses (23,74), les myocytes (2,23), les cellules endothéliales (2,23), les cellules parathyroïdiennes ainsi que dans les cellules intestinales (75).

#### *La calcitonine (CT)*

Dans le cas où la calcémie est trop élevée, il y a synthèse de la calcitonine (CT) par les cellules parafolliculaires de la thyroïde (cellules C). Le mode d'action de cette hormone n'est pas encore tout à fait clair, mais il est suggéré qu'elle inhibe directement la résorption osseuse par les ostéoclastes via un récepteur spécifique dans ces cellules inhibant aussi la mobilisation du calcium de l'os (16,59,69,76,77). Il a été démontré que la calcitonine sécrétée en réponse à un repas riche en calcium favorise le transfert du calcium vers l'os en inhibant l'activité des ostéoclastes de façon transitoire (78). La calcitonine agit directement

sur les ostéoclastes via la stimulation de l'adénylyl cyclase. Ceci résulte en l'immobilisation et en la contraction des ostéoclastes ayant pour but de les éloigner de la surface osseuse (76,77). Il est clair que l'importance de la minéralisation osseuse est plus grande chez le fœtus et chez l'enfant en pleine croissance et diminue avec l'âge. À cet égard, il a été démontré que le niveau de calcitonine circulant est plus élevé chez le fœtus et que la sécrétion de la calcitonine est plus efficace chez l'enfant, diminuant chez l'adulte (67). Des effets directs de la calcitonine ont été démontrés dans la région distale du néphron. Effectivement, c'est sur le segment ascendant de l'anse large de Henle que la calcitonine stimule l'absorption du calcium via la production du cAMP (79). Par ailleurs, la PTH aurait une activité anabolisante directe sur l'os démontrée par l'infusion intermittente de PTH exogène. Cet effet de la PTH serait médié par la production d'un facteur anabolique local dans l'os, comme l'IGF-1, *insulin growth factor-1* (80).

#### *Le Calcitonin gene-related peptide (CGRP) et les oestrogènes*

Deux autres systèmes hormonaux, ayant cependant un impact direct moindre sur l'homéostasie calcique sont le CGRP et les oestrogènes. Le mécanisme d'action des oestrogènes dans le maintien de l'homéostasie calcique n'est pas tout à fait compris. Cependant, il est très bien connu que les oestrogènes sont impliqués dans la prévention de l'ostéoporose (70,81,82). Les taux faibles d'oestrogène plasmatique sont associés à une réabsorption calcique faible et à un taux de résorption osseuse élevé. Il a été proposé que les oestrogènes inhibent la sécrétion de l'interleukine-6 (IL-6) par les cellules du stroma de la moelle osseuse avec une réduction subséquente de l'activité des ostéoclastes (83). Le groupe de Girasole (81) a montré que le 17 $\beta$ -estradiol induit une inhibition de la production d'IL-6 par des cellules du stroma de la moelle osseuse ainsi que dans une lignée de cellules ostéoblastiques. Cette inhibition est parallèle à une diminution de la quantité du mRNA de l'IL-6. L'IL-6 serait impliquée dans l'augmentation du *turnover* osseux en absence d'oestrogènes (70). Le groupe de Jilka (83) a démontré qu'une perte d'oestrogène suite à une ovariectomie chez les souris menait à une augmentation du nombre de cellules

progénitrices des ostéoclastes, un développement privilégié des ostéoclastes dans des cultures de moelle osseuse *ex vivo* et une augmentation du nombre d'ostéoclastes dans les os trabéculaires. Ces résultats suggèrent l'implication de l'IL-6 dans la prolifération et la différenciation des cellules progénitrices des ostéoclastes (69,70). Ainsi, l'IL-6 pourrait être impliqué dans l'augmentation de la résorption osseuse observée dans l'ostéoporose chez les femmes post-ménoposées. Il est connu que les femmes à la ménopause souffrant d'ostéoporose, en plus d'avoir une résorption osseuse élevée, ont une diminution de l'absorption de calcium par l'intestin. Or, le groupe de Arjmandi (84) a démontré que l'injection d'oestrogène à des rats augmentait la réabsorption calcique *in vivo* par une action directe sur l'intestin. Ce résultat est appuyé par des expériences précédentes qui ont permis d'observer la présence de récepteurs aux oestrogènes sur les cellules intestinales et qui ont démontré que le  $17\beta$ -estradiol est capable de stimuler l'absorption calcique par des cellules intestinales *in vitro* (85). Donc, il est clair par ces expériences, que les oestrogènes jouent un rôle très important dans le métabolisme du calcium et renforce l'utilité des suppléments d'oestrogène chez les femmes ménopausées.

Le CGRP est un neuropeptide de 37 acides aminés dérivé d'un épissage alternatif du gène de la calcitonine. Il est exprimé dans le système nerveux central et dans les fibres sensorielles périphériques qui innervent les vaisseaux sanguins et les viscères (86-88). Le CGRP est un vasodilatateur important démontré par des études *in vitro* et *in vivo* (89,90). Des récepteurs spécifiques au CGRP sont présents sur les membranes des cellules du muscle lisse vasculaire et le CGRP stimule la production de cAMP dans ce tissu sans affecter la production de cGMP (91). Les nucléotides cycliques (cAMP et cGMP) sont les produits de l'adénylyl cyclase et la guanylyl cyclase respectivement et sont connus pour médier les effets vasorelaxants (92). Dû à ses effets vasorelaxants, il était intéressant de vérifier si l'expression du CGRP pourrait être modulée par le calcium. Le calcium étant invariablement impliqué dans la contraction des cellules du muscle lisse vasculaire (4,23-26,54). Ainsi, DiPette *et al.* (93) ont montré que la concentration de CGRP dans la moelle épinière peut être modulée par l'ingestion de calcium alimentaire. Pareillement, Ahren *et*

al. (94) ont démontré une sécrétion de CGRP parallèle à celle de la calcitonine par les thyroïdes perfusées et que ce phénomène est régulé par la concentration ambiante de calcium. Un rôle direct sur l'homéostasie calcique du CGRP reste à déterminer.

## **B) Organes effecteurs**

La deuxième composante du maintien de l'homéostasie calcique est évidemment celle qui permet de répondre aux stimuli hormonaux, c.-à-d. les organes effecteurs. Les plus importants sont les intestins (le tractus gastro-intestinal), les os, les reins et les cellules parafolliculaires de la glande thyroïde (cellules C).

### *Le tractus gastro intestinal*

Le rôle principal attribué à l'estomac est celui de solubiliser le calcium ingéré. L'acide gastrique ainsi que des acides sécrétés par les cellules muqueuses de l'intestin grêle, les liquides pancréatiques et biliaires ont tous un rôle équivalent, soit de solubiliser le calcium pour qu'il puisse être absorbé (16,95).

Le rôle des intestins est un peu plus complexe que cela car il implique la participation d'hormones qui modulent l'absorption du calcium. Tout le tractus intestinal participe à l'absorption du calcium. Le degré d'absorption dépend de deux facteurs soit le degré d'activité d'absorption et la durée de la présence du calcium dans tel ou tel segment de l'intestin. L'activité d'absorption est la plus grande dans le duodénum et décroît jusqu'au colon descendant où elle est la plus faible. Étant donné que l'iléon est le plus long segment, le calcium y demeure plus longtemps ce qui fait que l'absorption du calcium est plus importante dans cette partie de l'intestin (16).

Des récepteurs à la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  sont présents dans les cellules intestinales (75). Ceci implique une action directe de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  sur ces cellules afin d'assurer une absorption adéquate de calcium par le tractus gastro-intestinal. Ce processus est actif et implique un mouvement transcellulaire du calcium. Le mouvement calcique suit trois étapes soit en premier lieu le calcium traverse la membrane plasmique luminale de la

cellule et est transporté à l'intérieur, facilité par son gradient électrochimique. En deuxième lieu, il y a la translocation du calcium à travers le cytosol des entérocytes et finalement, un transport actif du calcium à travers la membrane plasmique basolatérale vers la circulation sanguine (96). De plus, le calcium ainsi que la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  modulent la production de protéines des entérocytes capables de lier le calcium soit les calbindines dépendantes de la vitamine D (Calbindine-9K, CaBP9K) (97,98) et modulent l'activité des protéines impliquées dans le transport du calcium comme la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (99). La  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de concert avec l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  serait responsable du transport actif du calcium à travers la membrane basolatérale des entérocytes (100). Brehier *et al.* (97) ont observé une augmentation de huit fois du mRNA de la protéine CaBP9K en transférant des cellules de duodénum de rat d'un milieu sans calcium à un milieu contenant 1,2mM de calcium, impliquant une régulation directe par le calcium extracellulaire.

### *Les os*

Le remodelage de l'os est un processus actif qui oscille entre la résorption osseuse, effectuée par les ostéoclastes et la formation osseuse, effectuée par les ostéoblastes. Les ostéoclastes activés procèdent à la résorption en se fixant solidement à la surface osseuse et en sécrétant du HCl (acide chloridrique) et des protéases acides dans l'espace entre l'ostéoclaste et l'os (101). Les ostéoblastes, d'autre part, sont responsables de la synthèse des vésicules matricielles qui jouent un rôle important dans la minéralisation de la matrice osseuse (16,80,102).

Les os sont constitués en majorité de calcium et de phosphate et d'une plus faible quantité de sodium et de magnésium. Le couplage de la formation osseuse à la résorption osseuse est nécessaire au maintien des flux ioniques entre les os et le milieu extracellulaire ou le plasma (67). Même en l'absence de PTH, le couplage est maintenu mais à un plus faible niveau (67). Chaque jour, un humain normal verra environ 500mg de calcium libéré de ses os par le processus de résorption alors que la même quantité de calcium sera apportée à ses os par le processus de minéralisation. Les os, desquels le calcium est plus facilement



mobilisable sont les vertèbres, le crâne, les mâchoires et les côtes (16). Rappelons que deux hormones ont un rôle important et influencent directement le processus dynamique de l'os; il s'agit de la PTH et de la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  qui augmentent la libération du calcium et du phosphate des os. Ces deux hormones agissent en accroissant l'activité des ostéoclastes indirectement via leurs récepteurs sur les ostéoblastes (66-68,70,71).

### *Les reins*

Le système rénal est également important pour le maintien de l'homéostasie ionique. Le rein est responsable du transport de divers ions ainsi que de la concentration finale des ions dans l'urine selon les besoins de l'organisme. En une journée, environ 8g de calcium est filtré par les glomérules avec une perte de 250-300mg dans les urines. Ceci implique qu'environ 98 à 99% du calcium qui est filtré par les glomérules en une journée doit être réabsorbé par les tubules rénaux (103). La majeure partie du calcium (70%) est réabsorbée dans le tubule contourné proximal par un processus paracellulaire. Ce processus est possible car l'absorption du calcium est parallèle à celle des autres ions, dont le sodium, ainsi qu'avec l'eau. De plus, un gradient électrochimique favorable existe, démontré par une plus haute concentration luminale de calcium que sanguine (104). Un processus actif pourrait aussi exister via la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de la membrane basolatérale mais son mécanisme d'action n'est pas encore élucidé (103,105).

Environ 20% du calcium est absorbé par le tubule ascendant de l'anse de Henle via un mécanisme encore controversé alors que le tubule distal absorbe environ 5-10% du calcium total. Ce segment du néphron est responsable du dosage subtil du calcium excrété dans les urines. Le transport actif est beaucoup plus important dans cette région. Le processus d'entrée du calcium n'est pas encore parfaitement élucidé, mais il s'agit probablement d'un processus actif indépendant de la concentration luminale de sodium contrairement au tubule proximal. La présence de la pompe  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPase dans les membranes périlitubulaires et de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  permettent probablement la sortie du calcium de la cellule vers la circulation sanguine. Le tubule collecteur, à son tour,

n'absorbe que très peu de calcium, de l'ordre de 5% ou moins. L'absorption se fait par un processus actif similaire à celui du tubule distal (103,105).

Tout ces mouvements ioniques dans les tubules rénaux sont sous le contrôle étroit de diverses hormones calciotropiques. Rappelons que lors d'hypocalcémie, les glandes parathyroïdes synthétisent la PTH. Le rôle de la PTH est de ramener la calcémie sanguine à ses valeurs normales. La première étape est de stimuler, via le cAMP, la production de la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  par les cellules des tubules proximaux. En fait, la PTH active l'enzyme rénale, la  $1\alpha$ -hydroxylase, qui ajoute un groupement hydroxyle en position 1 sur le métabolite inactif de la vitamine D, c.-à-d. le 25-hydroxycholecalciférol. Ce dernier est produit dans le foie par l'hydroxylation des vitamines  $\text{D}_2$  et  $\text{D}_3$  alimentaires (13,16,60,65,67,106).

Cependant, chez des rats parathyroïdectomisés, il a été démontré que la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  pouvait être stimulée directement par des niveaux de calcium extracellulaires faibles et inhibée par des niveaux de calcium extracellulaires élevés, indépendamment de la présence de la PTH (64). Le calcium pourrait donc agir directement sans l'intervention de la PTH. Plusieurs exemples supportent cette hypothèse ainsi, un effet inhibiteur direct sur la  $1\alpha$ -hydroxylase est noté par une augmentation de la concentration calcique (64,107). Par ailleurs, les niveaux élevés de calcium extracellulaire inhibent la production de cAMP induite par la PTH et la calcitonine dans le segment ascendant de l'anse large de Henle (108). De plus, une modulation des niveaux de mRNA de la CaBP28K dans le tubule distal du rat (109) a été observée par une augmentation du calcium extracellulaire.

La production de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  est sous l'influence d'un autocontrôle négatif. En effet, la présence soutenue de la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  dans la circulation sanguine favorise sa propre dégradation ainsi que l'inhibition de sa synthèse via l'inhibition de la  $1\alpha$ -hydroxylase (65,106). Également, elle inhibe la synthèse de la PTH ainsi que la prolifération des cellules de la parathyroïde (110,111). Un effet direct de la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  sur les tubules rénaux a été démontré. Effectivement, des protéines dépendantes de la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  liant le calcium sont présentes dans les tubules contournés distaux ainsi que

dans les tubules collecteurs, leur accordant possiblement un rôle dans ces segments du néphron (96,103). Également, des récepteur de la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ont été identifiés dans la région distale du néphron (67). La synthèse de la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  par le rein permet à ce dernier de participer activement à la régulation de l'absorption du calcium et du phosphate par les intestins ainsi qu'à la libération de ceux-ci par les os (13,67).

Une faible proportion de réabsorption du calcium se produit dans la région la plus distale du néphron. Cependant, cette région est sous le contrôle d'hormones calciotropiques ce qui assure une réabsorption fine selon les besoins de l'organisme. Chez le rat, la PTH augmente l'absorption du calcium par le segment ascendant de l'anse large de Henle, le tubule contourné distal et le tubule collecteur. Chez l'humain, les régions modulatrices de l'absorption du calcium sont encore imprécises (60,103). Néanmoins, la PTH paraît être la première à contrôler l'homéostasie calcique en régulant l'excrétion du calcium dans l'urine via la production de cAMP. La PTH a un effet direct sur le taux de filtration glomérulaire en la diminuant. Donc, elle abaisse la quantité de calcium qui sera filtrée et par le fait même, elle favorise la réabsorption rénale du calcium dans les régions distales du néphron (67,103). La raison pour laquelle la réabsorption calcique n'est sous régulation hormonale que dans la région distale du néphron et non dans le tubule proximal permet de limiter la réabsorption du sodium et de l'eau qui suit celle du calcium (52,103,112). Certes, dans la partie proximale du néphron, le calcium et le sodium sont absorbés dans les mêmes proportions alors que dans la région la plus distale, cette équivalence est perdue. Voilà pourquoi l'effet de la PTH entre en ligne de compte dans cette région distale seulement, pour permettre un ajustement final de l'excrétion du calcium (112). Des niveaux de calcium extracellulaires élevés, *in vitro* et *in vivo*, ont été démontrés inhibiteurs de la réabsorption de calcium par le tubule proximal du néphron stimulé par la PTH (113,114). La PTH joue un rôle prépondérant dans le rein en entamant une cascade d'événements tous orientés vers le maintien de l'homéostasie calcique.

### *La glande thyroïde*

La sécrétion de l'hormone calcitonine (CT) par les cellules parafolliculaires (cellules C) de la thyroïde est augmenté par l'hypercalcémie. La réponse est très rapide comme celle de la PTH sous l'effet de l'hypocalcémie. La CT est responsable, en association avec la PTH, du maintien de l'homéostasie calcique dans une fenêtre très étroite (59,76-78). L'effet principal de la CT est d'inhiber l'activité des ostéoclastes donc d'inhiber la résorption osseuse et de favoriser le dépôt calcique dans les os (67,76,77). Cet effet se produit dans un court laps de temps de l'ordre de quelques heures suivant la sécrétion de CT. Des études chez les rats thyroïdectomisés ont démontré que lors d'une hypercalcémie, il y avait rétablissement de la concentration calcique dans le sang mais sur une période de temps d'environ 24 heures (67). Néanmoins, l'élimination du calcium se faisait plutôt par excrétion urinaire que par dépôt dans les os. Donc, le rôle de la CT est non seulement de diminuer les concentrations calciques sanguines mais aussi de favoriser la minéralisation des os.

### *Au niveau cellulaire*

Dans les sections précédentes, j'ai discuté plutôt du contrôle de l'homéostasie calcique de l'organisme en entier alors que cette régulation existe aussi au niveau unicellulaire. En effet, la cellule subit de grandes fluctuations de sa concentration en calcium intracellulaire étant donné le rôle de ce dernier comme second messenger (3,5). Dans cette section j'aborderai préférentiellement les mécanismes qui modulent les niveaux intracellulaires de calcium dont je présenterai l'importance pour deux types cellulaires particuliers, soit les cellules endothéliales vasculaires (VEC) et les cellules du muscle lisse vasculaire (VSMC). Plusieurs anomalies du métabolisme ionique, notamment celui du calcium, ont été décrits dans ces deux types de cellules dans des cas d'hypertension artérielle et d'athérosclérose (21,41,115).

## LES CELLULES DU MUSCLE LISSE VASCULAIRE (VSMC)

Dans une cellule à son état basal, la concentration de calcium cytosolique est d'environ 100nM alors que la concentration extracellulaire est d'environ 10000 fois plus élevée, c.-à-d. 1mM. Nous pouvons imaginer que plusieurs mécanismes cellulaires doivent exister pour maintenir ce gradient de part et d'autre de la membrane plasmique. Les effecteurs, qui répondent aux stimuli calciques, cette fois sont les pompes membranaires, les échangeurs ioniques et les canaux ioniques. À l'état de repos, le calcium entre dans les VSMC par une voie passive facilitée par son gradient électrochimique. Ceci est contrebalancé par la sortie de calcium par différents transporteurs d'ions. En fait, le maintien à long terme du gradient de concentration de calcium est réalisé grâce à la  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase et à l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  localisés dans la membrane plasmique (4,41,54,116). Plus précisément, la  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase est responsable du maintien de la faible concentration intracellulaire de calcium alors que l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  est plutôt responsable de l'élimination de l'excès de calcium intracellulaire (4,54,117). En plus de ces deux régulateurs membranaires, il existe deux organelles intracellulaires qui aident au maintien de la concentration calcique dans le cytosol, ce sont le réticulum sarcoplasmique (RS) et la mitochondrie. Ces deux organelles possèdent un système de pompe-fuite dans leurs membranes qui assurent une capture du calcium cytosolique contrebalancée par une fuite passive vers le cytosol (4).

Dans le RS, les protéines tampon sont la calséquestrine et la calréticuline. Ce sont des protéines à faible affinité mais à haute capacité de liaison du calcium (4). Elles permettent d'augmenter la capacité de stockage du calcium à l'intérieur du RS (118,119). La calréticuline semble être exprimée dans toutes les cellules eucaryotes alors que la calséquestrine est principalement exprimée dans les cellules musculaires (118-120). La mitochondrie, quant à elle, est nécessaire seulement lors de cas pathologiques où il y a une accumulation exagérée de calcium dans le cytosol. À l'état basal, la mitochondrie ne contient qu'une faible quantité de calcium (121).

Le taux de calcium intracellulaire libre est connu comme étant l'initiateur de la contraction des VSMC (4,54,122,123). L'activation de ces cellules par divers stimuli externes (e.g. hormones vasoactives, hormones de croissance, neurotransmetteurs) engendre un déséquilibre entre la mobilisation du calcium et l'homéostasie calcique causant une augmentation du calcium intracellulaire libre (4). Cette augmentation provient de la libération de calcium du RS et de l'entrée du calcium extracellulaire par une entrée passive ou par dépolarisation membranaire. La dépolarisation active des canaux calciques. Le calcium ainsi libéré, peut se fixer sur la calmoduline (CaM, protéine à haute affinité pour le calcium). Le complexe Ca-CaM active la kinase de la chaîne légère de la myosine en induisant un changement de sa conformation. Cette dernière phosphoryle le résidu sérine 19 sur les chaînes légères de la myosine ce qui facilite les interactions actine-myosine et finalement la contraction des VSMC (28,124-126). Moins de 1% du calcium intracellulaire est sous forme ionisée libre, dite forme active, alors que le reste est sous forme liée à des protéines intracellulaires ou séquestrée dans les organelles spécialisés (4,16,103). L'importance de maintenir une concentration de calcium libre stable est due au fait qu'une augmentation de cet ion peut engendrer diverses pathologies notamment l'hypertension artérielle. Cette pathologie est caractérisée en partie par une réactivité vasculaire altérée donc il est logique de proposer qu'une altération des mécanismes qui modulent la concentration de calcium cytosolique pourrait être la cause d'une réponse cellulaire exagérée (10,15,17).

#### LES CELLULES ENDOTHÉLIALES VASCULAIRES (VEC)

Comme pour les VSMC, l'homéostasie calcique est critique pour les fonctions des cellules endothéliales. Le rôle principal des VEC est la régulation du tonus vasculaire (127). On peut imaginer quelles pathologies peuvent être engendrés par des dérèglements des mécanismes de l'homéostasie calcique des VEC. En effet, une augmentation du tonus vasculaire est un phénomène caractéristique de l'hypertension artérielle et de l'athérosclérose (127). Plusieurs transporteurs d'ions impliqués dans l'homéostasie

calcique et d'autres ions ont été identifiés dans la membrane plasmique des VEC. Ce sont la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase, le cotransporteur  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$  et l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . Les deux premiers, tout comme dans les VSMC, sont responsables d'assurer un gradient électrochimique ionique à travers la membrane. À l'état basal, le niveau de calcium intracellulaire n'est pas sous le contrôle de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  mais plutôt des modifications du gradient électrochimique du  $\text{Na}^+$  et du  $\text{K}^+$  assurés par la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase et le cotransporteur  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ . Un réticulum endoplasmique (RE) existe dans le cytoplasme des VEC. Il joue le même rôle que le RS des VSMC soit de stocker le calcium (127-129).

Plusieurs études ont démontré que l'augmentation rapide de la concentration de calcium cytosolique après l'activation des VEC par divers agonistes provient de la libération du calcium du RE suivie d'une phase plateau associée à l'entrée de calcium extracellulaire (128,130). L'activation des VEC par un agoniste est médiée par des récepteurs couplés aux protéines G (127). Rappelons que cette cascade implique la participation de la PLC qui est responsable d'induire la production d' $\text{IP}_3$ . Ce dernier active des récepteurs couplés à des canaux calciques situés à la surface cytoplasmique du RE et stimule la mobilisation du calcium emmagasiné (127). Ceci correspond à l'augmentation rapide de calcium cytosolique observée dans les premières 20 à 30 secondes suivant la stimulation (127). Une phase plateau qui s'ensuit est assurée par l'entrée de calcium extracellulaire par des canaux cationiques non sélectifs perméables au calcium (127,130). Le DAG, produit parallèlement à l' $\text{IP}_3$ , serait responsable de l'activation de la protéine kinase C et du maintien de la réponse cellulaire (20,21).

De plus, l'homéostasie calcique pourrait aussi être sous l'influence de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  car plusieurs processus tels la libération du calcium intracellulaire et l'activité de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase sont dépendants du pH intracellulaire (131). L'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (131) ainsi que la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (132) ont été localisés dans la membrane plasmique des VEC.

### 1.3 La glande parathyroïde, rôle central dans l'homéostasie du calcium

Pour la majorité des glandes sécrétrices, la stimulation de leurs récepteurs menant à la sécrétion hormonale implique une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire (7,31). La voie de signalisation impliquée est celle de la PLC qui mène ultimement à l'augmentation de calcium cytosolique. Ce mécanisme de transduction se termine, dans la plupart des cas, par la sécrétion hormonale. Cependant, la glande parathyroïde est particulière en ce sens qu'une augmentation du calcium intracellulaire inhibe la sécrétion de la PTH (58).

#### A) Facteurs qui influencent la sécrétion de l'hormone PTH

##### *Le calcium*

Le stimulus essentiel pour la sécrétion de la PTH par la parathyroïde est la concentration de calcium extracellulaire. En effet, la parathyroïde est très sensible à ces variations de calcium. Paradoxalement, une relation inverse existe entre la sécrétion de la PTH et la concentration de calcium extracellulaire. Une baisse subtile de cette concentration stimule immédiatement la sécrétion de la PTH et à l'inverse, une augmentation de calcium inhibe la sécrétion de la PTH (58,67).

La synthèse de PTH par la parathyroïde est maximale à une concentration extracellulaire de calcium normale. Par ailleurs, aucune modification de la concentration de calcium extracellulaire n'affecte rapidement ce niveau de synthèse (133-136). Donc il a été suggéré que le calcium affecterait plutôt la sécrétion et la dégradation de la PTH que sa biodisponibilité. Habener *et al.* (137), avec des études de marquage par *pulse-chase*, ont observé que la parathyroïde, en présence d'une concentration de calcium élevée, augmentait la dégradation intracellulaire de la PTH. Par ailleurs, des études *in vivo* (138) et *in vitro* (139,140) démontrent une augmentation de la dégradation de la PTH en présence d'une concentration élevée de calcium extracellulaire comparativement à une concentration de calcium extracellulaire faible. Ceci permettrait à la parathyroïde de répondre rapidement à



une baisse de la concentration de calcium extracellulaire sans avoir à augmenter le niveau d'expression ou de synthèse de l'hormone qui sont déjà à des taux quasi maximaux (137).

#### *La vitamine D (1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>)*

Rappelons que la synthèse de la 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> est sous l'influence de la PTH dans les tubules rénaux via l'activation de la 1 $\alpha$ -hydroxylase (13,16,60,65,67,106). Il est connu que la 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> module sa propre synthèse par un mécanisme de rétrocontrôle négatif pour limiter les actions de la PTH mais il n'est pas sûr que la 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> agisse sur la sécrétion de la PTH (58). La présence de récepteurs à la 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> dans les noyaux des cellules de parathyroïde de poussins, de porc et d'humain a été démontré il y a longtemps (58). Plusieurs groupes ont démontré que des métabolites de la vitamine D inhibaient la sécrétion de la PTH par des cellules de parathyroïde de rat et de boeuf en culture (141,142). D'après les études parallèles de deux groupes, il a été proposé que la 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> agirait préférentiellement sur l'expression du gène de la PTH car une courte incubation en présence de la 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> n'affecte pas la libération de la PTH par la parathyroïde (141,143).

#### *Les hormones stéroïdiennes*

Il est bien connu que les oestrogènes ainsi que la progestérone ont un effet de retenu du calcium. En effet, les femmes dont le taux de ces hormones est faible sont plus susceptibles à souffrir d'ostéoporose (70,81,82). Greenberg *et al.* (144) ont démontré que le traitement de cellules bovines ou humaines avec la progestérone et l'estradiol augmente la sécrétion de la PTH par ces cellules. D'autre part, les glucocorticoïdes sont capable de stimuler la sécrétion de la PTH de cellules de parathyroïde bovines en culture et en plus vont à l'encontre de l'effet de la 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> sur ces mêmes cellules (142).

### *Le magnésium*

Il a été démontré que l'augmentation de la concentration de magnésium extracellulaire mime les effets de l'augmentation de calcium extracellulaire sur la glande parathyroïde, c.-à-d. inhibe la sécrétion de la PTH (13). D'autre part, une concentration élevée de magnésium stimule la sécrétion de la calcitonine et inhibe la production de cAMP par la PTH dans le tubule proximal de rat *in vivo* (145) et *in vitro* (114) ayant pour effet d'inhiber la réabsorption de calcium par le rein (13,64). Le même groupe a également montré que le magnésium pouvait augmenter les niveaux d'IP<sub>3</sub> dans des cellules de parathyroïde bovines en culture. Ceci suggère qu'il peut inhiber la sécrétion de la PTH tout comme le calcium (13, 114). Cependant, le magnésium est 2,5 fois moins puissant que le calcium à moduler la sécrétion de la PTH. De façon paradoxale, les patients souffrant d'hypomagnésémie sévère sont hypocalcémiques et démontrent une hypoparathyroïdie temporaire due à une baisse de la sécrétion de la PTH ainsi qu'à une résistance périphérique à l'action de la PTH. Il est proposé que les niveaux de magnésium extracellulaires faibles contribuent à favoriser l'action inhibitrice du calcium sur l'activité de l'adénylate cyclase de la parathyroïde (114, 145b). Ce processus serait responsable de l'inhibition de la libération de la PTH. Le concept de résistance périphérique à l'action de la PTH est expliqué par des études *in vitro* démontrant que la PTH induit une libération submaximale de calcium des os chez des rats déficients en magnésium. Une autre conséquence de l'hypomagnésémie est une diminution de la production de la 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> rénale due à l'absence de la PTH. Ceci accentue, d'autant plus, l'hypocalcémie chez ces patients (145b).

### *Les neurotransmetteurs*

Il a été documenté que plusieurs neurotransmetteurs tels les antagonistes  $\beta$ -adrénergiques, les agonistes  $\alpha$ -adrénergiques et la prostaglandine F<sub>2</sub> $\alpha$ , diminuent les niveaux de cAMP dans la parathyroïde ayant pour effet d'inhiber la sécrétion de la PTH (58). Cependant, le rôle physiologique de ce processus n'est pas tout à fait compris. De plus, la présence de CGRP et de substance P a été observée dans les terminaisons nerveuses

situées autour des parathyroïdes bovines pouvant suggérer un rôle pour ces substances dans les fonctions parathyroïdiennes (58).

### *La PTH*

Le groupe de Fujimi (146) a démontré dans une culture primaire de cellules de parathyroïdes bovines que la présence de fragments amino-terminaux 1-34 inactifs de la PTH pouvaient inhiber la sécrétion de la PTH par ces mêmes cellules. Ce groupe suggère que les fragments N-terminaux de la PTH dans la circulation *in vivo* serviraient de rétrocontrôle négatif sur la synthèse de la PTH par la glande parathyroïde. La présence de ces fragments N-terminaux dans la circulation est due à la dégradation de la PTH active par le rein. C'est donc un mécanisme par lequel l'activité de la PTH peut être modulée (147,148)

## **B) Facteurs qui influencent l'expression du gène de la PTH**

### *Le calcium*

Rappelons qu'à concentration physiologique de calcium extracellulaire, la parathyroïde synthétise la PTH à des niveaux quasi maximaux. En outre, des variations du calcium extracellulaire ne semble avoir aucun effet rapide sur le niveau de synthèse (133-136). Il a été longtemps accepté que le calcium n'agit que sur la sécrétion et sur la dégradation intracellulaire de la PTH (137). Cependant, des études menés par Russel *et al.* (133) ont montré qu'une exposition chronique de cellules de parathyroïde bovines en culture à un milieu contenant une concentration calcique élevée diminuait les niveaux de mRNA du prepro-PTH et subséquemment de la sécrétion de la PTH. Un autre groupe a démontré que les niveaux de mRNA cytoplasmiques de la prepro-PTH sont élevés dans la parathyroïde de rat *in-vivo* en présence d'un milieu de faible concentration en calcium (135). Encore chez le rat, il a été démontré qu'une diminution de la concentration de calcium de 10,4mg/dL (calcium normal) à 8,8mg/dL (calcium faible) triplait le niveau de

mRNA de la PTH (149). Ces études suggèrent donc que le calcium affecte soit la stabilité des mRNA soit agit directement sur la transcription du gène (150).

#### *La vitamine D (1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>)*

Le groupe de Okazaki (151) a démontré que la 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> agit directement sur la région promotrice du gène de la PTH pour inhiber la transcription de ce dernier. Par ailleurs, il a été démontré que des récepteurs à la 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (VDR) sont présents dans les cellules parathyroïdiennes bovines (152). Le complexe 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-VDR est capable de se fixer sur des séquences de DNA spécifiques dans la région 5' non traduite (5'UTR) de gènes habituellement régulées par la 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Récemment, un motif dans la région 5'UTR du gène de la PTH humaine capable de fixer le VDR a été identifié. Celui-ci pourrait médier l'inhibition de la transcription de la PTH par la 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (111,151).

### **C) Organes principaux impliqués dans l'élimination de la PTH**

#### *Les reins*

Le rein est un site important du métabolisme de la PTH. Celui-ci transforme la PTH active en fragments, majoritairement carboxyterminaux (C-terminaux) inactifs. De plus, le rein est important dans l'élimination de la PTH. Effectivement, il est primordial que la PTH ait une demi-vie courte afin de limiter ses actions (148). Chez l'humain, la plupart des fragments C-terminaux circulants sont éliminés par la filtration glomérulaire. Une partie de ces fragments sont excrétés et les autres sont dégradés par les cellules rénales lors de leur passage le long du néphron. Contrairement aux fragments C-terminaux, les fragments N-terminaux tout comme la PTH intacte sont éliminés par la circulation sanguine, via des récepteurs membranaires pour la PTH sur ses organes effecteurs et par la filtration glomérulaire (147,148).

### *La parathyroïde*

La parathyroïde stimule la dégradation de la PTH en présence d'une concentration élevée en calcium (137). Plusieurs études ont montré qu'en présence d'une concentration élevée de calcium, les glandes parathyroïdes humaines entre autres, sécrètent de grande quantités de fragments C-terminaux inactifs de la PTH (139,153-155). Le procédé menant à la dégradation de la PTH n'est pas tout à fait clair. Il a été proposé que des enzymes protéolytiques pouvaient être impliquées. En effet, la mise en évidence de protéases activées par le calcium, *calpains* dans la glande parathyroïde bovine appuie cette hypothèse (58). Ces enzymes ont la caractéristique d'être dépendantes du calcium et d'avoir une activité protéolytique limitée (pas de protéolyse complète)(137).

#### **1.4 Les gènes régulés négativement par le calcium extracellulaire**

La régulation négative de gènes par le calcium extracellulaire, c.-à-d. une expression accrue en présence d'hypocalcémie, est un phénomène particulier qui a été démontré initialement pour le gène de la PTH (156). C'est le groupe d'Okazaki qui a mis en évidence, dans la région 5' UTR du gène humain de la PTH une séquence palindromique de 12pb entrecoupée de trois bases qui lui confère la régulation négative par le calcium (156). Ils ont nommé cette séquence nCARE qui signifie *negative Calcium Response Element*. Cette séquence est située plus précisément à la position -3,5kb dans la séquence de la PTH humaine (156). En plus de cette séquence palindromique, une séquence riche en thymidines située en amont du nCARE semble importante pour la fonction de ce dernier. Le nCARE reconnaît un complexe protéique nucléaire qui n'est pas encore parfaitement caractérisé (157). Des études de *DNA footprinting* ont montré que la région protégée, donc liée à des protéines, est constituée des 12 bases palindromiques et des thymidines. Ce complexe protéique a été aussi identifié dans plusieurs types cellulaires donc il est possible que des nCARE soient aussi présents et fonctionnels dans d'autres gènes (156,158).

En effet, le groupe d'Okazaki (158) a trouvé cinq autres gènes qui possèdent un nCARE dans leurs région 5'UTR partageant une grande homologie avec le nCARE de la

PTH. Les séquences sont très similaires entre elles. La localisation dans la région 5'UTR est néanmoins différente pour tous. Les rôles de la séquence riche en thymidines en amont du nCARE ainsi que des trois bases AGG situées au centre de la séquence palindromique ne sont pas parfaitement élucidés. Il a été proposé que la séquence riche en thymidines serait importante soit pour éliminer les séquences de DNA causant une interférence entre la machinerie de transcription et la séquence du nCARE, soit pour faciliter l'accès du complexe protéique qui fixe le nCARE aux sites de liaison des facteurs de transcriptions tels les facteurs liant le TATA box (158). Par ailleurs, le fait que les trois bases qui séparent les séquences palindromiques sont conservés dans tous les gènes possédant un nCARE suppose qu'elles jouent un rôle important pour sa fonction (158).

Bien que la fonction du nCARE dans le gène de la PTH soit élucidée, le fait qu'il soit présent dans d'autres gènes n'est pas encore compris. Le groupe d'Okazaki (158) a étudié le rôle du nCARE dans le gène du peptide natriurétique de l'oreillette de rat (rANP). Ils ont montré *in vivo*, dans le coeur de rats infusés avec des solutions soit sans calcium soit avec une concentration élevée (40mM) de calcium, que le mRNA du rANP est plus élevé et plus faible respectivement. Ceci, sans changement du volume plasmatique, de la pression artérielle ni de la fréquence cardiaque de ces rats. De plus, la transfection de cellules en culture d'un vecteur rapporteur contenant la séquence du nCARE-rANP a permis d'observer une inhibition de la transcription du mRNA du rANP en présence de 2mM de calcium alors que l'inverse se produit en présence de 1mM de calcium (158).

Plus récemment, le groupe de McHaffie (157) a étudié la région entourant la séquence du nCARE et a découvert que ce dernier se situe dans un élément apparenté aux séquences Alu. Les éléments Alu sont des séquences répétitives de DNA qui sont distribuées dans tout le génome humain. Une recherche subséquente dans des bases de données (GenBank/EMBL) leur a permis de voir que 111 copies du nCARE existent dans le génome humain. Des gènes ayant une rôle dans le métabolisme du calcium et qui possèdent un nCARE ont été identifiés comme la calmoduline, la  $\beta$ -myosine, l'érythropoïétine, la gastrine et le récepteur aux oestrogènes (157). Donc il existe

possiblement plusieurs gènes qui n'ont pas encore été découverts et qui font partie de la famille des gènes régulés négativement par le calcium. Il restera à démontrer si ces nCARE sont fonctionnels.

## **2. Les récepteurs du calcium**

Rappelons que le stimulus principal de la glande parathyroïde est la variation de la concentration de calcium extracellulaire. Les cellules doivent être très sensibles car ces variations sont très subtiles (58,159-161). Le mécanisme par lequel la parathyroïde perçoit ces variations a longtemps été sans explication. L'idée de l'existence d'un récepteur sensible au calcium a été conçue suite aux observations suivantes: l'activation des systèmes de second messagers intracellulaires rappelant la voie de signalisation par des récepteurs couplés aux protéines G est observé dans des cellules de parathyroïdes bovines en culture exposées à des concentrations élevées de calcium extracellulaire (159,161). En effet, il y a stimulation de la PLC qui induit la production d'IP<sub>3</sub>. Ce dernier stimule la libération de calcium des stocks intracellulaires. Ces résultats indiquent indirectement que le calcium module l'activité de la parathyroïde, au moins en partie, par un récepteur sensible au calcium sur la membrane plasmique. C'est la stimulation de ce récepteur qui engendre la réponse cellulaire, c.-à-d. une augmentation des niveaux de calcium intracellulaire (159,161).

### **2.1 Clonage des récepteurs pouvant détecter les variations de calcium**

C'est le groupe de Brown (162) qui a cloné le premier récepteur sensible au calcium par une technique de clonage par expression dans des ovocytes de grenouille, *Xenopus laevis*. Ces ovocytes n'expriment aucun récepteur sensible au calcium endogène mais ils sont capables d'exprimer des récepteurs exogènes lorsqu'ils sont injectés avec le mRNA du récepteur. Lorsque les ovocytes injectés sont mis en présence de calcium, les récepteurs exogènes interagissent avec des protéines G endogènes qui à leur tour stimulent la PLC. Cette dernière induit la production d'IP<sub>3</sub> et ainsi l'augmentation de calcium intracellulaire.

Cette augmentation active des canaux de chlore ( $\text{Cl}^-$ ). La fonction du récepteur est donc évaluée par la mesure du courant de  $\text{Cl}^-$  qui sort de la cellule (159,162).

Plusieurs études récentes ont permis d'identifier des récepteurs sensibles au calcium qui partagent tous une grande homologie de séquence en acides aminés. Par ailleurs, la présence du mRNA de ces récepteurs dans une variété de tissus indique que le calcium joue probablement un rôle majeur dans le métabolisme de ces tissus.



### Liste des récepteurs sensibles au calcium récemment clonés

Nom du récepteur auteur	Source	Tissus positifs pour l'expression	Tissus négatifs pour l'expression	Études fonctionnelles	% homologie p/r BoPCaR1
<b>BoPCaR1</b> Brown <i>et al.</i> (162)	Parathyroïde bovine	parathyroïde bovine, cortex cérébral, cervelet, thyroïde (cellules C), cortex rénal, région externe de la médulla rénale	p.e.	p.e.	100%
<b>RaKCaR</b> Riccardi <i>et al.</i> (163)	Rein de rat	cortex et medulla externe du rein, medulla interne rénale, gros intestin	cortex cérébral, cervelet, muscle squelettique, surrénale, veine cave inférieure, aorte, traché, rate, foie, poumon	tubules contournés proximaux, cortex et médulla du segment ascendant de l'anse large de Henle, tubule collecteur distal, appareil juxtaglomérulaire	>90% en acides aminés
<b>RaKCaR</b> Ruat <i>et al.</i> (164)	librairie de cDNA de cerveau de rat	thyroïde, parathyroïde, poumon, iléon, gros intestin, cerveau, vaisseaux sanguins cérébraux	cellules gliales	p.e.	>90% en acides aminés
<b>HuKCaR</b> Aida <i>et al.</i> (165)	Rein humain	rein	cerveau, poumon, foie, muscle squelettique, coeur, placenta	p.e.	93% en acides aminés
<b>CaR</b> Garrett <i>et al.</i> (166)	anticorps anti BoPCaR1	parathyroïde humaine, thyroïde humaine et de rat (cellules C)	p.e.	p.e.	92% en acides aminés
<b>HumCaR</b> Garrett <i>et al.</i> (167)	librairie de cDNA d'un adénome de parathyroïde humaine	Adénome de parathyroïde humaine	p.e.	p.e.	93% en acides aminés

p.e. pas effectué

Tableau I

## 2.2 Structure et fonction des récepteurs du calcium

### A) Structure

La structure de ces récepteurs a été établie d'après la séquence de leur cDNA. Leur séquence en acides aminés prédit trois domaines structuraux principaux. Un domaine N-terminal extracellulaire de 613 acides aminés, un domaine central de 250 acides aminés, contenant sept domaines transmembranaires caractéristiques de la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G et finalement un domaine C-terminal de 222 acides aminés possiblement cytoplasmique. Le domaine N-terminal contient des régions riches en résidus acides ce qui suggère une activité à faible affinité de liaison du calcium due à la haute densité de charges négatives (162,163,165,168). De plus, il contient neuf sites potentiels de glycosylation. Plusieurs sites possibles pour la phosphorylation par la PKC sont situés dans les première et troisième boucles cytoplasmiques ainsi que dans le domaine C-terminal. La PKC sert à limiter l'augmentation de la concentration de calcium intracellulaire et des inositol trisphosphates dans les cellules de parathyroïdes stimulées par le calcium (162). Donc, les sites de phosphorylation pour la PKC dans les CaR pourraient servir à la régulation de ces récepteurs. Dans le RaKCaR seulement, deux sites consensus pour la PKA ont été identifiés. Ces sites pourraient être importants pour la régulation dans le rein de rat seulement (163).

Alors qu'on a pensé au départ que ces récepteurs faisaient partie de la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G, une analyse de séquence indique tout autrement. En effet, il n'y a pas d'homologie de séquence importante entre ces récepteurs et la superfamille. Les seuls qui démontrent une certaine homologie sont les récepteurs au glutamate métabotropique (mGluR). Ce sont des récepteurs du système nerveux central dont le ligand est le neuroexcitateur important, la glutamate (162,169).

### B) Fonction

Les récepteurs BoPCaR1 et RaKCaR sont les premiers exemples de récepteurs membranaires de mammifères qui détectent et répondent à des ions inorganiques et non à

des molécules comme ligand (169). En plus des cations divalents ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ), ces récepteurs reconnaissent des cations trivalents comme le gadolinium ( $\text{Gd}^{3+}$ ), le terbium ( $\text{Tb}^{3+}$ ) et l'euporium ( $\text{Eu}^{3+}$ ) (162,163,170) ainsi que des polycations tels la néomycine, la protamine et la polyarginine (169,171-173).

### *La parathyroïde*

Son rôle dans la parathyroïde est convaincant. Cependant ses voies de signalisation intracellulaires ainsi que l'entrée de calcium du milieu extérieur demeurent imprécis (174). Il a été documenté que les CaR sont couplés à la voie de signalisation impliquant la PLC et le calcium intracellulaire menant à l'inhibition de la sécrétion de la PTH. L'augmentation de la concentration de calcium extracellulaire stimule le CaR. Ceci résulte en l'activation de la PLC et ainsi qu'en la formation de l' $\text{IP}_3$  et du DAG. L' $\text{IP}_3$  stimule la mobilisation de calcium du ER suivi d'un influx soutenu de calcium extracellulaire par des canaux insensibles au voltage (161). L'activation des CaR mène aussi à l'inhibition de l'adénylyl cyclase par une protéine  $G_i$  sensible à la toxine de pertussis (160,161,174) donc à une baisse de cAMP. Ces seconds messagers vont moduler l'activité de diverses protéines kinases (PKC et PKA) qui à leur tour vont moduler l'activité biologique de la cellule. L'effet final de ceci est l'inhibition de la sécrétion de la PTH (160,161). Dans le cas d'hypocalcémie, les niveaux de cAMP cellulaires augmentent. La PKA, qui est une enzyme activée par le cAMP, pourrait donc être impliquée dans la sécrétion de la PTH et même dans la régulation des niveaux de son mRNA induits par une faible concentration de calcium (175).

### *Les reins*

Les reins sont impliqués dans l'homéostasie du calcium et du magnésium chez les mammifères (67,103). Rappelons que les ions calcium et magnésium sont capable de moduler l'activité des cellules rénales. Par exemple, une augmentation de la concentration de magnésium périrénaire inhibe sa propre réabsorption ainsi que celle du calcium dans l'anse de Henle (57). Brown *et al.* (163), lors du clonage de RaKCaR des reins de rats, ont

entrepris des études fonctionnelles du récepteur (tableau I). Ceci a permis de déterminer la localisation possibles du récepteur dans les différents segments du rein. Comme le tableau I l'indique, il couvre presque l'ensemble des tubules rénaux. Les résultats préliminaires proposent que le RaKCaR peut médier la détection du calcium ou de d'autres cations divalents dans ces segments du néphron (163).

### *La thyroïde*

La sécrétion de la calcitonine (CT) par les cellules C de la glande thyroïde est stimulée par l'augmentation de la concentration de calcium extracellulaire (59,76,77,166). Comme pour la parathyroïde, cette augmentation induit une hausse rapide de la concentration de calcium intracellulaire via le calcium emmagasiné dans le RE (59,166). Contrairement à la parathyroïde, l'influx de calcium de l'extérieur est assuré par des canaux calciques sensibles au voltage. Il a été démontré que le CaR est exprimé sur les cellules C de la thyroïde mais son rôle dans la sécrétion de la CT n'est pas élucidé (166). Si l'on suppose que les CaR de la thyroïde et de la parathyroïde ont la même fonction soit celle de reconnaître les variations de calcium, il se doit que les récepteurs stimulent des messagers intracellulaires différents dans les deux cas. En effet, chez l'un il y a l'inhibition de la sécrétion (PTH) et chez l'autre il y aurait stimulation de la sécrétion (CT) (166).

### *Autres*

Des CaR ont été identifiés sur plusieurs cellules mais leurs rôles ne sont pas encore connus. Ce sont par exemple, les ostéoclastes, les cellules du tractus gastro-intestinal, les kératinocytes, les cellules mammaires, les neurones et les cellules du placenta pour n'en nommer que quelques uns (174,176).

## **C) Régulation de leur expression**

La régulation de l'expression de ces récepteurs n'a pas encore été très étudiée. Le groupe de Rogers (177) a regardé l'effet d'une modification chronique des niveaux

plasmatiques de PTH et de la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  sur l'expression du mRNA du CaR du rat. Cette étude n'a révélé aucun effet de ces deux variables, ni des concentrations extracellulaires de phosphate sur le niveau de mRNA du récepteur (177). Il est connu que pour plusieurs récepteurs de la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G, notamment les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques, il y a une rétroinhibition de ceux-ci lors de l'exposition prolongée à leur agoniste (178,179). Cette rétroinhibition du récepteur implique sa phosphorylation, son internalisation, l'augmentation de sa dégradation, une diminution de la stabilité de son mRNA et une diminution de son taux de transcription. Cependant, l'étude qu'ils ont menée n'a pu révéler aucune régulation de ce genre pour le CaR.

Alternativement, le contrôle pourrait se localiser au niveau de la sensibilité du CaR. Une phosphorylation du CaR par la PKC sur ses sites consensus pourrait diminuer la sensibilité du CaR au calcium extracellulaire (180,181). Rappelons que la PKC a été démontrée comme limitant l'augmentation de la concentration de calcium intracellulaire et des inositol trisphosphates dans les cellules de parathyroïdes stimulées par le calcium (162). Donc, les sites de phosphorylation pour la PKC des CaR pourraient servir à la régulation de la sensibilité des CaR.

#### **D) Rôle dans la maladie**

Des études de mutagenèse dirigée sur les CaR ont permis d'associer certaines mutations à des maladies humaines où des troubles calciques sont évidents (161,182-184). Deux des maladies sont héréditaires, soit l'*hypercalcémie hypocalciurique familiale* (HHF) et l'*hypercalcémie néonatale sévère* (HNS). La HHF est caractérisée par une hypercalcémie de faible à modérée et ces patients ont une sensibilité diminuée de leur CaR parathyroïdien et rénal (169). La HNS est une hyperparathyroïdie primaire sévère qui se présente chez le nouveau-né. Cette maladie est souvent fatale s'il n'y a pas de parathyroïdectomie complète tôt après la naissance (169). Des évidences génétiques soutiennent que la HHF et la HNS sont les formes hétérozygote et homozygote de la même anomalie puisque les deux

syndromes sont souvent présents dans la même famille. Trois mutations ont été identifiées à ce jour. Deux dans le domaine extracellulaire et une dans la troisième boucle cytoplasmique du CaR. Une modification de la structure, de la stabilité et /ou des propriétés de fixation des cations ainsi qu'un couplage défectueux avec les protéines G peuvent être les conséquences des deux mutations extracellulaires et de la mutation intracellulaire respectivement (161,169,183). Brown *et al.* (162) ont démontré *in vitro* que la mutation dans la troisième boucle à elle seule pouvait réduire presque complètement l'activité du CaR. Récemment, le groupe de Bai (184) a démontré qu'une nouvelle mutation de l'acide aminé à la position 185 avait une activité négative dominante sur le CaR normal. En effet, une augmentation de 37% de la quantité de calcium extracellulaire est nécessaire pour une production équivalente d'IP<sub>3</sub> lorsque les deux types de CaR (muté et normal) sont cotransfectés dans des cellules de rein humaines comparativement aux mêmes cellules transfectées avec le CaR normal seulement. Ces patients naissent avec des symptômes similaires à la HNS mais contrairement à ces derniers, ils sont hétérozygotes pour la mutation.

Inversement, l'hypocalcémie autosomale dominante est une maladie héréditaire qui se caractérise par une faible calcémie. Une mutation non-sens a été observée dans le domaine extracellulaire du CaR chez ces patients (169,182). *In vitro*, cependant cette mutation est activatrice. Ainsi, contrairement à l'HHF et à l'HNS où leurs mutations diminuent l'activité du récepteur, dans la maladie hypocalcémique, la mutation active le récepteur.

Le groupe de Kifor (185) a regardé par immunohistochimie dans des glandes parathyroïdes de patients atteints d'hyperparathyroïdie primaire et secondaire, si une diminution de la quantité du CaR pouvait expliquer la régulation anormale de la sécrétion de la PTH par le calcium extracellulaire. Avec des anticorps polyclonaux spécifiques reconnaissant des épitopes du domaine extracellulaires du CaR, ils ont pu montrer une diminution de 60% de l'intensité de coloration pour les hyperparathyroïdies primaires et les hyperparathyroïdies secondaires comparativement à leurs témoins normaux (185).

La mise en évidence de mutations et/ou de diminution de la quantité des CaR fonctionnels dans les maladies du métabolisme du calcium vont pouvoir aider à approfondir les connaissances sur les mécanismes de signalisation par le calcium.

### **3. Les protéines intracellulaires liant le calcium**

Tous les mécanismes mentionnés jusqu'ici servent à maintenir l'homéostasie calcique autant à l'intérieur qu'à l'extérieur de la cellule. Les derniers, présentés dans cette section, sont les protéines liant le calcium à l'intérieur de la cellule. Elles sont localisées majoritairement dans le cytosol et dans les organelles spécialisés dans le stockage du calcium intracellulaire, le réticulum endoplasmique (RE). Le rôle principal de ces protéines est de contrôler diverses activités de la cellule en réponse à un signal transmis par le calcium lui-même (186).

#### **3.1 Familles de protéines**

Trois familles de protéines liant le calcium ont été identifiées. Ces protéines sont classés selon leurs structures tridimensionnelles soient, la famille des protéines *EF-hand*, la famille des protéines dépendantes du calcium liant les phospholipides (annexines et protéines possédant une région C2) et la famille des protéines responsables du stockage du calcium.

##### **A) La famille des protéines *EF-hand***

Ce sont des protéines ayant une forte affinité pour le calcium. Leurs sites de liaison avec le calcium sont situés dans leur motif *EF-hand*. Elles sont impliquées dans les mécanismes de transduction du signal via des interactions spécifiques avec leurs protéines cibles (3,31,41,42,125,187). Cette famille comprend entre autres la calmoduline (CaM) et la troponine C. Ces protéines, particulièrement la CaM, ont été largement étudiés. La CaM est ubiquitairement exprimée dans les cellules eucaryotes ce qui suggère qu'elle est impliquée dans une grande variété de fonctions intracellulaires (3,22,30,42,43,125,188). La

troponine C est localisée dans les cellules musculaires et est impliquée dans la contraction musculaire. Les protéines de la famille des protéines *EF-hand* sont majoritairement localisées dans le cytoplasme et le noyau cellulaire (3,22,30). Cette famille comprend aussi des membres ayant des activités plus spécialisées comme des activités enzymatiques. Ce sont les calpaines (protéases calcium-dépendantes) et les calcineurines (phosphatases  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-dépendantes). La famille des protéines S-100 possèdent deux motifs *EF-hand* dans leur structure. Elles ont été impliquées dans la croissance cellulaire ainsi que dans des processus de stimulus-sécrétion (3,32,189,190).

Un autre membre de cette famille est la parvalbumine. C'est une protéine cytoplasmique à deux motifs *EF-hand*. Ses sites de liaison sont de haute affinité pour le calcium mais sont également pour le magnésium (22). Elle est principalement exprimée dans les cellules musculaires squelettiques, le système nerveux central et dans les cellules de Leydig (22,191).

## **B) La famille des protéines dépendantes du calcium liant les phospholipides (annexines et protéines possédant une région C2)**

Cette famille est particulière en ce sens que ses membres lient les phospholipides membranaires dans un contexte dépendant du calcium (3,32,186,192-194). Ces protéines sont exprimées dans plusieurs tissus et sont localisées principalement dans le cytoplasme près de la membrane plasmique. Elles sont transloquées à la membrane plasmique lors d'une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium (3).

Les annexines possèdent généralement quatre répétitions du domaine *endonexin fold* qui sont des sites de liaison du calcium. Cette famille comprend 13 membres (annexines I-XIII). Quelques unes ont été identifiées dans le noyau de la cellule. Leur rôle cellulaire n'est pas complètement élucidé, mais il semble qu'elles soient impliquées dans une variété d'activités biologiques dont la coagulation sanguine, la prolifération et la différenciation cellulaire, l'organisation du cytosquelette et la réponse anti-inflammatoire (3,194).



La région C2 a été à l'origine désignée comme la région conservée des isoformes de la PKC. Cette région est responsable de l'activation de la PKC en permettant sa liaison aux phospholipides membranaires dans un contexte dépendant du calcium. La région C2 est un domaine de liaison pour les phospholipides et le calcium. Il est aussi conservé dans d'autres protéines connues pour être dépendantes du calcium telles la PLC (195,196), la PLA<sub>2</sub> (197) et la synaptotagmine (196,198). À l'état basal, la PKC est majoritairement localisée dans le cytoplasme. L'augmentation de la concentration de calcium intracellulaire suite à l'activation de la cellule active la PKC et favorise sa translocation à la membrane. La région C2 est considérée responsable de cette translocation (199,200).

### **C) La famille des protéines responsables du stockage du calcium**

Ces protéines sont responsables de la captation du calcium intracellulaire libre lors de l'augmentation de sa concentration. Elles sont localisées dans les organelles spécialisées dans le stockage du calcium dans le cytoplasme de la cellule, le réticulum sarco- ou endoplasmique. La calséquestrine est la protéine principale localisée dans le réticulum sarcoplasmique (RS) des cellules musculaires. La calréticuline est aussi une protéine importante du RS dont la structure primaire ressemble à celle de la calséquestrine. Ces protéines ont la caractéristique de lier une grande quantité de calcium mais avec une faible affinité. Cependant, certains membres dont la calréticuline possèdent les deux types de sites c.-à-d. de faible et de forte affinité. Le site de forte affinité est capable de lier un ion calcium alors que son site de faible affinité peut en lier 25 (118,119).

## **3.2 Types de liaison du calcium**

### **A) Forte affinité**

La liaison avec forte affinité est assurée principalement par le motif *EF-hand*. Celui-ci est composé de 40 acides aminés. Deux domaines en hélices alpha entrecoupés d'une structure en boucle de 12 acides aminés représente sa structure tridimensionnelle. C'est la structure en boucle qui est directement responsable de la liaison du calcium

(125,201). En théorie, chaque motif *EF-hand* est capable de lier un ion calcium. Certaines exceptions s'appliquent par exemple pour la CaM de levure qui possède quatre *EF-hand* ne lient que trois ions calcium. Une activité de dimérisation a été associée aux motifs *EF-hand*, c.-à-d. le motif d'hélice-boucle-hélice (HBH) (201). La dimérisation de deux HBH résulte en un domaine globulaire stabilisé par des interactions hydrophobes à l'interface des deux motifs HBH. De plus, il a été démontré que la dimérisation de deux HBH contrôle l'affinité pour le calcium. Ce sont les interactions hydrophobes qui stabilisent le domaine et modulent l'affinité pour le calcium (201).

## **B) Faible affinité**

Ce type de liaison du calcium est restreint aux protéines du RS ou du RE et aux annexines. La calréticuline, une protéine du RS, ne possédant qu'un seul site de liaison du calcium de forte affinité et capable de lier 50 moles de calcium/mole de protéine avec une faible affinité. La calséquestrine, une autre protéine du RS, possède uniquement des sites de liaison du calcium de faible affinité (30-50 moles de calcium/mole de protéine) avec un  $K_d$  de 1mM (119,191).

Les annexines lient le calcium via leurs domaines *endonexin fold* qui sont hautement conservés chez tous les membres de cette famille (3,192). Chaque membre de la famille possède une séquence en acides aminés similaire dans la région C-terminale qui est responsable de la liaison aux phospholipides de façon dépendante du calcium (192).

## **3.3 Rôle de ces protéines dans les fonctions cellulaires**

### **A) La famille des protéines *EF-hand***

La CaM, qui est une protéine possédant quatre motifs *EF-hand*, a été intensément étudiée due au fait qu'elle est exprimée abondamment dans toutes les cellules eucaryotes. Ceci suggère qu'elle est impliquée dans des processus importants de la cellule. En fait, la CaM est impliquée dans plusieurs événements cellulaires dépendants du calcium. Notamment, elle est impliquée dans la mitose, la sécrétion, les flux de calcium et le

métabolisme du cAMP (1,9,11,22,42,125,188,202). Elle active une variété d'enzymes intracellulaires importantes qui ont des activités très diverses comme les phosphodiesterases des nucléotides cycliques, les protéines kinases/phosphatases, les oxyde nitrique synthases, l'adénylyl cyclase et la  $\text{Ca}^{2+}$ /ATPase (1,3,9,125,202). Par contre, même si l'expression de la CaM est ubiquitaire, il demeure qu'elle a une activité tissu-spécifique due à la localisation spécifique de ses protéines cibles. Plusieurs enzymes sont dépendantes de la CaM notamment la kinase de la chaîne légère de la myosine et les CaM kinase I, II, IV et V qui ont un champ d'action vaste (3,125). Particulièrement, comme son nom l'indique, la kinase de la chaîne légère de la myosine est responsable de la phosphorylation de la chaîne légère d'une protéine musculaire, la myosine. Cette phosphorylation favorise l'hydrolyse de l'ATP par la myosine en présence de l'actine. Dans les VSMC, ceci résulte en une contraction en réponse à une augmentation des niveaux de calcium intracellulaire (124-126).

Certains membres de la famille des protéines S-100 ont été impliqués dans la croissance cellulaire. Ceci est appuyé par le fait que certaines sont plus exprimées dans des tumeurs (51). De plus, une augmentation de la concentration cytosolique de calcium est observée dans plusieurs cellules tumorales suggérant que cela contribue à la motilité et par conséquent, à l'invasion par ces cellules (11,42,186,203). Elles ont aussi été impliquées dans le processus de stimulus-sécrétion des cellules chromaffines de la surrénale (6).

Les calbindines-D9k et -D28k sont aussi des protéines possédant deux et six motifs *EF-hand* respectivement. La présence de ces motifs est sûrement essentielle pour la fonction de ces protéines. Elles sont impliqués dans le transport du calcium dans le rein (CaBP28K) et l'intestin (CaBP9K) (61,63,96,98,204). Le rôle de la parvalbumine est plutôt restreint au tamponnage du calcium dans le cytosol. En fait, elle est impliquée dans la recapture du calcium après une contraction musculaire en jouant le rôle de tampon calcique relaxant (22,191)

**B) La famille des protéines dépendantes du calcium liant les phospholipides  
(annexines et protéines possédant une région C2)**

Le rôle des annexines n'est pas encore sûr. Elles sont proposées comme médiatrices de la fusion des membranes cellulaires. Ceci pourrait impliquer le processus d'exocytose qui est un phénomène dépendant du calcium (6,7,32,193,194). Elles pourraient être impliquées dans l'inhibition de la coagulation, dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation cellulaire (205-207).

La PKC, qui est la plus connue de cette famille, participe dans la régulation de plusieurs fonctions cellulaires dont le cycle cellulaire, la différenciation, la croissance, la carcinogenèse, l'endocytose, l'exocytose, la contraction musculaire et l'expression génique (208,209).

**C) La famille des protéines responsable du stockage du calcium**

Leur rôle n'est pas encore complètement clarifié mais il est proposé qu'elles auraient un rôle de tampon dans les régions à haute concentration de calcium à l'intérieur du RS ou du RE. Elles pourraient concentrer le calcium près des sites où les canaux calciques sont localisés afin d'assurer une disponibilité rapide du calcium lorsque les RS ou les RE sont stimulés. Elles feraient, de plus, le monitoring du niveau de calcium à l'intérieur du RS et du RE (118,119).

**3.4 Études des anomalies du calcium dans l'hypertension artérielle**

**A) La membrane cellulaire, origine des anomalies du métabolisme ionique**

Le transport du calcium intracellulaire et extracellulaire sont tous deux anormaux dans les modèles d'animaux d'hypertension génétique ainsi que dans l'hypertension artérielle essentielle humaine (23,41,210-213). Par ailleurs, ce phénomène semble être présent même avant l'augmentation de la pression artérielle chez des sujets normotendus avec une histoire familiale d'hypertension (214,215). Plusieurs études ont démontré que les humains et les rats hypertendus présentent un équilibre calcique négatif, c.-à-d. une

concentration de calcium intracellulaire élevée en présence d'une concentration de calcium extracellulaire faible (52,216-218). Des hypothèses ont été émises afin d'expliquer cette concentration intracellulaire de calcium élevée. Certains groupes se sont attardés à étudier la membrane plasmique cellulaire des patients hypertendus car le rôle de cette dernière est d'agir comme barrière physiologique pour les ions donc de moduler la concentration ionique intracellulaire. En outre, il a été observé que les hypertendus montrent une fluidité membranaire diminuée (17,220,221). Une membrane cellulaire intacte est très importante due au fait qu'elle est responsable de l'intégrité des protéines qui y sont localisées. Or, la fonction des récepteurs, la sécrétion hormonale, la régulation du volume cellulaire et la composition ionique du milieu intracellulaire sont des activités qui dépendent d'une membrane cellulaire fluide (17,53).

Rappelons que la concentration de calcium intracellulaire est le stimulus principal pour l'initiation de la contraction des cellules du muscle lisse vasculaire (VSMC) (54,122,123). Une contractilité accentuée est observée dans l'hypertension artérielle et semble être due à un déséquilibre calcique intracellulaire et extracellulaire. En effet, il a été démontré que la contractilité basale des artères coronaires humaines isolées peut être diminuée par l'application d'antagonistes des canaux calciques et par l'inhibition de la protéine kinase C. Ceci suggère que le calcium intracellulaire et extracellulaire sont tous deux importants pour le contrôle du tonus vasculaire basal. Par contre, la contractilité myogénique en réponse à l'addition d'un agoniste de la PKC par exemple est accrue pour des coronaires isolées de patients hypertendus comparativement aux mêmes vaisseaux provenant de patients normotendus (219). Ceci suggère que les vaisseaux des hypertendus ont une contractilité accentuée accordant au calcium un rôle dans cette anomalie.

### **B) Le transport de l'ion calcium dans l'hypertension artérielle**

Une membrane cellulaire rigide présente dans l'hypertension essentielle et expérimentale pourrait être responsable des anomalies du transport ionique observées chez

ceux-ci (17,220,221). En effet, plusieurs transporteurs d'ions ont été étudiés et semblent montrer une activité anormale dans l'hypertension.

#### *L'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$*

L'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  est un transporteur important pour la régulation de la concentration du calcium intracellulaire dans plusieurs types de cellules, notamment les VSMC (54,222). Étant donné que l'échangeur a une faible affinité pour le calcium (53), ceci implique qu'il n'est probablement pas responsable du contrôle subtil de la concentration de calcium intracellulaire. Il serait plutôt la voie principale pour la sortie rapide du calcium suite à la stimulation des VSMC. L'inhibition de cette voie dans les cellules stimulées pourrait mener à une réponse contractile soutenue et par conséquent, à une relaxation tardive (54,116). À l'état de base, l'échangeur permet la sortie d'un ion calcium pour l'entrée de trois ou quatre ions sodium. Par contre, lorsque la concentration de sodium intracellulaire est élevée, l'activité de l'échangeur est inversée, c.-à-d. qu'il favorise la sortie de sodium et l'entrée de calcium (54). Le transport d'ions est passif et dépend donc de la concentration de calcium et de sodium intracellulaire et extracellulaire et possiblement du potentiel membranaire (222). L'échangeur est exprimé principalement dans le tissu cardiaque avec une expression plus faible dans le cerveau, les reins, les poumons, les VSMC et les cellules du muscle squelettique (41). Des études sur le muscle cardiaque ont montré que l'activité de l'échangeur est liée à celle de la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase par la présence de sodium intracellulaire libre. Le sodium est connu pour moduler la contractilité des VSMC, il est donc possible que cette régulation implique soit l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  et/ou la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase (222).

L'activité de l'échangeur a été démontré très importante dans la régulation de la contractilité des VSMC. Or, très peu d'études ont démontré une différence d'activité de l'échangeur dans l'hypertension (41,54). Une étude a démontré une diminution de son activité chez les rats SHR (223) mais la plupart des autres travaux n'ont montré aucun changement de l'activité (41). Rappelons que l'activité de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  et la

direction du flux d'ions dépendent, entre autres, de la concentration intracellulaire et extracellulaire du sodium. Ce gradient est assuré par la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase (222). En effet, une augmentation de la concentration de sodium intracellulaire favorise la sortie de sodium et l'entrée de calcium. Or, une diminution de l'activité de la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase dans les VSMC par exemple due à la présence d'un inhibiteur de celle-ci a été démontré chez les humains et les rats hypertendus (55). La baisse de l'activité de la pompe aurait pour conséquence d'augmenter la concentration de calcium cytosolique et ainsi de favoriser la contraction des VSMC (122,123). Une hypercontractilité des VSMC est typique de l'hypertension artérielle (224,225).

#### *La pompe $\text{Ca}^{2+}$ ATPase*

La pompe  $\text{Ca}^{2+}$ ATPase est exprimée dans toutes les cellules eucaryotes étudiées jusqu'à présent. Le transport d'un ion calcium à l'extérieur de la cellule par la pompe est possible via l'hydrolyse d'une molécule d'ATP. La  $\text{Ca}^{2+}$ ATPase est une protéine à 10 passages transmembranaires avec les extrémités N- et C-terminaux situés dans le cytoplasme. La portion C-terminale de la pompe contient des domaines de liaison pour le calcium et pour la CaM. La boucle cytoplasmique localisée entre le quatrième et le cinquième passage transmembranaire est responsable de l'activité catalytique et contient des sites de liaison pour l'ATP. L'activité de cette enzyme est modulée positivement par la CaM. Une interaction du complexe calcium-CaM avec le site de liaison de la CaM à l'extrémité C-terminale de la pompe  $\text{Ca}^{2+}$ ATPase mène à une augmentation de son activité maximale de deux à quatre fois et à une augmentation de son affinité pour le calcium de cinq à dix fois (41).

L'activité basale de la  $\text{Ca}^{2+}$ ATPase a été démontrée diminuée dans les plaquettes alors qu'elle est soit diminuée soit inchangée dans les érythrocytes de patients hypertendus comparativement aux patients normotendus (10). Une activité diminuée de la  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase située dans la membrane basolatérale des entérocytes des SHR pourrait être responsable d'une baisse de l'absorption calcique observée chez ces rats (100). De plus, il semblerait

que la stimulation de la pompe par la CaM est diminuée dans les érythrocytes des rats SHR et dans les érythrocytes et les plaquettes d'humains hypertendus. Par ailleurs, des études de structure de la  $\text{Ca}^{2+}$ ATPase ont montré une diminution du nombre de molécules d'enzyme dans les membranes plasmiques des cellules endothéliales et des VSMC des artérioles de patients hypertendus comparativement aux mêmes vaisseaux provenant de patients normotendus (226). Une diminution de l'activité de la pompe dans les VSMC aurait donc pour effet d'augmenter la concentration de calcium intracellulaire ce qui favoriserait la contraction de ces cellules et finalement augmenterait le tonus vasculaire. Or, une corrélation positive a été établie entre la pression systolique et diastolique et l'activité de l'enzyme (226). De plus, une baisse significative de la pression artérielle corrélée avec une baisse de la concentration de calcium intracellulaire est observée chez des rats SHR soumis à un régime riche en calcium (15). Il est proposé qu'une augmentation de l'apport de calcium dans l'alimentation favoriserait, entre autres, l'activation de la pompe  $\text{Ca}^{2+}$ ATPase dans l'hypertension expérimentale et humaine et par conséquent favoriserait une diminution de la concentration de calcium intracellulaire (2).

### **C) Le rôle du sodium dans l'hypertension artérielle**

Il est connu que des interactions existent au niveau cellulaire entre les ions calcium et sodium via l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  et la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase permettant le maintien de l'homéostasie de ces ions (23,53-55). Plusieurs études épidémiologiques suggèrent qu'une association existe entre l'apport en sodium alimentaire et la probabilité de développer l'hypertension artérielle (227). Or, une concentration intracellulaire de sodium élevée est observée dans plusieurs types cellulaires chez les rats et les humains hypertendus (115,228-230). L'augmentation de l'apport alimentaire en sodium favorise, entre autres, la diminution du flux sanguin rénal et la rétention d'eau donc l'augmentation du volume sanguin et par conséquent l'élévation de la pression artérielle. En augmentant l'apport de calcium alimentaire, cela facilite la natriurèse (perte de sodium) et la diurèse (perte d'eau) par le rein en plus d'avoir un effet bénéfique sur la pression artérielle. Plus



particulièrement, le calcium inhibe la réabsorption de sodium par le tubule proximal du rein (231).

#### *La pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase*

La pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase est une protéine membranaire qui est exprimée dans toutes les cellules eucaryotes. Elle possède un site catalytique et plusieurs sites de liaison du sodium, du potassium et des glycosides cardiaques (e.g. ouabaïne) (232). Le site catalytique ainsi que les sites de liaison pour le sodium sont situés à la surface interne de la membrane cellulaire alors que les sites de liaison pour le potassium et les glycosides cardiaques sont à la surface externe. La pompe catalyse la sortie de trois ions sodium et l'entrée de deux ions potassium en hydrolysant une molécule d'ATP (115). L'activité de la pompe est dépendante de la concentration de magnésium et peut être inhibée par la ouabaïne. Le rôle de la pompe est d'assurer un gradient des ions potassium et sodium de part et d'autre de la membrane cellulaire. L'activité de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase peut être mesurée, entre autre, par la composante de l'influx de rubidium (<sup>86</sup>Rb) sensible à la ouabaïne. Le <sup>86</sup>Rb est utilisé plus couramment comme traceur de potassium que le <sup>42</sup>K car la demi-vie de ce dernier isotope est très court. La cellule utilise le rubidium comme si c'était du potassium, elle ne fait pas la différence.

Dans la plupart des études, une diminution de l'activité de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase a été observée dans les érythrocytes de rats SHR et dans les leucocytes et les érythrocytes d'humains hypertendus (10,115). Cette diminution de l'activité a été attribuée à la présence d'un facteur inhibiteur qui est présent en plus grande quantité dans la circulation sanguine des rats et des humains hypertendus que leurs témoins normaux respectifs (55). Cet inhibiteur a une structure similaire à la ouabaïne endogène et peut donc se fixer sur le site de liaison extracellulaire des glycosides cardiaques. Le mécanisme proposé pour cette molécule est la modulation de l'absorption du sodium et du tonus des VSMC en régulant l'activité de l'échangeur (55,228). La présence de ce facteur peut possiblement être à

l'origine de la concentration de sodium intracellulaire élevée observée dans les modèles animaux d'hypertension génétique et chez les humains hypertendus (10,228).

Le groupe de Bianchi a identifié deux mutations ponctuelles dans la séquence qui code pour le gène de l'adducine. Par ailleurs, ils ont démontré une coségrégation de ces mutations avec l'hypertension artérielle chez les rats hypertendus de Milan (233). L'adducine est une protéine formée d'un hétérodimère ( $\alpha$  et  $\beta$ ) qui module l'assemblage des sous-unités de l'actine du cytosquelette (234). Il a été montré que les deux mutations ponctuelles dans le gène de l'adducine influencent la polymérisation de l'actine, l'organisation du complexe actine-cytosquelette et l'activité de la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase (235). Le groupe de Ferrandi a également démontré une augmentation de l'activité de la pompe dans des cellules rénales parallèle à l'augmentation du mRNA codant pour les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  ainsi que de la quantité de protéine (236). Une activité accrue de la pompe dans les cellules rénales impliquerait l'augmentation de l'absorption rénale de sodium, un phénomène qui est souvent observé chez les rats et les humains hypertendus (237).

#### *Le cotransporteur $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$*

Le cotransporteur  $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$  assure le transport bidirectionnel simultané des ions sodium, potassium et chlore avec un ratio de 1:1:2 (115,238,239). La direction du flux d'ions va dépendre du gradient de ces ions de part et d'autre de la membrane et peut être inhibé par des diurétiques comme le furosémide et la bumétanide. Cette dernière a une action inhibitrice plus spécifique sur le cotransporteur. L'activité du cotransporteur peut être évaluée par la composante du flux d'ions qui est sensible à la bumétanide mais résistante à la ouabaïne. Il est exprimé dans plusieurs cellules notamment les cellules de l'endothélium vasculaire (VEC) (240) et les VSMC (241). Il est particulièrement responsable du maintien de la concentration intracellulaire des ions monovalents, du volume cellulaire et des fonction reliés telles la prolifération et la croissance cellulaire. (238,239,242-244). Dans la plupart des cellules à l'état basal, le cotransporteur est pratiquement inactif. La diminution du volume cellulaire produit par un choc

hyperosmotique est un stimulus puissant pour l'activation du cotransporteur qui favorisera alors l'entrée du sodium et de l'eau. Le retour au volume cellulaire initial est complété en quelques minutes. L'activité du cotransporteur dans les VSMC est sous le contrôle de plusieurs peptides vasoactifs, notamment l'angiotensine II (245) et par les niveaux intracellulaires des nucléotides cycliques, le cAMP et le cGMP (246,247). L'activité du cotransporteur dans les VEC en culture est aussi modulée par le calcium extracellulaire. En effet, O'Donnell (240) a montré que l'activité du cotransporteur ne pouvait être stimulée par l'angiotensine II, la vasopressine ou la bradykinine qu'en présence de calcium dans le milieu d'incubation. Son activité basale est aussi dépendante du calcium car sans calcium dans le milieu d'incubation, l'activité du cotransporteur est encore plus basse que l'activité basale (240).

Les études portant sur l'activité du cotransporteur dans l'hypertension sont quelque peu controversées. Certains groupes observent une augmentation ou une diminution de l'activité ou même n'observent aucun changement de l'activité dans les érythrocytes d'humains hypertendus comparés à leurs témoins normotendus (53,115,248). Ces résultats divergeants peuvent possiblement être expliqués par l'utilisation de différents types de cellules ou encore de différentes cohortes de patients. L'expression de l'hypertension essentielle est très hétérogène dans la population et dépend d'un ensemble de facteurs environnementaux et génétiques propres à un individu (249). Toutefois, les études chez les rats sont un peu plus concluantes. Une corrélation positive entre l'activité du cotransporteur et la pression artérielle a été établie en utilisant des rats F2 issus d'un croisement frère-soeur de rats hypertendus et normotendus de la génération F1 (53). Le groupe d'Orlov (246) a démontré une diminution de 30% à 40% de l'activité basale du cotransporteur dans des VSMC de SHR en état de prolifération comparativement aux mêmes cellules de rats normotendus BN.*lx*. Par contre, cette différence est perdue lorsque les cellules sont rendues quiescentes par déprivation de sérum. Cependant, une autre étude a démontré une activité accrue du cotransporteur dans des VSMC quiescentes de rats SHR comparativement aux mêmes cellules de rats normotendus WKY (250). Il est possible que

la différence de base génétique des rats normotendus utilisés dans ces études, WKY et BN.*lx.*, soit à l'origine de la différence de l'activité observée.

### *L'échangeur Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>*

L'échangeur Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> est une protéine membranaire constituée de 10 à 12 passages transmembranaires (251). Quatre isoformes de ce transporteur ont été clonés, NHE-1, -2, -3, -4 (échangeur Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-1, -2, -3, 4)(252). L'isoforme NHE-1 est ubiquitairement exprimée et est la plus étudiée (253). Le domaine N-terminal extracellulaire catalyse la sortie d'un proton pour l'entrée d'un ion sodium et est le site de liaison pour un inhibiteur, l'amiloride. L'extrémité C-terminale intracellulaire comprend des domaines de régulation par les facteurs de croissance, les agents vasoactifs et les stimuli hyperosmotiques. L'ensemble de ces stimuli activent l'échangeur en produisant une augmentation de la concentration de calcium cytosolique et une alcalinisation du milieu intracellulaire (253). Par ailleurs, l'échangeur est responsable du maintien du pH intracellulaire, de la réabsorption du sodium par les tubules rénaux (251) et serait impliqué dans la régulation du volume intracellulaire (243). L'échangeur, tout comme le cotransporteur Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup>, est aussi activé lors de la diminution du volume cellulaire (243).

Chez le patient hypertendu, l'activité de l'échangeur est augmenté dans les plaquettes, les lymphocytes, les leucocytes *in vitro* et dans le muscle squelettique *in vivo*. Par ailleurs, l'expression de l'échangeur est accrue dans les lymphocytes immortalisés de ces patients (115). Une étude effectuée chez des souris transgéniques qui surexpriment l'échangeur Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> dans leurs tubules rénaux démontrent une augmentation de la rétention sodique et une pression artérielle accrue après une ingestion de sel (251). Ces résultats suggèrent que l'échangeur est très important dans le métabolisme de l'ion sodium et possiblement dans la pathogénie de l'hypertension artérielle.

#### **D) Les mécanismes de séquestration du calcium intracellulaire dans l'hypertension artérielle**

Les anomalies de l'activité des transporteurs d'ions ne sont toutefois pas observées dans tous les cas d'hypertension essentielle (115). Effectivement, ceux qui ont une anomalie membranaire ont une concentration de calcium intracellulaire élevée en présence d'une concentration extracellulaire faible. Ces gens seront sensibles aux antagonistes des canaux calciques car la concentration de calcium intracellulaire élevée dépend de l'entrée du calcium du milieu extracellulaire. Ceux qui n'ont pas d'anomalies membranaires vont plutôt avoir une anomalie de la séquestration du calcium à l'intérieur de la cellule. Ceux-ci ne sont pas dépendants de la concentration de calcium extracellulaire et ne seront donc pas sensibles aux antagonistes des canaux calciques. On peut donc imaginer que chez les hypertendus, les mécanismes d'emmagasiner du calcium intracellulaire peuvent être impliqués dans les défauts du métabolisme du calcium. Or, rappelons que le signal principal pour la contraction des VSMC est l'augmentation de la concentration de calcium cytosolique via sa libération par le réticulum sarcoplasmique (RS). Suite au stimulus de contraction, il y a activation de la phospholipase C stimulant la production d'inositol trisphosphate ( $IP_3$ ). L' $IP_3$  va alors se fixer sur des récepteurs spécifiques sur le RS et ainsi favoriser la libération de calcium (4). Or, le groupe de Côtés (254) a démontré que la libération de calcium par le RS stimulée par l'angiotensine II est accentuée dans les VSMC en culture de rats SHR suggérant un mécanisme probable de l'augmentation exagérée de la concentration de calcium dans ces cellules.

#### **E) Le métabolisme du calcium extracellulaire dans l'hypertension artérielle**

En plus des anomalies des transporteurs d'ions qui peuvent être responsables de la concentration accrue des ions calcium et sodium dans l'hypertension, une perméabilité membranaire augmentée a été notée chez les rats SHR ainsi que chez l'humain hypertendu. Normalement, l'environnement intracellulaire est protégé d'une accumulation de calcium par une concentration de calcium extracellulaire élevée. Le calcium a pour effet de rendre

la membrane moins perméable non seulement aux ions calcium mais aussi aux autres ions (14,17). Ce phénomène est connu sous le nom de “stabilisation membranaire”. Or, des études de liaison du calcium ont démontré que les membranes cellulaires des rats SHR (255) et des humains hypertendus (256) ont une capacité de liaison du calcium diminuée. Par ailleurs, il est documenté que la concentration de calcium plasmatique chez les SHR (15,211) ainsi que chez les humains (52,257) est plus faible que leurs témoins supportant encore un rôle pour le calcium dans la stabilisation des membranes et par conséquent dans le métabolisme ionique intracellulaire. Une restriction alimentaire en calcium a été associée aux risques de développer l’hypertension artérielle par plusieurs groupes, en particulier chez les patients sensibles au sel (258). Par ailleurs, une baisse de la pression artérielle significative corrélée à une baisse de la concentration de calcium intracellulaire est observé chez des rats SHR soumis à un régime riche en calcium (15). De plus, un supplément de calcium donné à des rats augmente significativement l’activité de la  $\text{Ca}^{2+}$ ATPase dans les érythrocytes avec une réduction concomitante de la concentration de calcium intracellulaire et de la pression artérielle (259).

#### **F) Les protéines liant le calcium dans l’hypertension artérielle**

Plusieurs anomalies du métabolisme ionique présentés jusqu’ici impliquent la protéine de liaison du calcium, la CaM. En effet, vu son rôle dans la régulation de plusieurs phénomènes biologiques qui sont anormaux dans l’hypertension comme l’activité de la pompe  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase (260), la contraction des VSMC (126), une anomalie soit en quantité ou en qualité de la CaM entraînerait une déficience de la cellule à tamponner et à éliminer le calcium excédentaire de la cellule. Ceci pourrait résulter ultimement en l’augmentation de la concentration de calcium intracellulaire libre (261).

Notre groupe a démontré une activité accrue de la CaM dans le coeur et le rein de rats et de souris hypertendus (262,263) comparativement à leurs témoins normotendus respectifs. Toutefois, nous n’avons pu démontrer une augmentation parallèle de la quantité d’enzyme. Nous avons alors proposé que la différence d’activité de la CaM observée dans

les cas d'hypertension serait due à la présence d'un activateur de celle-ci (264). Rappelons que la CaM module l'activité de plusieurs enzymes intracellulaires importantes et des processus cellulaires qui ont été démontré anormaux dans l'hypertension tels la  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$  ATPase, l'ATPase dépendante de la CaM et la phospholipase  $\text{A}_2$  (260,265,266). Par ailleurs, la CaM est aussi responsable de moduler l'activité d'une enzyme, la phosphodiestérase des nucléotides cycliques (PDE). La PDE dégrade les nucléotides cycliques, cAMP et cGMP, afin de limiter leur activité biologique.

Les nucléotides cycliques de concert avec le calcium médient plusieurs activités biologiques cellulaires (267). Plusieurs d'entre elles sont anormales dans l'hypertension notamment la vasoconstriction (23,92). La production du cAMP et du cGMP est assuré via l'adénylyl cyclase et la guanylyl cyclase respectivement. Ces deux nucléotides cycliques, lorsque présents en grande quantité dans les cellules, favorisent la vasorelaxation (92). Le régulation de la quantité de ces deux nucléotides cycliques produite est sous le contrôle de la phosphodiestérase dépendante de la CaM (PDE-CaM). Donc, lorsque présente, la PDE-CaM dégrade les nucléotides cycliques et par le fait même inhibe l'effet vasorelaxant.

L'activateur que nous avons isolé stimule la CaM en présence de calcium et par conséquent augmente l'activité de la PDE-CaM. L'activité de la PDE-CaM est élevée dans le coeur, le rein ainsi que dans les VSMC en culture (202) et peut être modulée par le calcium alimentaire (268). Nous avons alors nommé l'activateur, la *Calmoduline Phosphodiesterase activator* (CPA) (264). Le CPA est un peptide d'environ 4kDa, est stable à la chaleur et est sensible aux protéases. Donc, la présence d'un facteur qui semble moduler le métabolisme calcique dans l'hypertension et qui est lui-même modulé par le calcium alimentaire indique l'importance de la recherche de ce type de facteurs.

D'autres protéines liant le calcium sont anormales dans l'hypertension. Le groupe de Drüeke (269,270) a observé une diminution de la quantité des protéines CaBP9K et CaBP28K dans l'épithélium intestinal et rénal. La diminution de protéines est parallèle aux anomalies de la structure de l'épithélium des cellules intestinales et du rein. Le groupe de Kowarski (271) a démontré une réduction de la quantité de la protéine IMCAL dans

l'intestin, le coeur, le rein, le foie et le muscle squelettique des rats SHR. La protéine IMCAL est très importante entre autres, pour le transport et l'absorption intestinal du calcium. Or, une diminution de ces protéines peut possiblement participer à l'équilibre calcique négatif (concentration de calcium intracellulaire élevée en présence d'une concentration de calcium extracellulaire faible) observé dans l'hypertension humaine et expérimentale (52,216-218). En fait, plusieurs études ont montré que l'excrétion de calcium est augmenté chez les hypertendus (257) et chez les rats SHR (211) suggérant un rôle anormal des protéines liant le calcium dans la réabsorption calcique dans le rein. Par contre, la diminution de la quantité de ces protéines n'est sûrement pas suffisant pour être entièrement responsable de la baisse de l'absorption calcique.

Les hormones calcitropiques, notamment la PTH et la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  sont toutes deux importantes pour la régulation de l'absorption calcique par les reins et les intestins (41,59-61,63,64). Or, il a été démontré que les niveaux de la PTH sont élevés chez les hypertendus comparativement à leurs témoins normotendus (112,272,273). Il est proposé que la stimulation de la production de la PTH et de la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  serait conséquent à l'augmentation de l'excrétion de calcium (112). Par contre, des anomalies du métabolisme de la PTH ont été observées chez des patients hypertendus. Pour une concentration plasmatique de calcium identique, il y a une plus grande stimulation de la production de la PTH chez les hypertendus que chez les normotendus (274). Tous ces résultats mis ensembles suggèrent un défaut du métabolisme du calcium en général. Ces anomalies du métabolisme ont aussi des répercussions sur les stocks de calcium dans l'organisme. Rappelons que l'os est l'endroit où la majorité du calcium de l'organisme est emmagasiné (16,67,80,223). Or, une augmentation du nombre d'ostéoclastes a été observé chez les rats SHR (75). Par ailleurs, une diminution de la densité osseuse chez les humains et les rats hypertendus corrobore la notion que les hypertendus sont déficients en calcium (23,216,275).

L'hormone PTH a des propriétés vasoactives (23,59,276). De plus, environ 40% des patients souffrant d'hyperparathyroïdie primaire sont également hypertendus (277). Le



parathyroïdectomie chez ces patients normalise la pression artérielle ainsi que les concentrations plasmatiques de calcium et de PTH (278,279). Le groupe de Lewanczuk a démontré qu'un peptide d'origine parathyroïdienne possédant des propriétés vasoactives et capable d'augmenter les niveaux de calcium intracellulaire des VSMC (280), est présent en plus grande quantité dans la circulation sanguine des rats SHR comparativement aux rats WKY (normotendus) (280). De plus, ce facteur est capable d'augmenter la pression artérielle lorsqu'injecté à des rats normotendus (281) et est régulé négativement par le calcium extracellulaire (282). Également, une corrélation positive a pu être observée entre les niveaux du peptide et la sensibilité au sel tandis qu'une corrélation négative existe entre les niveaux du peptide et les niveaux de rénine (280). Ils ont nommé ce facteur PHF signifiant, *Parathyroid Hypertensive Factor*. Des études chez l'humain, indiquent que ce peptide est aussi présent et agit sensiblement de la même façon que chez le rat. Il a été purifié à partir du plasma de rats SHR et partiellement caractérisé (283). PHF a une masse moléculaire prédite de 3-4kDa, est résistant à la chaleur mais est sensible à la trypsine. De plus, PHF peut être dosé par absorbance spectrophotométrique dans le spectre des U.V. (283). Ces évidences supportent l'idée que PHF possède une structure peptidique. Par ailleurs, PHF n'a pu être détecté par la même technique dans le plasma de rats normotendus (WKY et Sprague-Dawley) (283).

#### **4. La Génétique**

L'hypertension artérielle essentielle est une maladie polygénique avec une composante environnementale très importante (249). Les maladies multifactorielles sont causées par plusieurs gènes qui interagissent entre eux ainsi qu'avec des facteurs environnementaux pour créer un gradient de susceptibilité génétique à ces maladies. Dans la population, qui est hautement hétérogène, il est envisageable que l'hypertension s'exprime sous différentes formes. Le fait que les maladies polygéniques ne sont pas transmises suivant les lois de la génétique classique tracées par Georges Mendel, rend la tâche plus difficile pour l'identification des gènes causals (284). Donc, des approches

généétiques et expérimentales plus complexes sont utilisées afin d'identifier des gènes candidats qui pourraient être impliqués dans l'hypertension artérielle. Ceci implique la production de nouveaux modèles animaux plus spécialisés et des techniques de biologie moléculaire avancées.

#### **4.1 Modèles animaux**

La majorité des études génétiques effectuées jusqu'à présent sont fondés sur des modèles animaux qui miment le plus possible la maladie humaine qui est à l'étude. Cependant, ce sont souvent des modèles imparfaits ce qui fait qu'il faut les connaître à fond pour prendre en considération les différences. Pour l'hypertension artérielle, plusieurs modèles existent mais le plus populaire est le rat spontanément hypertendu (SHR) (284). Spécifiquement, les anomalies du métabolisme du calcium observées chez l'humain sont assez bien représentées chez le SHR (41,115). D'autres modèles ont aussi été utilisés pour l'étude du métabolisme du calcium dans l'hypertension ce sont les rats hypertendus de Lyon, les rats hypertendus et normotendus de Milan et les rats Dahl sensibles et résistants au sel. En général, les modèles animaux d'hypertension génétique sont caractérisés par une élévation de la résistance périphérique totale en présence d'un débit cardiaque normal (285). Une réponse contractile exagérée des vaisseaux aux agonistes vasoconstricteurs (286) et au stress psychologique (287) a été observés chez les rats SHR comparativement à leur témoin normotendu le rat WKY. Rappelons que le calcium est impliqué dans la contraction des VSMC donc il est possible que les anomalies décrites dans les modèles d'hypertension soient dues à des troubles du métabolisme du calcium.

##### *Les rats consanguins*

Ce sont les rats les plus communément utilisés pour l'étude de différents aspects de l'hypertension. Les rats consanguins SHR ont été produits en croisant des rats non consanguins normotendus et en sélectionnant pour l'hypertension. Le croisement frère-

soeur pour plus de 20 générations rend les loci sur tous les chromosomes homozygotes (288).

#### *Les rats recombinants consanguins (RIS)*

Les RIS sont des rats issus de croisements des rats consanguins hypertendus et normotendus. Les rats de la génération F1 possèdent pour chacune de leurs paires de chromosomes, un chromosome hypertendu et un chromosome normotendu. Le croisement frère-soeur de la génération F1 produit la génération F2. Chaque individu de la génération F2 est unique et est hétérozygote pour tous les loci dû aux recombinaisons homologues des chromosomes. Le croisement subséquent des frères et soeurs de la génération F2 pour plus de 20 générations produit les RIS. Ces RIS sont essentiellement homozygotes pour tous les loci sur leurs chromosomes. Chaque souche de rat représente un rat F2 hybride et chacun des rats appartenant à une souche spécifique sont génétiquement identiques. Ce qui différencie l'utilisation des rats F2 et des RIS dans des études génétiques est la précision avec laquelle les paramètres sont obtenus avec les RIS. Chaque rat F2 sont différents donc pour 1 rat il n'y a qu'une mesure d'un paramètre. Alors que chez les RIS, pour plusieurs rats dans une souche, on obtient plusieurs mesures d'un paramètre dont on peut en retirer la moyenne (284).

Ces RIS ont permis de confirmer que l'hypertension est une maladie polygénique dû au fait que la distribution de la pression artérielle entre les souches parentales est un continuum et se situe entre les pressions des progéniteurs SHR et BN.*lx* (284). Si l'hypertension avait été monogénique, il y aurait eu une distribution bimodale de la pression, c.-à-d. un groupe se serait comporté comme BN et l'autre comme SHR. Pour une maladie polygénique, les RIS sont un outil indispensable si l'on imagine que chaque locus d'hypertension n'est responsable qu'en partie de la pression finale. Il y a 33 souches de RIS de rats disponibles (289). Ils sont maintenant cartographiés pour environ 500 marqueurs informatifs sur tout leurs chromosomes. Ceci représente environ 80% du génome total.

Lorsque le gène d'intérêt est cloné, il est possible de regarder s'il existe une différence dans la séquence de DNA entre les rats hypertendus et normotendus. La technique la plus couramment utilisée est la recherche de polymorphismes de restriction (*Restriction Fragment Length Polymorphism*, RFLP). Les enzymes de restriction reconnaissent et coupent des séquences de DNA spécifiques. S'il y a une mutation dans le site de reconnaissance d'une enzyme ou il y a des réarrangements dans le DNA (e.g. insertion ou délétion de DNA), les tailles des fragments obtenus suite à la digestion avec une enzyme de restriction vont varier. Une analyse de coségrégation de loci génétiques avec la pression artérielle en utilisant les RFLP est un outil puissant pour impliquer ou éliminer des gènes comme cause des différences génétiques de la tension artérielle (288). Par ailleurs, les études de coségrégation en utilisant les RIS sont très précises due au fait que les pressions artérielles sont constantes à l'intérieur d'une souche.

## **5. Études initiales de HCaRG**

Plusieurs anomalies du métabolisme du calcium ont été décrits chez des humains hypertendus ainsi que chez des modèles animaux d'hypertension génétique (23,41,115,211-213). En fait, les hypertendus démontrent un équilibre calcique négatif, traduit par un niveau de calcium intracellulaire élevé en présence d'un niveau de calcium extracellulaire faible (52,216-218). Ceci étant caractéristique de la forme d'hypertension sensible au sel avec un niveau de rénine faible (217). Donc, notre groupe s'est intéressé aux gènes ayant un rôle potentiel dans l'hypertension artérielle et dont leur expression peut être modulée par le calcium extracellulaire. Rappelons que la glande parathyroïde est une glande clé dans le contrôle de l'homéostasie calcique via l'hormone PTH.

Pour la recherche de gènes anormalement régulés par le calcium dans l'hypertension, nous avons construit une librairie de cDNA à partir de parathyroïdes de rats SHR. L'utilisation de techniques telles la technologie RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*), l'hybridation de type Northern ainsi que les criblages subséquents de la librairie de cDNA ont permis d'obtenir au total sept séquences chevauchantes. Ceci nous a

permis de reconstituer une séquence de cDNA de 1100pb qui n'a aucune homologie avec les séquences de gènes de différentes banques (e.g. GenBank) (annexe 1, p.XI).

Une expression accrue du mRNA de notre gène est détectée par la technique d'hybridation de type Northern dans des cellules de parathyroïde de rats SHR en présence d'une concentration faible de calcium en comparaison avec les cellules témoin de WKY dans les mêmes conditions. Ce pourquoi il a été nommé le *Hypertension-related-Calcium-Regulated Gene* (HCaRG). L'expression de HCaRG peut être modulée également par des agonistes des voies de transduction des signaux intracellulaires. En effet, la PMA (Phorbol 12-myristate 13-acétate, active la PKC) et la dexaméthasone tous deux stimulent l'expression de HCaRG en présence d'une concentration physiologique de calcium, donc miment les effets d'une incubation avec une concentration de calcium faible. La séquence en acides aminés de HCaRG déduite indique un cadre de lecture de 224 codons, prédisant une protéine d'environ 23kDa.

Une analyse de sa structure suggère un contenu de 67% en hélice  $\alpha$  et une homologie de 8 des 12 acides aminés les plus conservés dans le motif *EF-hand*. Rappelons que le motif *EF-hand* est un motif de liaison du calcium qui est présent dans d'autres protéines connues pour lier le calcium dont la calmoduline (3,125). Par ailleurs, la structure du motif *EF-hand* favorise la dimérisation de ceux-ci. Alors que HCaRG ne possède qu'un motif *EF-hand* dans sa structure, il est possible que son contenu riche en hélice  $\alpha$  favorise des interactions de type *coiled-coil* donc la dimérisation de HCaRG.

Des études d'expression de HCaRG ont été effectuées par hybridation *in situ* en utilisant des sondes de RNA (sens et anti-sens) radioactives de HCaRG (annexe 1 p.XII). Un signal positif a été détecté dans la glande parathyroïde, dans la médulla et le cortex surrénalien et dans la partie tubulaire du cortex rénal des rats SHR en comparaison avec un signal faible observé dans ces organes chez les rats WKY. Aucun signal n'a été observé dans les glomérules rénaux, dans le foie ainsi que dans les ventricules cardiaques tant chez les SHR que chez les WKY. Nos résultats préliminaires nous indiquent que HCaRG est exprimé dans plusieurs organes cibles de l'hypertension. Du fait que la parathyroïde est

une glande clé dans l'homéostasie calcique, qu'elle pourrait être impliquée dans les anomalies du métabolisme du calcium observées dans l'hypertension expérimentale et humaine.

Le but de mon travail était de cloner et de caractériser HCaRG humain. J'ai également effectué le profil de la distribution de l'expression du mRNA de HCaRG dans différents tissus. Par ailleurs, en collaboration avec mon groupe, nous avons initié des études fonctionnelles de HCaRG afin de caractériser sa fonction biologique. Finalement, la localisation chromosomique ainsi que des analyses préliminaires d'association de HCaRG avec plusieurs phénotypes intermédiaires de l'hypertension ont également été effectués.

## II-MATÉRIEL & MÉTHODES

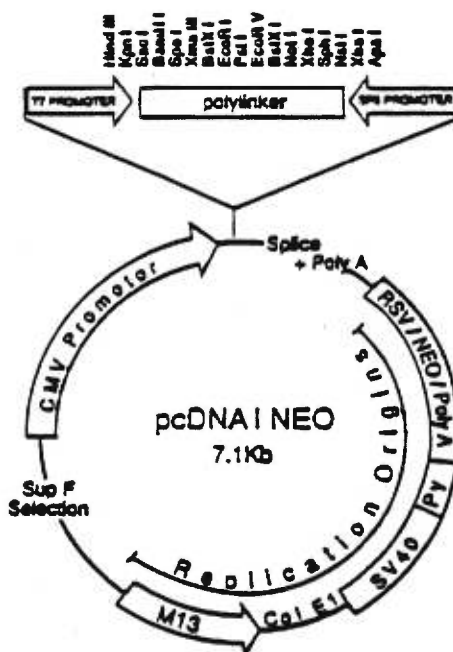
### 1. Études fonctionnelles de HCaRG de rat

#### 1.1 Culture cellulaire

Des cellules COS-7 (ATCC Rockville, Maryland, cellules épithéliales de rein de singe) sont maintenues en culture dans du DMEM (Dulbecco's Modified Essential Medium, GIBCO BRL, Burlington, Ontario) additionné de 10% sérum de veau foetal (Wisent inc., St-Bruno, Québec) et 2% de pénicilline et de streptomycine (Sigma, Oakville, Ontario).

#### 1.2 Préparation du plasmide et de l'insert

Nous avons choisi le plasmide pcDNA1 NEO (Invitrogen, Carlsbad, Californie, É.U.) pour nos études de transfection transitoire dans les cellules eucaryotes. Ce plasmide de 7,1kb de longueur, contient le promoteur de CMV, l'origine de réplication de SV40 et un site de polyclonage.



**Figure 1:** Structure du plasmide pcDNA1neoI

Le fragment inséré de 850pb correspond au cadre de lecture complet du gène de HCaRG de rat. Celui-ci est obtenu par PCR en utilisant du DNA génomique de rat SHR comme matrice et les amorces suivantes: CCCGGACGTCGAGGTATGAA et GGAAGTCTGAGGCTGGAGAA (95°C/1min;60°C/1min;72°C/3min; 30 cycles). Le produit de PCR est analysé par électrophorèse sur gel d'agarose (Tris acétate 40mM, EDTA 2mM). Le fragment unique de 850pb est extrait de l'agarose à l'aide de phénol-chloroforme (290) et inséré dans le plasmide pcDNAneoI.

Le plasmide est linéarisé par digestion avec l'enzyme EcoRV (GIBCO BRL, Burlington, Ontario), le fragment de DNA de HCaRG de rat de 850pb a été inséré par la technique des bouts francs avec la T4 DNA ligase (GIBCO BRL, Burlington, Ontario). Des bactéries *Escherichia coli* compétentes, DH5 $\alpha$  (GIBCO BRL, Burlington, Ontario) sont transformées avec le plasmide et les bactéries recombinantes sont sélectionnées par PCR. Cette étape permet la multiplication du plasmide.

### 1.3 Transfection pour les études des transporteurs d'ions

Quarante-huit heures avant la transfection, les cellules COS-7 sont inoculées dans 8 plaques à culture cellulaire de 24 puits (Nunc Inc. Naperville, Illinois, É.U.) à une densité de  $1,4 \times 10^5$  cellules/puit dans le milieu décrit précédemment. Les cellules sont maintenues à 37°C avec 5% CO<sub>2</sub> pour 48 heures. Le milieu est changé après 24 heures d'attachement, de une à deux heures avant la transfection et 24 heures après la transfection. Quatre conditions sont testées à raison de deux plaques par condition:

- 1- COS-7 sans traitement (témoin)
- 2- COS-7 soumises au traitement de transfection sans DNA (*mock*)
- 3- COS-7 transfectées avec le plasmide pcDNAneoI seul
- 4- COS-7 transfectées avec le plasmide pcDNAneoI contenant HCaRG



L'efficacité de la transfection est déterminée par la mesure de l'activité  $\beta$ -galactosidase assurée par le plasmide pCMV $\beta$  (Clontech, Palo Alto, Californie, É.U.). Pour confirmer que le plasmide pcDNAneoI contenant HCaRG est fonctionnel, c.-à-d. est capable de produire le mRNA de HCaRG, les RNA totaux sont extraits des cellules et sont soumis à une réaction de RT-PCR.

On ajoute à 30 $\mu$ L de CaCl<sub>2</sub> (0,25mM) soit trois  $\mu$ g de DNA (plasmide pcDNAneoI seul ou plasmide pcDNAneoI contenant HCaRG) soit aucun DNA (*mock*) qu'on incube à la température ambiante de 30 à 60 minutes. Ces mélanges sont ensuite ajoutés, goutte à goutte, à un volume équivalent d'une solution de HeBS 2X pH 7,2 (Hepes 38mM, NaCl 270mM, KCl 1mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,8mM, dextrose 10mM) et laissés à la température ambiante de 5 à 10 minutes. Les complexes DNA-CaCl<sub>2</sub> ainsi formés sont ensuite ajoutés aux cellules. Les cellules sont incubées à 37°C avec 5% CO<sub>2</sub> pour 48 heures.

La procédure est la même pour le témoin  $\beta$ -galactosidase que l'on ajoute à raison 240ng de plasmide pCMV $\beta$  aux mélanges de CaCl<sub>2</sub>-pcDNAneoI seul ou CaCl<sub>2</sub>-pcDNAneoI contenant HCaRG. La suite de la procédure demeure la même.

#### **1.4 Mesure de l'efficacité de la transfection (activité $\beta$ -galactosidase)**

L'efficacité de la transfection a été déterminée en mesurant l'activité de la  $\beta$ -galactosidase co-transfectée. Cette activité est mesurée par une technique histochimique. Après 48 heures de transfection, les cellules sont lavées deux fois avec du PBS 1X (NaCl 137mM, KCl 2,7mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O 4,3mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,4mM, pH 7,2). Les cellules sont ensuite fixées avec de la glutéraldéhyde 0,05% pour 10 minutes. Les cellules sont de nouveau rincées avec du PBS 1X trois fois (premier lavage rapide, second lavage laissé pour 10 minutes, troisième lavage rapide). Une quantité suffisante de solution de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -d-galactoside (X-gal, Sigma, Oakville, Ontario) fraîchement préparée (X-gal 2,4mM, K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 5mM, K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>•3H<sub>2</sub>O 5mM, MgCl<sub>2</sub> 2mM dans PBS 1X) est

ajoutée pour couvrir les cellules (500 $\mu$ L par puit). La plaque est incubée à 37°C avec 5% CO<sub>2</sub> pour 12 heures. L'efficacité de transfection est évaluée par le nombre de cellules positives (bleues) par rapport au nombre total de cellules.

### 1.5 Vérification de l'expression de HCaRG

On ajoute aux cellules 1mL de solution D (guanidium thiocyanate 4M, sodium citrate 25mM, N-Lauroyl-Sarcosine 1%,  $\beta$ -mercaptoéthanol 0,1M). Les cellules de chaque puit sont transférées dans un tube de 11,5mL en polypropylène (Sarsted Inc., St-Léonard, Québec) et un autre trois mL de solution D sont ajoutés à chaque tube. L'extraction du RNA des cellules est effectuée selon le protocole usuel de guanidium thiocyanate-phénol-chloroforme (290).

Pour vérifier si les cellules transfectées avec le plasmide pcDNAneoI contenant HCaRG expriment HCaRG, nous avons soumis les échantillons de RNA à une réaction de RT-PCR. Pour chaque échantillon, deux réactions ont été effectuées, l'une avec l'enzyme MMLV-RT, *Moloney Murine Leukemia Virus-Reverse Transcriptase* (GIBCO BRL, Burlington, Ontario) et l'autre en l'absence de l'enzyme. Ces derniers échantillons serviront de témoin positif pour la présence de DNA contaminant. Chaque réaction a été effectuée avec deux  $\mu$ g de RNA total à 37°C pour 60 minutes suivie d'une incubation à 95°C pour cinq minutes. Quatre  $\mu$ L des produits de RT ont été transférés dans une réaction de PCR (95°C/1min;60°C/2min;72°C/3min) pour 20 cycles. Les réactions de PCR ont été faites en présence de dCTP-<sup>32</sup>P (Amersham Corp., Oakville, Ontario). Les séquences des amorces sens et anti-sens sont GGATCTAATTGGAGATTTGG et TCTGCCATCTCCTTAAGG respectivement.

### 1.6 Étude du cotransporteur Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>2Cl<sup>-</sup> (expérience type)

Nos études ont porté principalement sur la régulation du cotransporteur Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup> soumis à cinq conditions d'osmolarités différentes. Après la transfection des cellules décrite précédemment, le milieu de chacun des puits est retiré et les cellules sont lavées

deux fois avec un tampon A (NaCl 150mM, Hepes-Tris 10mM pH 7,4). Le tampon B contenant du NaCl 140mM, KCl 5mM, CaCl<sub>2</sub> 1mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM, glucose 5mM, Hepes-Tris 20mM pH 7,4 est ajouté aux cellules pour 30 minutes à 37°C. Le tampon B est alors retiré et remplacé par, soit du tampon B contenant 1mM de ouabaïne (Sigma, Oakville, Ontario) (plaques 1, 3, 5 et 7) soit du tampon B contenant 1mM de ouabaïne et 20mM de bumétanide (Sigma, Oakville, Ontario) (plaques 2, 4, 6 et 8). Les cellules sont de nouveau incubées à 37°C pour cinq minutes. L'osmolarité du milieu d'incubation est par la suite augmentée en ajoutant des quantités croissantes de sucrose. Deux  $\mu\text{Ci/mL}$  de <sup>86</sup>Rubidium (Amersham Corp. Oakville, Ontario) sont ajoutés comme analogue radioactif du potassium (K<sup>+</sup>). On obtient ainsi les cinq conditions suivantes:

1	200 mosmoles (20mM NaCl)	}	hyposmotique
2	320 mosmoles	}	isoosmotique
3	370 mosmoles (100mM sucrose)	}	hyperosmotique
4	395 mosmoles (150mM sucrose)		
5	470 mosmoles (300mM sucrose)		

Les plaques sont incubées à 37°C pour 15 minutes puis transférées sur glace. Les cellules sont lavées quatre fois avec le tampon W (MgCl<sub>2</sub> 100mM, Hepes-Tris 10mM pH 7,4) froid. Un mL d'une solution de SDS/EDTA (10%/4mM) est finalement ajouté aux cellules. Les puits supplémentaires servent au dosage des protéines. Les extraits cellulaires sont transférés dans des vials à scintillation (un vial par puit) auxquels on ajoute cinq mL de liquide à scintillation (BCS, Amersham Corp. Oakville, Ontario) pour le comptage à scintillation liquide bêta (Canberra Packard, Montréal, Québec).

L'activité du cotransporteur Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup> est calculée comme étant la composante résistante à la ouabaïne (C<sub>29</sub>H<sub>44</sub>O<sub>12</sub>•8H<sub>2</sub>O) mais sensible à la bumétanide (C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S) de l'influx de <sup>86</sup>Rb (K<sup>+</sup>). La perméabilité passive de <sup>86</sup>Rb est calculée comme étant la composante résistante à la fois à la ouabaïne et à la bumétanide.

### 1.7 Étude de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{H}^+$

Nous avons étudié l'activité de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  dans les cellules COS-7 (méthodes sect. 1.7, p.61) en utilisant le  $^{22}\text{Na}$  comme traceur de sodium. Les cellules sont lavées comme à la sect. 1.6. Cinq cent  $\mu\text{L}$  de tampon B sont ajoutés aux cellules et elles sont ensuite incubées à  $37^\circ\text{C}$  pour 45 minutes. Par la suite, le tampon B est aspiré et est remplacé par 250 $\mu\text{L}$  de tampon C ( $\text{NaCl}$  15mM,  $\text{C}_5\text{H}_{14}\text{NO}\cdot\text{Cl}$  125mM,  $\text{KCl}$  5mM,  $\text{MgCl}_2$  1mM,  $\text{CaCl}_2$  1mM, Hepes-Tris 20mM pH 7,4, D-glucose 5mM) contenant de la ouabaïne (1mM) et de la bumétanide (20mM) et 8 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$  de  $^{22}\text{Na}$  (Amersham Corp. Oakville, Ontario). La ouabaïne et la bumétanide permettent d'inhiber l'entrée de sodium par la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$  et par le cotransporteur  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  respectivement. De plus, un inhibiteur spécifique de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , le 5-(N-Ethyl-N-Isopropyl)-Amiloride (EIPA, Sigma, Oakville, Ontario) est ajouté à la moitié des plaques. Les cellules sont incubées pour 10 minutes à  $37^\circ\text{C}$ . Elles sont ensuite lavées et récoltées selon la technique décrite à la section 1.6. L'activité de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  est calculée comme étant la composante de l'influx de  $^{22}\text{Na}$  sensible à l'EIPA mais résistante à la ouabaïne et à la bumétanide.

### 1.8 Étude de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$

L'activité de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  est régulée par les concentrations de calcium et de sodium intra- et extracellulaire. Ainsi, il est activé dans le sens "entrée" de calcium lorsque la concentration extracellulaire de sodium est faible et la concentration intracellulaire de sodium est élevée. Quarante huit heures après le protocole de transfection (méthodes, sect. 1.3, p.57), les cellules COS-7 sont d'abord lavées deux fois avec deux mL de tampon A (sect. 1.6). Elles sont ensuite incubées pour 60 minutes à  $37^\circ\text{C}$  en présence de 250 $\mu\text{L}$  de tampon B (sect. 1.6) contenant ou non 1mM de ouabaïne. La ouabaïne inhibe l'activité de la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$  et favorise donc l'augmentation de la concentration de sodium intracellulaire. Par la suite, 250 $\mu\text{L}$  de tampon B<sup>2</sup> ( $\text{NaCl}$  140mM,  $\text{KCl}$  5mM,  $\text{CaCl}_2$  0,1mM,  $\text{MgCl}_2$  1mM, glucose 5mM, Hepes-Tris 20mM pH 7,4) contenant 3 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$  de  $^{45}\text{Ca}$  (Amersham Corp. Oakville, Ontario) sont ajoutés aux plaques 1, 3, 5, 7 alors que

250 $\mu$ L de tampon B<sup>2</sup> contenant 3 $\mu$ Ci/mL de <sup>45</sup>Ca et dont les 140mM de NaCl sont substitués par 140mM de Chlorure de choline sont ajoutés aux plaques 2, 4, 6 et 8. Les cellules sont incubées à 37°C pour cinq minutes et sont ensuite lavées et récoltées selon le protocole décrit à la section 1.6. L'activité de l'échangeur est calculée comme étant la différence entre l'influx de <sup>45</sup>Ca dans le mode activé et dans le mode basal. Le mode basal correspond à la différence de l'influx de <sup>45</sup>Ca entre les cellules mises en présence de chlorure de choline et les cellules mises en présence de NaCl. Le mode activé correspond à la différence de l'influx de <sup>45</sup>Ca entre les cellules mises en présence de chlorure de choline et de ouabaïne et les cellules mises en présence de NaCl et de ouabaïne.

## **1.9 Dosage des protéines**

Le dosage des protéines se fait en quadruplicata selon la méthode modifiée de Lowry (291), à l'aide d'une courbe étalon préparée dans les mêmes conditions en utilisant l'albumine sérique de boeuf (BSA, Sigma, Oakville, Ontario).

## **2. Clonage et séquençage de HCaRG humain**

### **2.1 Clonage de HCaRG humain**

Nous avons retrouvé dans le GenBank deux courtes séquences d'acides nucléiques humaines qui démontrent une bonne homologie avec la séquence de HCaRG du rat. Celles-ci origine d'une librairie de cDNA de cerveau d'enfant (#34554, 466pb et #36018, 516pb). L'homologie est plus forte dans la région 5' de la séquence de HCaRG de rat.

Nous avons donc utilisé comme paire d'amorces nucléotidiques, une amorce spécifique à la séquence humaine homologue à la séquence de HCaRG du rat en 3' dans l'orientation anti-sens, TGGCTGATCAAAGAGGAAGC et une amorce provenant de la séquence de HCaRG du rat en 5' dans l'orientation sens, TCTGCCATCTCCTTAAGG. En utilisant deux  $\mu$ g de DNA génomique extrait de lymphocytes d'humains comme matrice, nous avons procédé à l'amplification de HCaRG humain par la technique de PCR (95°C/1min;60°C/2min;72°C/3min, 35 cycles). L'analyse subséquente du produit de PCR

par électrophorèse sur gel de 1% agarose (Tris acétate 40mM, EDTA 2mM) nous démontre la présence d'une bande unique d'environ 900pb. Cette bande a été isolée du gel par la technique usuelle de phénol-chloroforme tel que décrit (290) et sous-cloné dans le plasmide pSP72 (Promega, Madison, Wisconsin, É.U.) linéarisé avec l'enzyme SmaI (GIBCO BRL, Burlington, Ontario) et le fragment de HCaRG humain est inséré par la technique de bouts francs avec la T4 DNA ligase. Des bactéries *Escherichia coli* compétentes DH5 $\alpha$  sont transformées avec le plasmide et les bactéries recombinantes sont sélectionnées par PCR. Cette étape permet la multiplication du plasmide.

## 2.2 Séquençage de HCaRG humain

Nous avons séquençé partiellement (505pb) le DNA double brin à l'aide d'une DNA polymérase, la Sequenase (version 2.0, United States Biochemical, Cleveland, Ohio, É.U.). La technique de séquençage utilisée est celle des di-désoxynucléotides de Sanger. Cinq  $\mu$ g du plasmide contenant HCaRG humain sont dénaturés et hybridés avec les amorces T7 ou SP6. Les réactions d'élongation sont faites en présence de ddATP-<sup>35</sup>S (Amersham Corp. Oakville, Ontario). Les échantillons sont analysés sur un gel de polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE) (acrylamide/bis-acrylamide 6%, urée 7M). Suite à l'électrophorèse, le gel est séché sous vide et exposé dans une cassette phosphosensible. Les produits radioactifs sont analysés à l'aide d'un PhosphorImager (Molecular Dynamics, Sunnyvale, Californie, É.U.). La comparaison et le calcul de l'homologie des séquences en acides nucléiques et en acides aminés de HCaRG d'humain et de rat a été effectuée à l'aide du logiciel Geneworks 2.45. La recherche de motifs (e.g. motif apparenté au *EF-hand*) dans la séquence de HCaRG humain a également été effectuée à l'aide du logiciel Geneworks 2.45.

## 3. Études d'expression de HCaRG chez l'humain

### 3.1 RT-PCR

Les RNA totaux ont été extraits de différents organes humains normaux tels: colon, iléon, estomac, surrénales, parathyroïdes, pancréas et sein et de quelques tissus

pathologiques humains tels: des parathyroïdes de patients atteints d'hyperparathyroïdie primaire ou secondaire, un cancer du colon, un cancer du sein, une surrenale d'un patient atteint d'un phéochromocytome ainsi que des lymphocytes de patients hypertendus. L'expression de HCaRG dans ces tissus a été évaluée par la technique de RT-PCR. Deux µg de RNA total a été soumis à une réaction de transcriptase inverse avec l'enzyme MMLV-RT à 37°C pour 60 minutes. Quatre µL ont été transférés dans une réaction de PCR (95°C/1min;64°C/2min;72°C/3min) de 30 cycles. Les produits de PCR ont été rendus radioactifs en ajoutant du dCTP-<sup>32</sup>P. Les séquences des amorces sens et anti-sens sont GGATCTAATTGGAGATTTGG et TCTGCCATCTCCTTAAGG respectivement.

Les produits de PCR ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5% (Tris acétate 40mM, EDTA 2mM) et transférés sur une membrane de nylon (Hybond N+, Amersham Corp. Oakville, Ontario) avec un appareil à buvardage nommé Vacugene (LKB Bromma, Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, Québec) avec la solution de transfert: NaOH 0,4M, NaCl 1M. Les membranes ont été exposées dans une cassette phosphosensible. Les produits radioactifs sont analysés à l'aide du PhosphorImager.

### **3.2 Expression de la protéine HCaRG in vitro**

Une trousse de transcription couplée à la traduction *in vitro* à l'aide de réticulocytes de lapin (Promega, Madison, Wisconsin, É.U.) a été utilisée pour les analyses d'expression de la protéine HCaRG à partir du plasmide pSP72 contenant la séquence de cDNA du cadre de lecture complet de HCaRG de rat. Cinq cent ng de plasmide contenant HCaRG ou 500ng de plasmide seul, en guise de témoin négatif, sont soumis au protocole de transcription-traduction avec l'enzyme T7 RNA polymérase et de la <sup>35</sup>S-méthionine (Amersham Corp. Oakville, Ontario) pour 60 minutes à 30°C. Comme témoin positif, du DNA plasmidique contenant le gène de la luciférase, fourni dans la trousse, est soumis au même protocole. Suite à l'incubation à 30°C, les échantillons sont entreposés à -20°C jusqu'à l'analyse.

L'analyse des échantillons est faite sur un gel SDS-PAGE 15%. Vingt uL de tampon d'échantillon contenant ou non 0,72M de  $\beta$ -mercaptoéthanol sont ajoutés à cinq uL de chaque réaction de transcription-traduction. L'omission du  $\beta$ -mercaptoéthanol dans le tampon d'échantillon permet de voir si la protéine d'intérêt est capable de se dimériser. Les échantillons sont alors chauffés à 100°C pour 10 minutes, refroidis pour cinq minutes et déposés sur un gel SDS-PAGE (Tris 0,25M, Glycine 1,9M, SDS 1%). Suite à l'électrophorèse, le gel est séché sous vide et exposé dans une cassette phosphosensible. Les produits radioactifs sont analysés à l'aide du PhosphorImager.

#### **4. Localisation chromosomique de HCaRG humain**

##### **4.1 Carte de restriction**

La carte de restriction de HCaRG a été effectuée avec le DNA génomique extrait de foie des rats SHR et BN.*lx*. Dix ug de DNA génomique de chaque souche de rats ont été digérés à 37°C pour 3h30min avec BamH I (5U/ $\mu$ L), Bgl II (5U/ $\mu$ L), EcoRI (1U/ $\mu$ L), Hind III (5U/ $\mu$ L), Kpn I (1U/ $\mu$ L), Pst I (1U/ $\mu$ L) (GIBCO BRL, Burlington, Ontario). Chaque réaction de digestion est déposée en entier sur un gel de 1% d'agarose et soumise à une électrophorèse (Tris acétate 40mM, EDTA 2mM). Les DNA sont alors transférés sur une membrane de nylon avec l'appareil à buvardage Vacugene et la solution de transfert: NaOH 0,4M, NaCl 1M. La membrane est par la suite dépurinée pendant 12min30sec dans une solution de HCl 0,25N et entreposée dans un sac scellé.

Pour l'hybridation de la membrane, 350ng du plasmide pSP72 contenant le cadre de lecture complet de HCaRG de rat sont linéarisés avec l'enzyme Hind III et sont utilisés comme sonde pour l'hybridation de la membrane. La sonde est marquée par PCR avec du dCTP-<sup>32</sup>P (94°C/1min;60°C/2min;72°C/3min) pour huit cycles. La préhybridation de la membrane est faite dans un tampon (SDS 1%, NaCl 1M, Sulfate de Dextran 10%) pour trois heures à 65°C. Cette étape permet de bloquer tous les sites non-spécifiques favorisant une hybridation spécifique du gène d'intérêt avec la sonde. Avant l'ajout de la sonde à la membrane, du DNA de sperme de saumon (ssDNA) est mélangé à la sonde HCaRG et tous



les deux sont dénaturés à 100°C pour 10 min. Le mélange radioactif est ajouté à la membrane à raison de  $2 \times 10^6$  cpm de sonde radioactive par mL de tampon d'hybridation. L'hybridation se déroule à 65°C pour environ 14 à 16 heures. La membrane est lavée deux fois à 20°C dans un tampon contenant SDS 1%, NaCl 0,3M et  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  30mM, pH7,0 pour 10 minutes chacun et deux autres fois à 65°C dans un tampon contenant SDS 0,1%, NaCl 15mM et  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1,5mM, pH7,0 pour 20 minutes chacun. La membrane est exposée dans une cassette phosphosensible et analysée à l'aide du PhosphorImager.

#### **4.2 Génotypage des rats recombinants consanguins (RIS)**

La carte de restriction de HCaRG a permis d'identifier un RFLP de 10Kpb avec l'enzyme de restriction Bgl II entre les progéniteurs SHR et BN.*lx*. Nous avons donc procédé au génotypage des souches recombinantes homozygotes (RIS) issues de croisements entre les lignées consanguines SHR et BN.*lx*. Dix  $\mu\text{g}$  de DNA génomique d'un rat provenant de chaque souche sont digérés avec l'enzyme Bgl II (5U/ $\mu\text{L}$ ). La suite du protocole est la même que décrite précédemment.

Le profil de distribution de ce polymorphisme de restriction a été comparé avec celui de 456 marqueurs polymorphiques, biochimiques, morphologiques et immunologiques distribués sur tous les chromosomes de chaque souche RIS à l'aide de la carte [www.ratmap](http://ratmap.gen.gu.se) disponible sur le site internet, <http://ratmap.gen.gu.se>. Les détails de cette carte ont été publiés dans les références 289 et 292. Cette analyse a permis de déterminer la localisation chromosomique de HCaRG de rat. L'association génétique de HCaRG avec plusieurs phénotypes intermédiaires de l'hypertension a été accomplie grâce à la collaboration de plusieurs membres de notre groupe (Pavel Hamet, Lucie Richard, Pierre Dumas, Yulin Sun à Montréal, des professeurs Jaroslav Kunes et Michael Pravenec de l'Académie des sciences Tchèque et de Vladimir Kren du département de biologie de l'Université de Prague, Prague, République Tchèque) qui ont déterminé le profil de distribution de ces phénotypes dans les 33 souches de RIS.

### III-RÉSULTATS

#### 1. Études de HCaRG de rat

##### 1.1 Étude du cotransporteur $\text{Na}^+\text{K}^+2\text{Cl}^-$ dans des cellules transfectées avec HCaRG

Le rôle principal du cotransporteur  $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$  est la régulation de la concentration intracellulaire des ions monovalents, du volume cellulaire et des fonction associées telles la prolifération et la croissance cellulaire (238,239,242,244). En effet, dans le cas d'une diminution du volume intracellulaire par un choc hyperosmotique, le cotransporteur est activé et permet l'entrée simultanée de sodium, de potassium et de chlore. L'influx de sel implique aussi une entrée d'eau, donc le retour à l'osmolarité intracellulaire normale (238,239). L'inverse se produit dans le cas d'une augmentation du volume cellulaire par un choc hypoosmotique (244). L'activité du cotransporteur est inhibé par un diurétique spécifique agissant sur un segment de l'anse de Henle, la bumétanide. Le cotransporteur est responsable, dans cette région du néphron, du mouvement transcellulaire du sel et de l'eau. En plus du cotransporteur, un autre transporteur d'ions membranaire est activé lors du changement du volume cellulaire, la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase (293). Cette pompe favorise la sortie du sodium et l'entrée de potassium. L'activité de la pompe peut être inhibée par un glycoside cardiaque, la ouabaïne (293). Donc, il est important lorsque l'on veut déterminer l'activité du cotransporteur seulement de tenir compte de l'influx de potassium par la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase.

Le cotransporteur est exprimé dans plusieurs types cellulaires e.g. les cellules épithéliales rénales, les cellules du muscle lisse vasculaire, les cellules endothéliales, les fibroblastes, les ostéoblastes pour ne nommer que ceux-ci (239-241). Pour nos études, nous avons choisi les cellules épithéliales de rein de singe (COS-7) qui sont transformées par le virus SV-40 (294). Les cellules COS-7 sont très couramment utilisées pour l'expression transitoire de gènes car ces cellules sont très perméables au DNA exogène. Ces cellules permettent une expression élevée du DNA exogène pourvu que le vecteur rapporteur dans

lequel le gène d'intérêt est cloné contient l'origine de réplication de SV-40. De plus, nos expériences ont démontré qu'elles n'expriment pas HCaRG (figure 2).

Dans nos expériences préliminaires, nous avons établi que les cellules COS-7 à l'état basal expriment le cotransporteur  $\text{Na}^+\text{K}^+2\text{Cl}^-$ , la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase et l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (tableau II). Nous n'avons noté aucune différence de l'activité de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  ni de l'influx de calcium entre les cellules transfectées avec le plasmide seul et celles transfectées avec le plasmide contenant HCaRG. Par ailleurs, l'activité de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  n'est pas différent pour les trois conditions soit les cellules non transfectées, les cellules transfectées avec le plasmide seul et les cellules transfectées avec le plasmide contenant HCaRG. En revanche, la perméabilité passive pour le  $\text{Na}^+$  est augmenté de 34% pour les cellules transfectées avec le plasmide pcDNAneoI contenant HCaRG comparativement aux cellules transfectées avec le plasmide seul ( $p < 0,001$ ). Étant donné que nos résultats nous indiquent une modulation possible du sodium par HCaRG, il a été dans notre intérêt d'étudier un autre transporteur impliqué dans la régulation de la concentration intracellulaire et extracellulaire des ions sodium, le cotransporteur  $\text{Na}^+/\text{K}^+2\text{Cl}^-$ . Une des façon d'étudier l'activité de ce dernier est de soumettre les cellules à des changements d'osmolarité. L'activité du cotransporteur est connue pour être modulée par les changements du volume cellulaire (242-244). Les osmolarités choisies pour étudier le cotransporteur vont d'une concentration hypoosmotique (200mosm) à une concentration hyperosmotique (470mosm). L'osmolarité du milieu d'incubation est ajustée en ajoutant du sucrose au milieu d'incubation (méthodes sect. 1.6, p.59). Quarante-huit heures après la transfection transitoire des cellules COS-7 (méthodes sect. 1.3, p.57), les cellules sont soumises au protocole d'étude du cotransporteur (méthodes sect. 1.6, p.59). Rappelons que l'activité du cotransporteur est calculée comme étant la composante de l'influx d'un analogue radioactif du  $\text{K}^+$ , le  $^{86}\text{Rb}$ , sensible à la bumétanide et résistante à la ouabaïne. L'activité du cotransporteur est exprimée par l'influx de la quantité de  $^{86}\text{Rb}$  ( $\text{K}^+$ ) (nmole) pendant 15 minutes corrigé par la quantité de protéines (mg) ( $\text{nmole} \cdot \text{mg de protéine}^{-1} \cdot 15 \text{ min}^{-1}$ )  $\pm$  écart type.

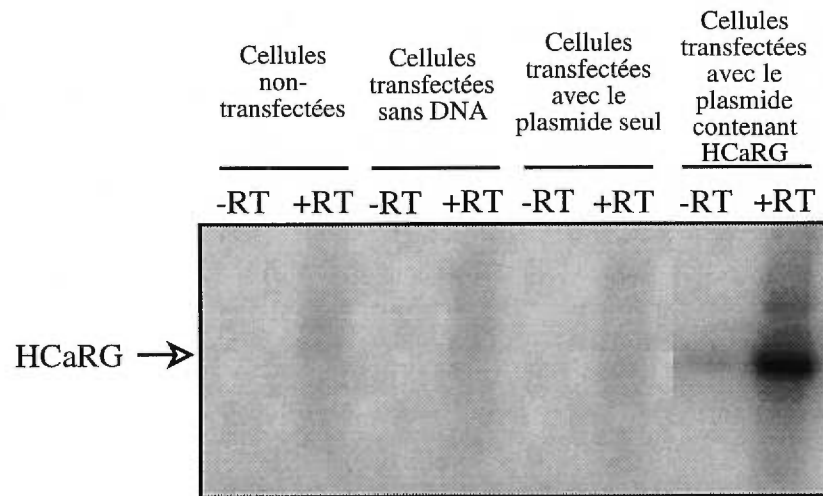
**Effet de la surexpression de HCaRG dans des cellules eucaryotes sur les  
flux de sodium et de calcium.**

	Cellules non transfectées	Cellules transfectées avec le plasmide pcDNAneoI seul	Cellules transfectées avec le plasmide pcDNAneoI contenant HCaRG
<b>Influx de <math>^{22}\text{Na}</math></b>			
(nmole.mg prot <sup>-1</sup> .10min <sup>-1</sup> )			
Échangeur Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup>	2,94 ± 0,68	2,81 ± 0,53	3,52 ± 0,53
Canaux/perméabilité passive	8,06 ± 0,68	8,23 ± 0,23	11,02 ± 0,42*
<b>Influx de <math>^{45}\text{Ca}</math></b>			
(pmole.mg prot <sup>-1</sup> .15min <sup>-1</sup> )			
Activité basale	128 ± 13	204 ± 55	244 ± 25
Échangeur Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup>	215 ± 41	277 ± 29	254 ± 44

\*p<0,001

**Tableau II**

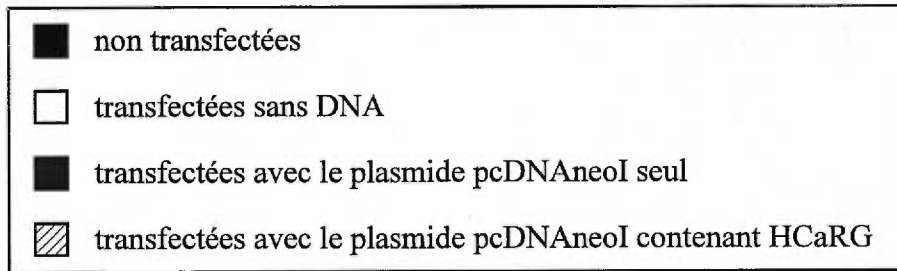
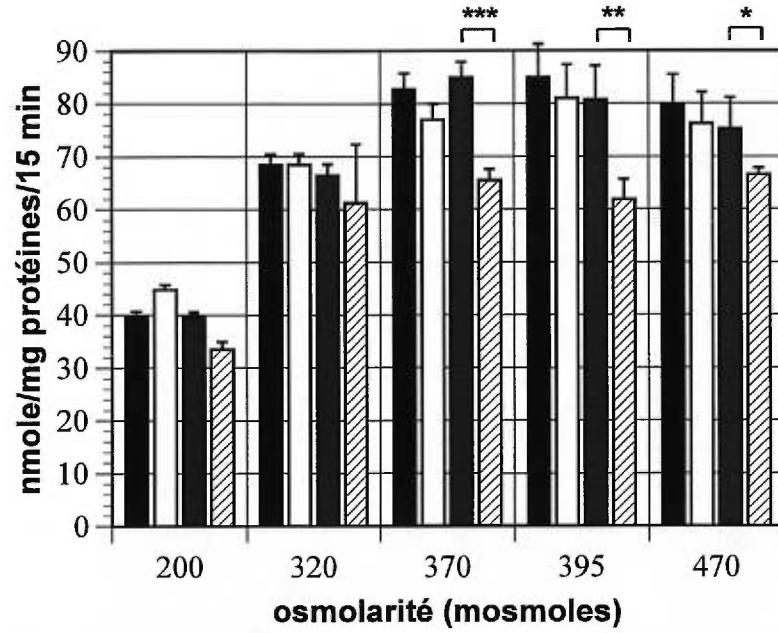
**Figure 2:** Expression de HCaRG par RT-PCR dans les cellules COS-7 pour les différentes conditions de transfection. Pour chaque condition, deux réactions de RT-PCR sont effectuées, l'une avec l'enzyme MMLV-RT et l'autre sans enzyme. Un produit de PCR de 364pb correspond à la taille du fragment amplifié de HCaRG.



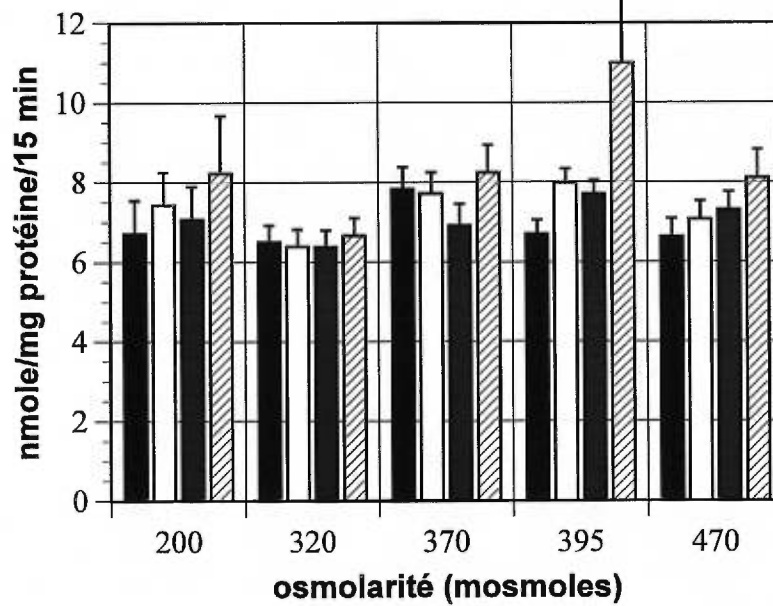
**Figure 3a:** Activité du cotransporteur  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  des cellules COS-7 mises en présence d'osmolarité croissante. L'influx de  $^{86}\text{Rb}$  est calculé comme étant la composante résistante à la ouabaïne et sensible à la bumétanide. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$

**Figure 3b:** Perméabilité passive de l'influx de  $^{86}\text{Rb}$  dans les cellules COS-7 mises en présence d'osmolarité croissante est calculée comme étant la composante insensible à la ouabaïne et à la bumétanide.

a



b





L'étude du cotransporteur a été répétée plusieurs fois, j'illustre ici une expérience type. Lorsque les cellules sont incubées dans un milieu hypoosmotique (200mosm), le cotransporteur est actif dans le mode "entré" et favorise l'augmentation du volume cellulaire afin de retrouver l'équilibre osmotique (figure 3a). En présence d'un milieu isoosmotique (320mosm), il y a augmentation de l'activité du cotransporteur par rapport à 200mosm. Ceci confirme que l'activité du cotransporteur est modulée par une diminution du volume cellulaire. En augmentant l'osmolarité du milieu d'incubation de 320 à 370 mosm, l'activité du cotransporteur est augmentée encore plus et ce, plus particulièrement pour les cellules non transfectées (de  $68,4 \pm 2,1$  à  $82,7 \pm 3,0$  nmole.mg prot<sup>-1</sup>.15min<sup>-1</sup>), transfectées sans plasmide (de  $68,5 \pm 6,0$  à  $76,9 \pm 11,4$  nmole.mg prot<sup>-1</sup>.15min<sup>-1</sup>) et transfectées avec le plasmide pcDNAneoI seul (de  $66,5 \pm 6,5$  à  $84,9 \pm 6,3$  nmole.mg prot<sup>-1</sup>.15min<sup>-1</sup>). Ceci démontre que le protocole de transfection ne modifie pas l'activité du cotransporteur Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup>. Cependant, il semble avoir une inhibition spécifique de la stimulation du cotransporteur dans les cellules transfectées avec le plasmide pcDNAneoI contenant HCaRG où l'activité ne passe que de  $61,2 \pm 11,1$  à  $65,5 \pm 2,1$  nmole.mg prot<sup>-1</sup>.15min<sup>-1</sup>. En augmentant encore l'osmolarité à 395mosm, l'activité demeure presque inchangée pour les conditions non transfectées (de  $82,7 \pm 3,0$  à  $84,9 \pm 6,4$  nmole.mg prot<sup>-1</sup>.15min<sup>-1</sup>), transfectées sans DNA (de  $76,9 \pm 11,4$  à  $81,0 \pm 6,1$  nmole.mg prot<sup>-1</sup>.15min<sup>-1</sup>) et transfectées avec le plasmide pcDNAneoI seul (de  $84,9 \pm 6,3$  à  $80,7 \pm 6,3$  nmole.mg prot<sup>-1</sup>.15min<sup>-1</sup>) alors que l'inhibition persiste pour les cellules transfectées avec le plasmide pcDNAneoI contenant HCaRG (de  $65,5 \pm 2,1$  à  $61,9 \pm 3,8$  nmole.mg prot<sup>-1</sup>.15min<sup>-1</sup>). Une phase plateau de stimulation du cotransporteur semble être atteinte autour de 400mosm pour toutes les conditions. Le groupe d'Orlov *et al.* (242) a observé le même phénomène avec des cellules du muscle lisse vasculaire. Il est proposé que ce plateau serait dû à l'augmentation de la concentration de chlore intracellulaire qui agit comme modulateur négatif de l'activité du cotransporteur (238,239).

L'autre paramètre mesuré est la perméabilité passive pour le <sup>86</sup>Rb. La perméabilité passive est calculée comme étant la composante de l'influx de <sup>86</sup>Rb résistante à la

bumétanide et à la ouabaïne. Dans les mêmes expériences, la perméabilité passive demeure stable dans les quatre conditions de transfection ainsi que pour toutes les osmolarités (figure 3b). Ce paramètre permet de contrôler l'efficacité de la bumétanide et de la ouabaïne à inhiber le cotransporteur  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  et la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$  respectivement. L'influx de potassium résultant est dû à la perméabilité passive et ne devrait pas être modulée par l'osmolarité. C'est ce que nous observons dans nos conditions, la perméabilité passive n'est pas régulée par l'osmolarité et n'est pas modifiée par la transfection avec HCaRG (figure 3b).

## 2. Études de HCaRG humain

### 2.1 Clonage et séquençage de la région codante du gène de HCaRG humain

En se basant sur la séquence nucléotidique de HCaRG de rat et sur les deux courtes séquences d'acides nucléiques originant d'une librairie de cDNA de cerveau d'enfant, nous avons synthétisé une paire d'amorces nucléotidiques identiques à la séquence de rat en 5' et à la séquence humaine en 3' pour amplification par PCR. En utilisant le DNA génomique de lymphocytes humains nous avons amplifié un fragment de 900pb. Ce fragment a été sous-cloné et 505pb ont été séquencés. L'alignement des séquences en acides nucléiques de HCaRG humain et de HCaRG de rat révèle une homologie de 77% dans cette région (figure 4). Par ailleurs, le codon d'initiation de la traduction ainsi que le motif apparenté au *EF-hand* sont conservés dans la séquence de HCaRG humain (figure 4). Étant donné que la séquence de HCaRG du rat provient d'un clone de cDNA et que la séquence de HCaRG humain provient d'un clone de DNA génomique, nous en concluons qu'il n'y a pas d'intron dans cette région du gène de HCaRG humain. Malgré qu'aucun intron n'ait été détecté dans toute la séquence correspondant à la région traduite complète de HCaRG de rat cela n'exclut pas la possibilité qu'il y en ait dans la séquence de HCaRG humain.

L'alignement des séquences en acides aminés de HCaRG humain et de HCaRG de rat, indique une homologie de 86% (figure 5a) entre l'humain et le rat. Cela démontre que le gène est conservé entre ces deux espèces. De plus, le motif apparenté au *EF-hand* est

également conservé dans la séquence humaine, ce qui suggère que HCaRG chez l'humain, pourrait avoir une activité de liaison du calcium. Rappelons que le motif *EF-hand* est un site de liaison du calcium qui est présent dans d'autres protéines connues pour lier le calcium, telles la calmoduline (CaM) et la troponine C (TPC) qui possèdent quatre motifs *EF-hand* chacune (figure 5b) (3,22,125,295). La CaM est une protéine en forme d'haltère (*dumbbell*) qui présente deux motifs *EF-hand* aux extrémités N- et C-terminaux. Chaque couple de motif *EF-hand* interagissent pour lier le calcium (22,125,295). Des études cristallographiques des motifs *EF-hand* de la CaM et de la TPC (295) ont permis de caractériser les résidus impliqués dans la liaison du calcium. Ce sont les résidus 1, 3, 5, 7, 9 et 12 de chacune des boucles qui assurent l'affinité pour le calcium. Le résidu 12, l'acide glutamique, est le plus conservé et il est suggéré qu'il est indispensable pour la liaison du calcium.

Des études de mutagenèse dirigé du motif *EF-hand* de la CaM en présence de calcium ont permis de démontrer que des mutations ponctuelles de l'acide aminé en position 12 soit dans la deuxième boucle ou dans la quatrième boucle influencent l'interaction de ces sites avec les sites de la première et de la troisième boucle respectivement. Ils ont également montré que l'interaction d'un site de liaison du calcium muté avec un site normal diminue l'affinité pour le calcium de 60 à 300 fois (296). Par ailleurs, une mutation de l'acide aminé en position neuf dans la troisième boucle confère à la protéine deux sites de haute affinité (boucles 1 et 2) et deux sites de faible affinité (boucles 3 et 4) pour le calcium. Ceci démontre bien que l'interaction de deux motifs *EF-hand* situés à la même extrémité est nécessaire pour la liaison du calcium et la liaison avec les protéines cibles (201,295). Toutefois, l'action inhibitrice de ces mutations peut être abrogée par l'ajout d'un peptide agissant comme une cible. En effet, pour la CaM, l'activité de liaison du calcium est retrouvée complètement pour les deux mutations des acides glutamiques en position 12 en ajoutant un peptide synthétique de la kinase de la chaîne légère de la myosine. Dans notre cas, nous observons que le résidu à la position 12 dans la séquence de HCaRG n'est pas un acide glutamique mais une glycine. Comme le

**Figure 4:** Alignement des séquences de cDNA de HCaRG de rat (rHCaRG) et de DNA de HCaRG humain (hHCaRG). Une homologie de 77% a été calculée. Les codons d'initiation et le motif apparenté au *EF-hand* sont conservés. Aucun intron n'est observé dans cette région.

		<b>met</b>	
rHCarG	CTTCGGACTG G TTAAGAAA CCGGAAGAA -AG-GATGTC TGCTT TGGGG		146
hHCarG	-----TG G TTAATCAA GAGGAAGTAG CAGCAATGTC TGCTT TGGGG		42
		<b>EF-hand</b>	
rHCarG	GCTGCAGCTC CATACTTGCA CCATCCCGCT GACAGTCACA GTGGCCGGST		196
hHCarG	GCTGCAGCTC CATACTTGCA TCATCCCGST GATAGTCACA GTGGCCGAST		92
rHCarG	CAGTTTCCTG GGTTCCAGC CCTCTCCAGA AGTGCCTCC TGGGCTCACC		246
hHCarG	CAGTTTCCTG GGCCCCAGC TTCTCTCCAGA GGTGCCTCCA ATGGCCCTCC		142
rHCarG	TCTTGAAAGGA CTTAGACAGG AGCACTTCA GAAAGTTGTT GAAACTTTGTA		296
hHCarG	TACTTAGGGA CTTAGACAGG AGCACTTCA GAAAGTTGCT GAAATTTGTTG		192
rHCarG	GTCGCGGCC TGCATGGCA AACTGCGCA GAACCTGTGG AGCAACTTTGG		346
hHCarG	GTCGCGGCC TGCATGGCA AACTGCGCA GAACCTGTGG AGCAACTTTGG		242
rHCarG	TGCAGCGCC AACCTGTCA AAGAGCGTCT GGCCCTCTG CTGGCGGGCA		396
hHCarG	GTCAGCGCC AACCTGTCA AAGAGCGCTT GGCTCTCTG CTGGCGGGCA		292
rHCarG	CACACAGCT GCTCCAGCAG GCTCTCCGC TGCCCCCTG TAGTCTAAG		446
hHCarG	TGCACAGCT GCTCCAGCAG GCTCTCCGC TGCCCCCTC CAGCTCTAAG		342
rHCarG	CCAGATCCCT TCAGGAGA GCTCCAGGAA CTTCATCTC CTAGGATCT		496
hHCarG	CCAGATCCCT TCAGGAGCA GCTCCAGGAG CTTCATCTC CCAAGACT		392
rHCarG	AATTTGGAGT TTTGGCCAGTT TGGTATTTGG GAGTCAAC GCCCTCTCTCTG		546
hHCarG	GGTTGGAGT TTTGGCCAGTT TGGTATTTGG GAGTCAAC GCCCTCTCTCTG		442
rHCarG	ACTCTGTAGC CCAATAGCAG GCACTCTCC TGCTCTACCT TCTCTACTTC		596
hHCarG	ATTCTGTAGC CCAATAGCA AGTACTCTG AGATGCATC G-----ACT--		484
rHCarG	CGGTGGCGG TCGAAGTGC CATCTCAAC AGCGCTCAGT CCGCTCCCT		646
hHCarG	-----C-----GA-----G-----ACT--CG--TAGT C-----		498
rHCarG	GTAACCGAGT GTTCTCATGC AGCTGAAGCT CACAGATGGA TCTG		690
hHCarG	GATTTT----- ----- ACT----- TAGT-----		505

**Figure 5a:** Alignement des séquences en acides aminés de HCaRG de rat et d'humain. Le motif apparenté au *EF-hand* ainsi que ses séquences limitrophes sont conservées. Deux courtes séquences humaines provenant d'une librairie de cDNA de cerveau d'enfant retrouvées dans le GenBank, et portant les codes d'identification h34554 et h36018 sont moins homologues dans la région 3' aux séquences de HCaRG de rat et d'humain que nous avons cloné.

**Figure 5b:** Comparaison du motif apparenté au *EF-hand* de HCaRG avec d'autres protéines de liaison du calcium. Huit sur douze acides aminés les plus conservés du motif *EF-hand* sont conservés dans HCaRG. Les quatre motifs *EF-hand* de la calmoduline (EF-1-4CaM), deux des quatre motifs de la troponine C (EF-1-2TPC) et l'unique de l'*actin binding protein* (EF-ACTB) sont comparés.

**a**

		<u>EF-hand</u>												
HCaRG rat		MSA	GAA	APYLHHP	DS	HSGRVS	FLGS							
HCaRG humain		MSAVGAA	TPYLHHP	GDS	HSGRVS	FLGA								
h34554		MSAVGTA	TPYLHHP	GDS	HSGRVS	FLGA								
h36018		MSAVGTA	TPYLHHP	GDS	HSGRVS	FLGA								
HCaRG rat	QPSPEV	IAVA	QLLK	-	DLDRS	TFRKLIK	LWV	GAT	HKK	DCRE	AVE	QLG	SAN	
HCaRG humain	QLPPEVA	AAMA	FLLG	-	DLDRS	TFRKLIK	FWV	SSL	QGE	DCRE	AV	RLG	MSAN	
h34554	QLPPEVA	AAMA	QLL	-	GDLDRS	TFRKLIK	FWCG						QOPAGGG	
h36018	QLPPEV	GSNG	PAXR	G	ILDRS	TECK	FEFLV						QOPAGGG	
HCaRG rat	ISEE	RIAM	LL	AG	IHTL	LQQA	LRLPH	ASLKP	DAF	QEE	LQEL	G	TPQD	ILGDL
HCaRG humain	LPEE	CI	GALL	AG	MHTL	LQQA	LRLPH	ISLKP	DIF	RDQ	LQEL	C	TPQD	LVGDL
h34554	LE		FVLQRX	WG			QEQE							AG
h36018	XE		RI	MAF	WCSAX	TFPRS	XWVE							VGRX
HCaRG rat	ASL	AFGS	QRP	LLDS	V	AQQ								
HCaRG humain	ASV	WFGS	QRP	LLDS	V	AQQ								
h34554	GAV	KLPC				WQ								
h36018	AH	V	STX			LP								

**b**

Protéine HCarG		D	S	-	H	S	G	R	V	S	F	L	G	12
EF-ACTB	(295aa)	D	V	N	F	D	G	R	V	S	F	L	E	12
EF1-TPCC		D	E	D	G	S	G	T	V	D	F	D	E	12
EF2-TPCC	(161aa)	D	K	N	N	D	G	R	I	D	Y	D	E	12
EF1-CaM		D	K	D	G	D	G	T	I	T	T	K	E	12
EF2-CaM		D	A	D	G	N	G	T	I	D	F	P	E	12
EF3-CaM	(148aa)	D	D	D	G	N	G	Y	I	S	A	A	E	12
EF4-CaM		D	I	D	G	D	G	Q	V	N	Y	E	E	12

groupe de Haiech (296) l'a démontré, il n'est peut être pas obligatoire dans tous les cas. Par contre, les autres résidus importants dans la liaison du calcium, les résidus 1, 5, 7 et 9 présentent une bonne homologie entre HCaRG et la protéine liant l'actine (ACTB), la TPC et la CaM et ce particulièrement pour le résidu 1 qui est conservé dans la séquence de ces quatre protéines (figure 5b). Finalement, les deux courtes séquences illustrées sur la figure 4b, h34553 et h36018, sont les deux séquences humaines provenant de la librairie de cDNA de cerveau d'enfant obtenues du GenBank. On remarque une plus grande homologie de séquence dans la région 5' que dans la région 3' avec les deux séquences de HCaRG que nous avons cloné chez le rat et chez l'humain.

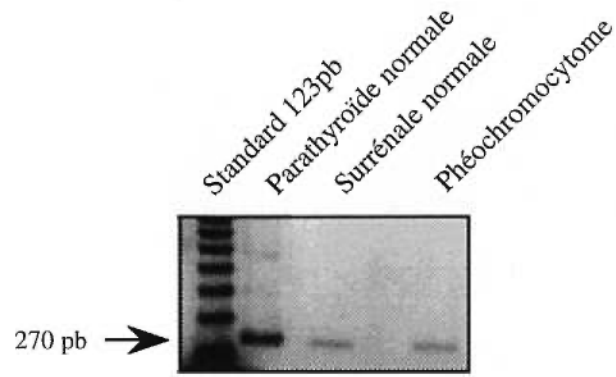
## **2.2 Études d'expression de HCaRG chez l'humain**

Nos études d'expression de HCaRG chez l'humain ont été effectuées par la technique de RT-PCR en utilisant le RNA total. La paire d'amorces nucléotidiques qui a été utilisée amplifie un fragment de 270pb du gène humain. Un produit de PCR d'intensité plus forte et de longueur attendue est observé pour une parathyroïde humaine normale, comparativement à une surrénale normale ainsi qu'à un phéochromocytome (figure 6a). Cette analyse par RT-PCR n'est pas quantitative mais des réactions de RT-PCR avec ces mêmes échantillons répétées plusieurs fois donnent les mêmes différences d'intensité. Par ailleurs, HCaRG est également exprimé dans deux glandes parathyroïdes anormales, c.-à-d. provenant d'un patient atteint d'une hyperparathyroïdie primaire et d'un patient atteint d'une hyperparathyroïdie secondaire (figure 6b). De façon intéressante, HCaRG est aussi fortement exprimé dans la portion endocrine du pancréas normal avec une intensité comparable à celle de la parathyroïde normale (figure 6c). Nous avons initié des études d'expression de HCaRG dans des tissus pathologiques. Nous avons choisi des tissus provenant de différents cancers dont chacun ont leur "témoin normal" originant du même

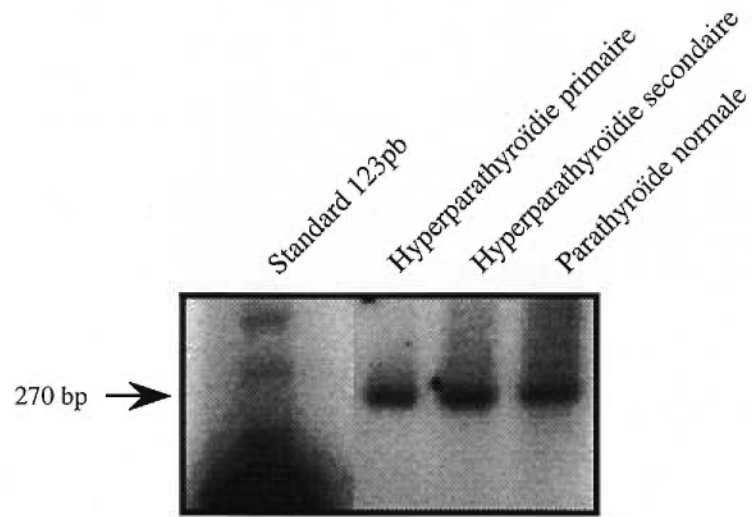


**Figures 6 a, b et c:** Expression de HCaRG par RT-PCR dans plusieurs tissus humains. Un produit de RT-PCR de 270pb est obtenu dans une parathyroïde normale, une surrénale normale et une surrénale provenant d'un patient atteint d'un phéochromocytome (figure 6a). HCaRG est aussi présent dans deux parathyroïdes provenant d'une hyperparathyroïdie primaire et secondaire (figure 6b) et dans la portion endocrine du pancréas (figure 6c).

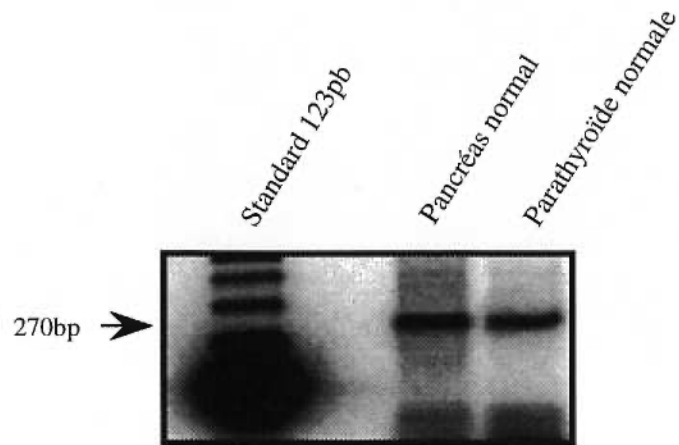
**a**



**b**

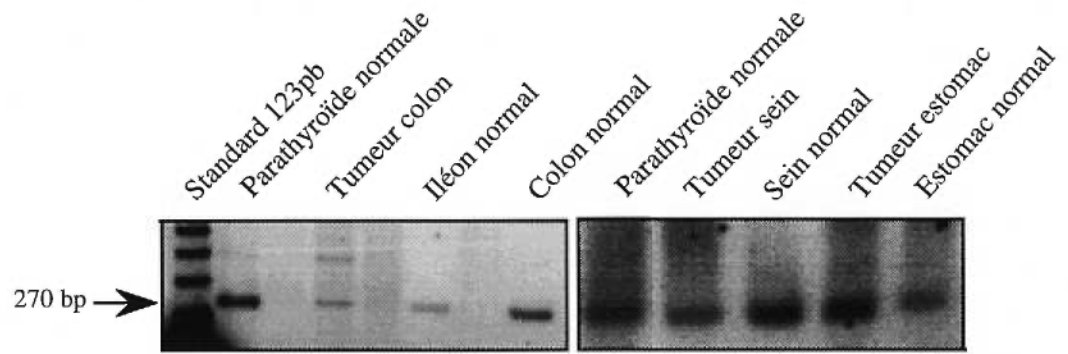


**c**

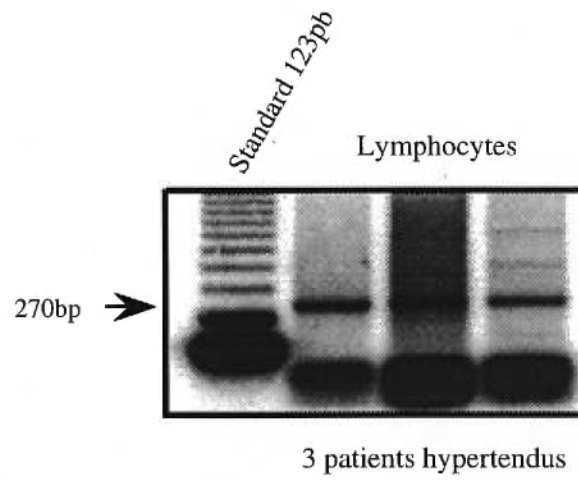


**Figures 7 a et b:** Expression de HCaRG par RT-PCR dans plusieurs tissus pathologiques dont un cancer du colon, un cancer de l'estomac et un cancer du sein. Aucune différence de longueur dans cette région du gène n'est observée en comparaison avec leurs témoins normaux respectifs et avec la parathyroïde normale (figure 7a). Nous notons aussi l'expression de HCaRG par la présence d'un produit de RT-PCR de la longueur attendue, 270pb, dans les lymphocytes de patients hypertendus (figure 7b).

**a**



**b**

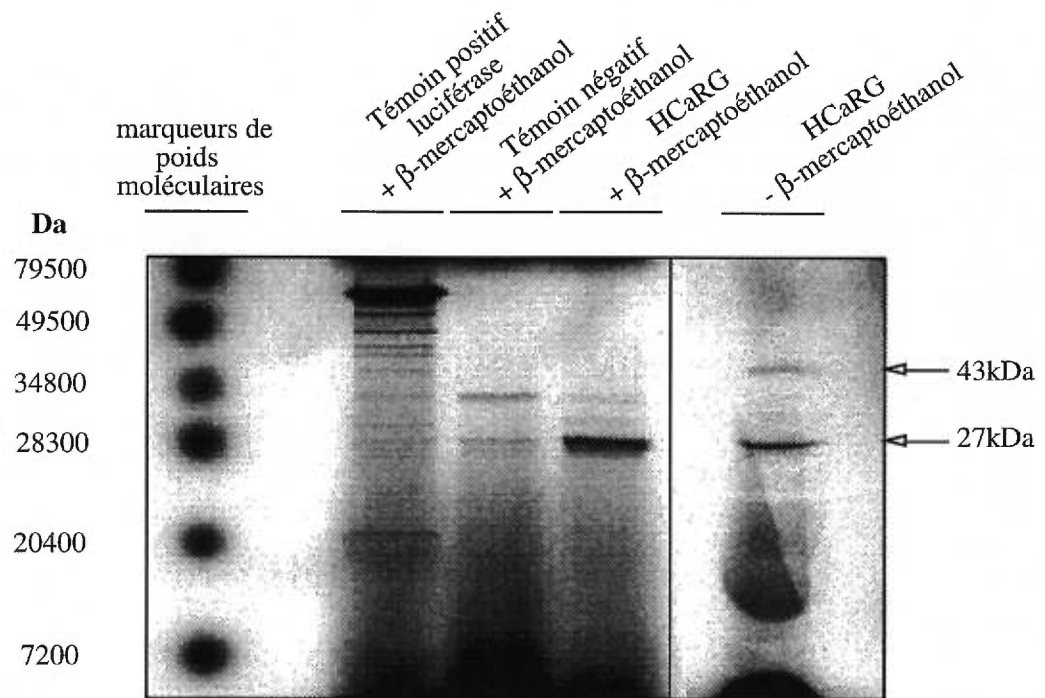


**Évaluation qualitative de l'expression du mRNA de HCaRG dans différents  
tissus chez le rat et l'humain en utilisant la parathyroïde  
comme point de comparaison.**

	<b>Rat</b>	<b>Humain</b>
Parathyroïdes	+++++ cellules en culture	+++ glande
Adénome parathyroïdien	p.e.	+++
Surrénales	+++	+
Foie	+	p.e.
Ventricules cardiaques	+	p.e.
Oreillettes cardiaques	+	p.e.
Poumon	+++	p.e.
Cerveau	++++	p.e.
Cervelet	++++	p.e.
Lymphocytes	p.e.	++
Phéochromocytome	p.e.	+
Colon	p.e.	++
Colon, cancer	p.e.	+
Iléon	p.e.	+
Pancréas	p.e.	++
Sein, normal	p.e.	+++
Sein, cancer	p.e.	++
Estomac, normal	p.e.	+
Estomac, cancer	p.e.	++

**Tableau III**

**Figure 8:** Résultat de la transcription couplée à la traduction *in vitro* de HCaRG de rat. Analyse des produits sur gel de polyacrylamide dénaturant avec ou sans  $\beta$ -mercaptoéthanol dans le tampon d'échantillon. Un témoin positif du gène de la luciférase ainsi qu'un témoin négatif avec le plasmide pSP72 seul sont présentés.



patient. HCaRG est exprimé dans tous les spécimens étudiés soit un cancer du colon, un cancer du sein, un cancer de l'estomac ainsi que dans le tissu adjacent dit normal (figure 7a). Nous avons aussi voulu voir si HCaRG était exprimé dans des cellules circulantes. Un produit de PCR de la longueur attendue pour HCaRG est détecté dans les lymphocytes de trois patients hypertendus (figure 7b). Les lymphocytes, qui sont les cellules mononucléées le plus aisément accessibles chez l'humain, sont un outil intéressant pour des études fonctionnelles de HCaRG. Le tableau III résume qualitativement les niveaux d'expression du mRNA de HCaRG dans tout les tissus étudiés chez le rat et l'humain.

### **2.3 Expression de la protéine HCaRG *in vitro***

L'expression de la protéine HCaRG à l'aide d'une trousse d'analyse de transcription couplée à la traduction *in vitro* démontre la synthèse d'une protéine d'environ 27KDa sur gel de polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE) en présence de  $\beta$ -mercaptoéthanol dans le tampon d'échantillon (figure 8). Ceci est légèrement plus élevé que la taille attendue selon la composition en acides aminés (23KDa). Or, sans  $\beta$ -mercaptoéthanol, nous obtenons une bande à environ 43KDa, approximativement le double de la taille observée en présence de  $\beta$ -mercaptoéthanol. Nous avons identifié un contenu de 67% en hélice  $\alpha$  dans la structure de HCaRG suggérant une activité de dimérisation (201). Or, il est possible que le  $\beta$ -mercaptoéthanol empêche ou limite la formation de dimères en influençant les interactions des hélices  $\alpha$ . Par ailleurs, il est connu que l'affinité du motif *EF-hand* pour le calcium est augmenté par la dimérisation (201). Malgré que HCaRG ne possède qu'un motif *EF-hand*, il est possible que la dimérisation de la protéine permette la liaison du calcium.

### **2.4 Localisation chromosomique et analyses génétiques de HCaRG**

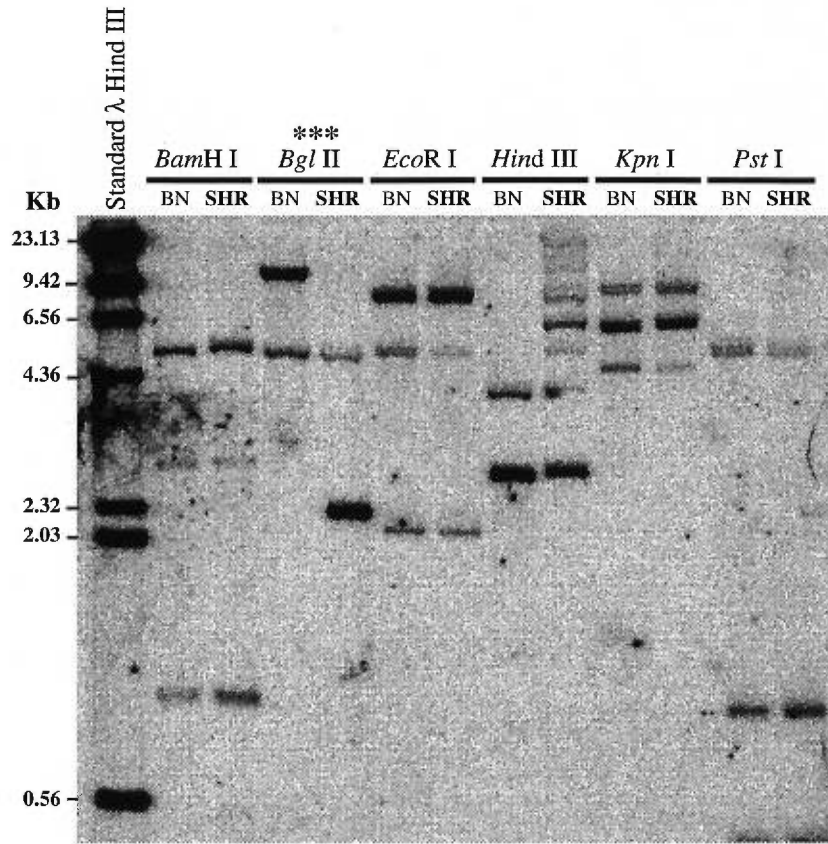
Pour la localisation chromosomique de HCaRG, nous avons recherché la présence d'un polymorphisme de restriction (RFLP) dans la séquence de HCaRG entre les souches de rats hypertendus et normotendus SHR et BN.*lx* respectivement. La digestion du DNA



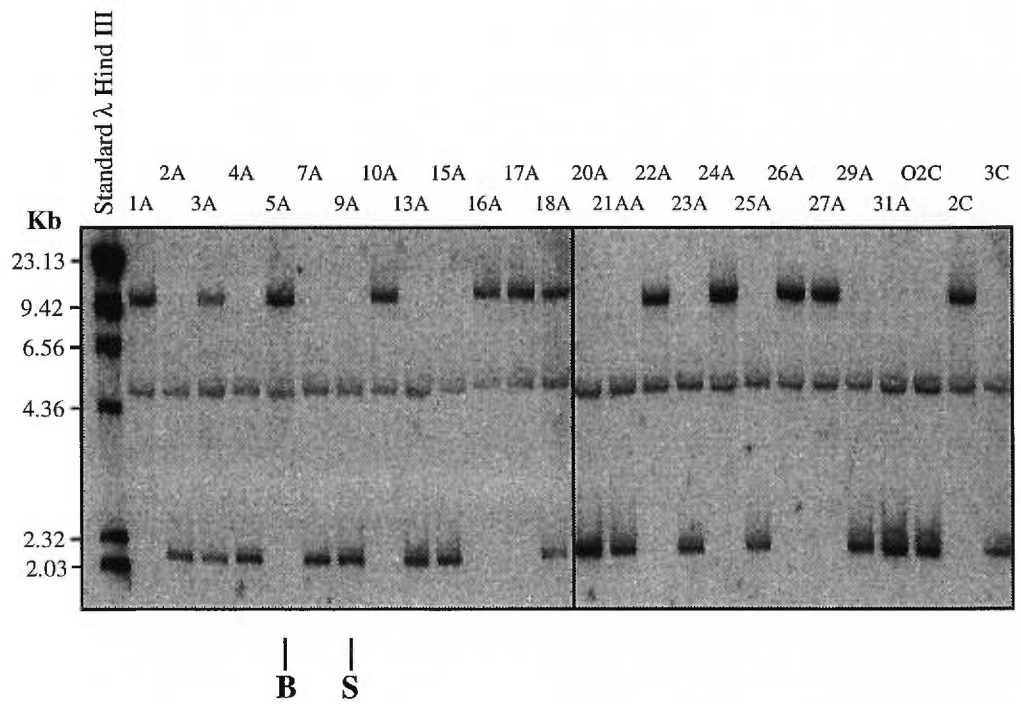
**Figure 9a:** Carte de restriction du gène de HCaRG pour les souches de rats SHR et BN.*lx*. Buvar dage de type Southern effectué avec la sonde de HCaRG sur le DNA génomique des rats digéré avec différentes enzymes de restriction.

**Figure 9b:** Exemple de distribution du polymorphisme de HCaRG dans les rats de 28 souches recombinantes consanguines. Buvar dage de type Southern avec la sonde de HCaRG sur le DNA génomique des rats recombinants consanguins digéré avec l'enzyme Bgl II.

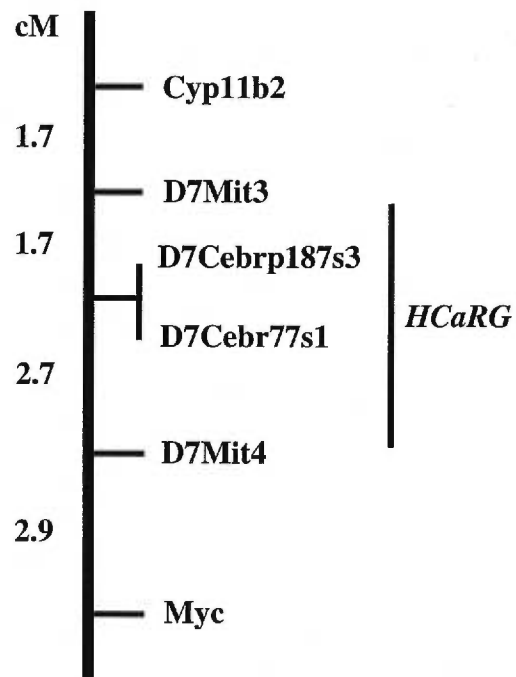
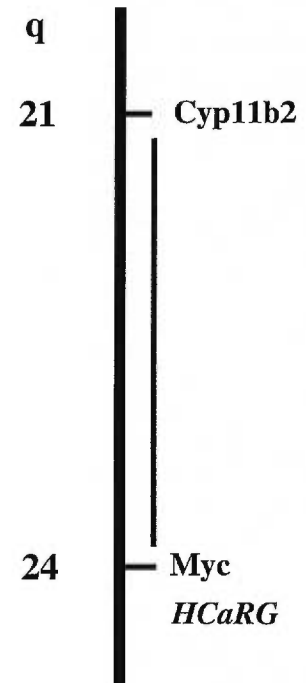
a



b



**Figure 10:** Localisation chromosomique de HCaRG sur le chromosome 7 du rat entre les marqueurs CYP11B2 et Myc. La région synténique humaine, q21-q24 du chromosome 8 humain est représentée.

**Chromosome 7  
de rat****Chromosome 8  
humain**

génomique de SHR et BN.*lx* avec six enzymes de restriction (BamH I, Bgl II, EcoR I Hind III, Kpn I, Pst I), suivie d'une électrophorèse et d'un buvardage de type Southern avec la sonde de HCaRG (méthodes, sect. 4.1, p.65), a permis de mettre en évidence un RFLP de 10Kpb avec l'enzyme Bgl II entre les rats SHR et BN.*lx* (figure 9a). Nous avons ensuite génotypé un panel de 33 lignées de rats recombinants consanguins (RIS) pour le RFLP de HCaRG. Les RIS que nous avons utilisé originent d'un croisement entre les progéniteurs SHR et BN.*lx*. Rappelons que les RIS sont un outil puissant pour les études génétiques et la cartographie de gènes car ce sont des rats homozygotes pour tous leurs loci. De plus, tous les rats d'une même souche sont génétiquement identiques permettant de faire une moyenne des données récoltées contrairement aux rats F2 qui sont tous différents donc ne permettant qu'une donnée par rat (284).

Mentionnons que les RIS que nous utilisons sont cartographiés pour environ 500 marqueurs génétiques sur tous leurs chromosomes couvrant approximativement 80% du génome total avec une moyenne de 20 marqueurs par chromosome (289). De la même façon que pour les progéniteurs, nous avons génotypé les 33 souches de RIS pour le RFLP de HCaRG avec l'enzyme Bgl II. La distribution du RFLP de HCaRG nous a permis de séparer les souches en deux groupes soit celles qui possèdent l'allèle SHR et celles qui possèdent l'allèle BN.*lx* (figure 9b). Subséquemment, une comparaison de la distribution allélique du RFLP de HCaRG avec celle de 456 marqueurs a été effectuée chez les RIS. Une forte association avec deux marqueurs anonymes, D7Cebrp187s3 et D7Cebr77s1 sur le chromosome 7 du rat a été révélée. Une fraction de recombinaison de zéro pour 31 des 33 souches indique une probabilité d'association très grande avec ces marqueurs. HCaRG a alors été localisé dans une région de 4.4 centimorgans entre les marqueurs CYP11B2 et Myc. Une analyse synténique entre le rat et l'humain en utilisant les régions de chromosomes homologues a permis de localiser la région CYP11B2 et Myc au chromosome 8 humain q21-q24 (figure 10).

Nous avons alors fait une recherche des maladies humaines déjà cartographiées dans cette région du chromosome 8 humain. Deux groupes de pathologies d'intérêt en sont

**Analyse de l'association du polymorphisme de restriction de HCaRG avec des phénotypes intermédiaires de l'hypertension dans les lignées recombinantes consanguines (RIS).**

**Tous les RIS (*SXB* et *BXS*)**

Phénotypes	Corrélation	P
Poids coeur/poids corporel (nouveau-né)	0,188	0,370
Poids coeur/poids corporel (adulte)	0,131	0,494
Triglycérides	0,223	0,215
Glucose plasmatique	0,116	0,556
Acide urique plasmatique	-0,160	0,419
Insulinémie	0,065	0,720
Poids du rein/Poids corporel (nouveau-né)	0,172	0,385
Poids du rein/Poids corporel (adulte)	0,242	0,211
Pression systolique	-0,047	0,803
Pression diastolique	-0,167	0,378
Pression moyenne	-0,091	0,628

**Souches de RIS (*SXB*)**

Phénotype	Corrélation	P
Poids du rein/Poids corporel (nouveau-né)	0,638	0,014
Poids du rein/Poids corporel (adulte)	0,424	0,065

**Souches de RIS (*BXS*)**

Phénotype	Corrélation	P
Poids du rein/Poids corporel (nouveau-né)	-0,376	0,255
Poids du rein/Poids corporel (adulte)	-0,166	0,702

**Croisement *SXB*:** Lignées RIS issues d'un croisement entre les mères hypertendues SHR (S) et les pères normotendus BN (B).

**Croisement *BXS*:** Lignées RIS issues d'un croisement entre les mères normotendues BN (B) et les pères hypertendus SHR (S).

**Tableau IV**

ressortis dans lesquelles HCaRG pourrait être impliqué, ce sont des maladies rénales et des maladies osseuses. Une translocation entre le chromosome 3p14.2 et le chromosome 8q24.1 a été observée chez ces patients. De plus, une mutation localisée sur le chromosome 8q23, cause une maladie héréditaire à caractère autosomale dominante caractérisée par des kystes sur les reins. Dans les pathologies des os, il y a le syndrome de Langer-Giedion. Cette maladie qui est caractérisée par des tumeurs bénignes cartilagineuses (exostoses) et des anomalies squelettiques est causée par une mutation de deux gènes, EXT1 et TRPS1, localisés dans la région du chromosome 8q24 (297). Une mutation dans le gène EXT1 seulement (8q24.1) cause la maladie héréditaire d'exostoses multiples (298). L'ostéopétrose avec acidose des tubules rénaux et calcification cérébrale est une maladie caractérisée par une diminution de la résorption osseuse et une anomalie de l'équilibre acide-base causée par l'incapacité des reins à sécréter les ions  $H^+$  et à réabsorber le  $HCO_3^-$  (68). Un gène candidat pour cette maladie a été identifié et localisé au chromosome 8q22, le gène de l'anhydrase carbonique (68).

Par ailleurs, nous avons révélé une corrélation du RFLP de HCaRG avec la distribution allélique d'un phénotype intermédiaire de l'hypertension, le ratio du poids du rein sur le poids corporel chez les rats RIS nouveau-nés ( $p=0.014$ ) et une tendance pour les rats RIS adultes ( $p=0.065$ ). Le locus de HCaRG a été déterminé responsable de 26% et de 32% de cette différence de ratio pour les RIS issus d'un croisement d'un père hypertendu et d'une mère normotendue (tableau IV). Par contre, aucune association n'a été révélée entre la distribution du RFLP de HCaRG et celle de la pression diastolique (-0,167), de la pression systolique (-0,047), de la pression moyenne (-0,091), du ratio du poids du rein sur le poids corporel chez le nouveau-né (0,172) et chez l'adulte (0,242) en analysant tous les RIS ensemble. Ce résultat suggère que le mère hypertendue transmet un ou plusieurs loci qui influencent la taille du rein dont un de ces locus pourrait contenir le gène de HCaRG .

## **IV-DISCUSSION**

### **1. L'homéostasie ionique dans l'hypertension**

#### **1.1 Anomalies de la concentration intracellulaire des ions sodium et calcium dans l'hypertension.**

Plusieurs anomalies du métabolisme ionique ont été décrits dans des modèles animaux d'hypertension génétique ainsi que chez des humains souffrant d'hypertension artérielle essentielle (23,41,210-213). L'augmentation de la tension artérielle est due, entre autres, à l'augmentation de la contraction des cellules du muscle lisse vasculaire (VSMC) entraînant une augmentation de la résistance périphérique (24,224,225). Mentionnons que le tonus des VSMC est sous la régulation de la concentration intracellulaire des ions sodium et/ou des ions calcium. Il est proposé que l'augmentation de la concentration cytosolique de ces ions observée dans l'hypertension est due à des anomalies généralisés du transport ionique impliquant une perméabilité membranaire accrue ou une réduction de l'activité de certains transporteurs d'ions (17,24,53,220,221). Une augmentation de la concentration intracellulaire de sodium et de calcium sont toutes deux observées dans l'hypertension expérimentale (25,212,213,229,299) et humaine (10,230,273,300) comparativement à leurs témoins normotendus respectifs et ce, dans plusieurs types cellulaires. L'étude des transporteurs d'ions a permis d'observer des différences d'activité qui semblent être responsables des concentrations plus élevées de sodium et de calcium cytosolique entre les normotendus et les hypertendus. En fait, une diminution de la fluidité membranaire des érythrocytes des rats SHR et des humains hypertendus peut être responsable des variations observées dans l'activité des transporteurs d'ions (220,221). Les transporteurs d'ions étant des protéines membranaires sont sous l'influence des changements de fluidité de la membrane. Cette dernière peut donc affecter soit la conformation et de là, la fonction des ces transporteurs (17).



## 1.2 Anomalies de l'absorption de calcium par les rein et les intestins

Les niveaux de calcium ionisé ( $\text{Ca}^{2+}$ ) plasmatiques sont souvent relativement moindres chez les rats et les humains hypertendus comparativement à leurs témoins normotendus (15,52,134,211,217,218,257). Toutefois, l'implication de cet état dans l'élévation de la pression artérielle n'est pas encore élucidée. La diminution de calcium plasmatique chez les hypertendus peut être expliquée par une réduction de l'absorption de calcium par le rein et les intestins. En effet, Drüeke *et al.* (269,270) ont observé des modifications structurales de l'épithélium du duodénum et du tubule proximal du néphron chez le rat SHR comparativement au rat WKY. Ils ont aussi observé une diminution du contenu de deux protéines dépendantes de la vitamine D qui lient le calcium, la protéine intestinale CaBP9K et la protéine rénale CaBP28K. Rappelons que ces deux protéines sont importantes pour le transport du calcium à travers l'épithélium intestinal et rénal vers la circulation sanguine. Une autre protéine dépendante de la vitamine D et importante pour la liaison et le transport du calcium, la IMCAL, est aussi diminuée dans plusieurs tissus du rat SHR comparativement aux rats WKY (271) notamment dans l'intestin et dans le rein. Or, des anomalies du métabolisme de la vitamine D chez les SHR peuvent être responsables du développement anormal des structures de l'épithélium du rein et de l'intestin et conséquemment à la malabsorption calcique.

Par hybridation *in situ*, nous avons démontré que HCaRG est exprimé dans la fraction tubulaire du cortex rénal des rats SHR et WKY (annexe 1, p.XII) avec un signal plus intense pour le SHR. Par la technique de RT-PCR, nous avons détecté l'expression de HCaRG dans le colon et l'iléon humain (figure 7a). Ces résultats nous permettent d'émettre l'hypothèse que HCaRG pourrait être impliqué dans le métabolisme calcique anormal de l'intestin et du rein retrouvé dans l'hypertension. Or, des études de transplantation croisée avec des reins de rats hypertendus et normotendus indiquent que l'hypertension peut se transmettre par le rein (227) suggérant encore que l'expression accrue de HCaRG dans le rein des rats SHR peut être impliquée dans le développement de l'hypertension.

### 1.3. Anomalies du transport ionique dans l'hypertension

Le cotransporteur  $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$  est situé dans la membrane plasmique des cellules épithéliales du rein, des cellules du muscle lisse vasculaire (VSMC) (241) et des cellules endothéliales (VEC) (240) et permet soit l'entrée soit la sortie des ions sodium, potassium et chlore. La direction du flux net d'ions est déterminé par les gradients électrochimiques des trois ions qu'il transporte. Il est donc responsable du maintien du gradient des ions sodium et potassium à travers la membrane plasmique. Les VSMC et les VEC sont responsables du tonus vasculaire alors que les cellules épithéliales rénales sont impliquées dans l'absorption et la sécrétion de différents ions (3,22,23,127). Le tonus vasculaire ainsi que l'homéostasie ionique conféré par les reins sont deux mécanismes qui sont anormaux dans l'hypertension artérielle (41,115,224,225). Le cotransporteur est activé, entre autre, par une modification du volume cellulaire, soit une augmentation ou une diminution (242-244). Dans le cas d'une augmentation du volume, le cotransporteur permet la sortie simultanée de sodium, de potassium et de chlore ainsi que de l'eau liée par l'osmolarité ramenant le volume cellulaire à son état normal. L'inverse se produit lors d'une diminution de volume, le cotransporteur permet l'entrée des ions sodium, potassium et chlore ainsi que l'eau permettant de restaurer le volume cellulaire. Les cellules épithéliales subissent régulièrement des modifications importantes de leur osmolarité donc des transporteurs d'ions sensibles aux modifications osmotiques sont importants pour le maintien d'un volume cellulaire adéquat (242).

La régulation de l'activité du cotransporteur est très complexe et encore imparfaitement comprise (301). La réduction du volume cellulaire est un stimulus universel pour l'activation du cotransporteur et il est suggéré que cette activation est médiée par la phosphorylation directe de celui-ci (301). Des évidences suggèrent que la concentration de chlore intracellulaire est un élément inhibiteur pour l'activité du cotransporteur (301). De plus, plusieurs agonistes ainsi que des messagers intracellulaires sont impliqués dans la modulation de l'activité du cotransporteur ceux-ci sont les nucléotides cycliques, le calcium, la protéine kinase C (PKC) et les facteurs de croissance

(192,246,301). Étant donné le manque d'informations sur la régulation de ce cotransporteur, il est difficile d'interpréter les résultats obtenus par différents groupes. Certains observent une activité accrue (250) et d'autres une activité diminuée (246) de l'influx d'ions par le cotransporteur dans l'hypertension. Toutefois, soit une augmentation de l'activité du cotransporteur dans le mode "entrée" soit une diminution de l'activité du cotransporteur dans le mode "sortie" vont subséquemment impliquer l'augmentation de la concentration cytosolique de sodium et éventuellement de calcium. Ces événements vont mener essentiellement à un état d'hypertension.

Mentionnons que nos résultats de HCaRG de rat sur l'analyse de sa structure, de ses motifs et de sa régulation par des agonistes des voies de transduction du signal nous suggèrent que c'est une protéine cytosolique. Mentionnons aussi que HCaRG possède un site potentiel de liaison du calcium et que son expression est accrue chez les rats SHR comparativement aux rats WKY (annexe 1, p.XI). Il a été dans notre intérêt de regarder si la surexpression de HCaRG dans des cellules épithéliales de rein pouvait jouer un rôle dans la régulation de l'activité du cotransporteur  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ .

Les cellules épithéliales de rein de singe COS-7 que nous avons utilisées pour la transfection transitoire de HCaRG expriment un cotransporteur  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  endogène. Rappelons qu'à l'état basal, le cotransporteur est pratiquement inactif. Or, un stimulus puissant pour son activation est la modification de l'osmolarité. Lors d'un choc hypoosmotique, donc un gonflement de la cellule, le cotransporteur est activé dans le sens "sortie". Ceci permet la sortie des ions sodium, potassium et chlore ainsi que l'eau liée par l'osmolarité. Cette étape est terminée en quelques minutes et permet le rétablissement rapide du volume cellulaire à ses valeurs de base. Dans le cas d'un choc hyperosmotique où il y a rétrécissement du volume cellulaire, l'inverse se produit. Le cotransporteur est activé dans le sens "entrée" permettant l'entrée des ions sodium, potassium et chlore et de l'eau liée par l'osmolarité et ainsi le retour au volume cellulaire basal. Ce cotransporteur est très important dans l'homéostasie du volume cellulaire car plusieurs événements biologiques dont la prolifération et la division cellulaire impliquent des modifications du

volume des cellules. Dans nos conditions expérimentales, nous observons que l'activité du cotransporteur peut être modulé par l'osmolarité. En effet, lorsque les cellules passent d'un milieu hypoosmotique (200mosm) à un milieu isoosmotique (320mosm) le cotransporteur est stimulé et ce pour les cellules non transfectées, les cellules transfectées sans DNA, les cellules transfectées avec le plasmide pcDNAneoI et les cellules transfectées avec le plasmide contenant HCaRG (figure 3a). De plus, nous n'observons aucun effet de HCaRG sur l'activité du cotransporteur comparativement aux cellules non transfectées, transfectées sans DNA et transfectées avec le plasmide pcDNAneoI seul. Par ailleurs en augmentant l'osmolarité à 370mosm, l'activité du cotransporteur est encore accrue pour les quatre conditions. Par contre, une diminution de l'activation de l'influx de  $^{86}\text{Rb}$  est notée pour les cellules transfectées avec le plasmide pcDNAneoI contenant HCaRG signifiant une stimulation moins importante du cotransporteur. Cette baisse de la stimulation se reproduit également lorsque les cellules sont incubées dans un milieu de 395mosm. Or, il semble qu'une inhibition de l'activité du cotransporteur persiste pour les cellules qui surexpriment HCaRG ce qui suggère que HCaRG pourrait être impliqué dans la modulation de l'activité du cotransporteur. Lorsque les cellules passent d'un milieu de 395mosm à 470mosm, nous observons une diminution de l'activité du cotransporteur pour les quatre conditions testées. Cette inhibition serait probablement due à l'augmentation de la concentration de chlore intracellulaire qui a une activité inhibitrice sur le cotransporteur (242-244). Le groupe d'Orlov (242) a observé une inhibition de l'activité du cotransporteur semblable dans des VSMC incubées dans un milieu de 500mosm avec un retour à une activité basale en présence d'un milieu de plus de 600mosm. Or, l'effet de HCaRG diminue dans ces conditions.

#### **1.4. HCaRG comme modulateur du cotransporteur $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$**

L'implication du calcium comme modulateur de l'activité du cotransporteur peut possiblement impliquer HCaRG vu son rôle potentiel à lier le calcium. Des évidences expérimentales suggèrent que la régulation de l'activité du cotransporteur  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  par

l'osmolarité est un processus médié par des modifications de la structure du cytosquelette (239,246,302). En effet, l'ajout d'un agent qui altère l'organisation des microfilaments (cytochalasine B) à des VSMC en culture inhibe l'activité du cotransporteur de 60 à 80% (246). Par ailleurs, la réorganisation du cytosquelette induite par un choc thermique abolie complètement la régulation de l'activité du cotransporteur par l'osmolarité (302). Or, il est connu que plusieurs protéines liant le calcium interagissent avec ou lient le cytosquelette. La protéine p9Ka, de la famille des protéines S-100 est connue pour lier le cytosquelette (189) et la troponine C est connue pour lier les filaments d'actine (22). Nos résultats semblent suggérer que HCaRG inhibe l'activité du cotransporteur lorsque les cellules sont soumises à des osmolarités croissantes comparativement aux cellules non transfectées, transfectées sans DNA et transfectées avec le plasmide pcDNAneoI seul (figure 3a). Il est possible que HCaRG participe dans le mécanisme de réorganisation du cytosquelette affectant ainsi l'activité du cotransporteur. Nous avons montré que HCaRG est exprimé aussi chez les rats normotendus mais en plus faible quantité que chez les rats hypertendus (annexe 1, p.XI). Ceci suggère qu'à l'état normal, HCaRG pourrait n'avoir qu'une faible activité modulatrice du cotransporteur.

L'inhibition de l'activité du cotransporteur  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  impliquerait, entre autres, une incapacité des cellules à réaugmenter leur volume cellulaire suite à un choc hyperosmotique. Rappelons que les cellules épithéliales subissent régulièrement des modifications d'osmolarité dues au transport de différents ions à travers leurs membranes plasmiques et que ce cotransporteur est responsable du retour à la normale du volume cellulaire (242). Orlov *et al.* (244) ont démontré qu'un agoniste  $\beta$ -adrénergique, l'isoprotérénol, réduit d'avantage le volume cellulaire des VSMC en présence de bumétanide (inhibiteur spécifique du cotransporteur). Il est connu que l'activation de la voie de signalisation du cAMP, stimulée par l'isoprotérénol, induit une inhibition partielle de l'influx de  $^{86}\text{Rb}$  sensible à la bumétanide (244). Or, le groupe de Hamet (303) a démontré qu'un agoniste de la voie de signalisation impliquant le cAMP favorisait la mort cellulaire programmée (apoptose) dans des VSMC en culture. De plus, ils ont montré que

l'apoptose était plus prononcée dans les organes cibles de l'hypertension (e.g. coeur, rein et cerveau) des rats SHR comparativement aux mêmes organes des rat WKY (303). En fait, la diminution du volume cellulaire est une des premières étapes dans le processus de l'apoptose (39,304). Le fait que HCaRG soit exprimé en plus grande quantité dans les organes cibles de l'hypertension et qu'il peut possiblement être impliqué dans l'inhibition de l'augmentation du volume cellulaire lors d'un choc hyperosmotique en inhibant le cotransporteur suggère qu'il pourrait être impliqué dans le processus modulant l'apoptose dans ces organes.

### *Prolifération et apoptose*

Des anomalies de la prolifération cellulaire ont été décrites dans l'hypertension artérielle depuis déjà plusieurs années (46,305-309). Une augmentation du ratio du poids des organes sur le poids corporel est observée dans des modèles animaux d'hypertension têt dans la maladie et même à la naissance (304,305,310). Il est présentement accepté que la balance entre la croissance et l'atrophie cellulaire est l'équilibre entre la réplication et l'apoptose (303,307,311,312). Le terme apoptose a été initialement utilisé dans l'ontogenèse par le groupe de Kerr (39). Ce groupe a rapidement caractérisé les néoplasies comme étant dues à une prolifération incontrôlée de cellules ayant accumulé plusieurs mutations. Le groupe de Hamet (303,307,312,313) a récemment mis en évidence que la croissance des VSMC est contrôlée par l'apoptose et que plusieurs anomalies de ce mécanismes sont impliquées dans les maladies cardiovasculaires. Plusieurs hormones impliquées dans le développement de l'hypertension ont aussi des effets mitogéniques (40). L'angiotensine II, les cathécolamines, la vasopressine, l'insuline, les minéralo- et les glucocorticoïdes sont tous des agents vasoactifs qui stimulent la synthèse de DNA, la croissance des fibroblastes et la prolifération des VSMC en culture (21,46,47). L'activité mitogénique peut être responsable de l'hypertrophie des artères expliquant l'augmentation de la résistance périphérique des artéioles dans l'hypertension (21,46).

### *Apoptose et calcium*

Un des premiers signaux de la mort cellulaire est une augmentation massive de la concentration de calcium cytosolique. Cette augmentation de calcium serait responsable de l'activation d'enzymes (endonucléases) dépendantes du  $\text{Ca}^{2+}$  et du  $\text{Mg}^{2+}$  qui à leur tour seraient responsables du clivage du DNA de la cellule en fragments oligonucléosomiaux typiques à l'apoptose (314). Comme Kerr *et al.* (39) l'ont si bien décrit, les cas d'hyperprolifération résultent d'une inefficacité de la machinerie apoptotique. Le calcium est très important pour initier le processus apoptotique et des anomalies du métabolisme du calcium pourraient abroger le signal d'apoptose et favoriser la prolifération cellulaire.

Plusieurs protéines liant le calcium ont été impliqués dans les processus de néoplasie. La famille des protéines liant le calcium, les S100, sont très exprimées dans différents cancers. Les gènes codant pour ces protéines sont regroupés sur le chromosome humain 1q21, une région qui est fréquemment réarrangée dans les tumeurs (51,315). Nous avons entrepris des études d'expression de HCaRG dans différentes tumeurs.

Comme le démontrent les figures 6a, 6b et 7a, HCaRG est exprimé dans un phéochromocytome, une hyperparathyroïdie primaire et secondaire, un cancer du colon, un cancer du sein et un cancer de l'estomac. L'expression de diverses protéines liant le calcium a été démontrée dans ces types de cancer et plusieurs autres. Le groupe de Ilg (51), en utilisant des anticorps polyclonaux a montré l'expression de plusieurs protéines de la famille S100 dans des tumeurs humaines. Dans un cancer du sein, les protéines S100A4 et S100A6 sont abondantes alors que dans un cancer du colon, la protéine S100A6 est préférentiellement exprimée. Par ailleurs, la calrétinine est une protéine de la famille des *EF-hand* dont l'expression semble associée à plusieurs lignées de cellules de cancer du colon (316).

Particulièrement, une autre protéine de la famille des S100, la p9Ka (calvasculine) est fortement associée au phénotype métastatique. Davies *et al.* (317) ont transfecté un plasmide d'expression contenant le cDNA de cette protéine dans des cellules épithéliales mammaires bénignes de rat (Rama 37). La surexpression de la p9Ka induit la

tumorigénicité des cellules et induit un phénotype métastatique. Des résultats d'immunofluorescences ont localisé la p9Ka dans le cytosquelette cellulaire favorisant possiblement la motilité et l'invasion des cellules (189,318). Nous avons observé que nos cellules de parathyroïde de rats SHR (SPTC) en culture prolifèrent plus rapidement et à plus haute densité que ces mêmes cellules provenant des rats WKY (WPTC). Le même phénomène d'accélération de la prolifération a été observé pour les VSMC de rats SHR et SHRsp (308,309). De plus, l'expression de HCaRG est plus accentuée dans les cellules SPTC que les cellules WPTC. Une observation semblable pour la PTH a été faite par le groupe de Nygren (319) dans des cellules de parathyroïde de boeuf en culture. Une hyperplasie des cellules s'installait après 4 jours de culture accompagnée d'une régulation anormale de la sécrétion de la PTH en présence d'une concentration de calcium extracellulaire faible (0,5mM). Particulièrement, ces observations ressemblent à celles de Rudberg *et al.* (320) qui ont noté que des cellules de parathyroïdes en culture provenant de patients atteints d'hyperparathyroïdie primaire présentaient ce profil anormal. Ces observations pourraient impliquer HCaRG dans les changements morphologiques des cellules parathyroïdiennes et par conséquent HCaRG pourrait jouer un rôle dans l'état d'hyperprolifération qui est observé chez ces patients.

L'expression de HCaRG a été initialement montrée dans la glande parathyroïde de rats (annexe 1, p.XII). Par la suite, nous avons analysé son profil d'expression chez l'humain et avons constaté que HCaRG est aussi exprimé dans la glande parathyroïde normale et dans des parathyroïdes de patients atteints d'hyperparathyroïdie primaire et secondaire (figure 6b). Cryns *et al.* (321) ont montré que 40% des adénomes parathyroïdiens qu'ils ont étudiés avaient perdu des séquences alléliques de DNA de leur chromosome 1. En effet, il semble qu'une perte de régions du chromosome 1, particulièrement la région 1q32, dans des adénomes de parathyroïdes humaines est très fréquent (321). Toutefois, suite à la localisation chromosomique de HCaRG sur le chromosome 7 du rat une analyse synténique a permis de localiser HCaRG sur le chromosome 8 humain q21-24. La synténie signifie une groupe de loci ayant des séquences



identiques se retrouvant chez le rat et chez l'humain dans le même ordre. Nous avons effectué une recherche de la région synténique chez l'humain correspondant à la région chromosomique entre les marqueurs CYP11B2 et Myc du chromosome 7 du rat. Cryns *et al.* (321) suggèrent qu'il y a peut être un gène candidat agissant comme supresseur de tumeur dans la région 1p32. Par ailleurs, il a été démontré que les rats SHR en plus d'être hypertendus souffrent d'hyperparathyroïdie (75). Il est possible que le chromosome 1 ne soit pas impliqué dans les hyperparathyroïdies observées chez les rats SHR mais il est particulier qu'une perte du bras 1p est commun à d'autres cancers tels le phéochromocytome (322), le cancer du colon (323) et le cancer du sein (324) où, en plus, HCaRG est exprimé.

Une recherche subséquente de maladies humaines déjà localisées dans la région q21-24 du chromosome 8 a révélé qu'un carcinome rénal familial est situé dans ce locus. Cette maladie est héritée de façon autosomale dominante avec une pénétrance qui est dépendante de l'âge (325). Une association existe entre la maladie et une translocation 3;8 avec une point de bris aux locus 3p14.2 et 8q24.1. La probabilité à développer un carcinome rénal avant l'âge de 60 ans chez les patients qui ont cette translocation est de 87% (325). Nous n'avons démontré aucune homologie de séquence de HCaRG avec les protéines déjà identifiées et inscrites dans les banques (SwissProtein). Mais il est intéressant de noter que HCaRG semble exprimé dans plusieurs tumeurs notamment un cancer du sein et du colon tout comme la famille des protéines S100 (figure 7a). De plus, il est situé dans un locus où se situe un cancer du rein suggérant peut être la participation de HCaRG dans les phénomènes néoplasiques.

## **2. Métabolisme du calcium dans l'hypertension**

### **2.1. Hormones calciotropiques et la glande parathyroïde**

L'implication de la parathormone (PTH), de la vitamine D (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>), du CGRP et de la calcitonine dans le métabolisme du calcium est bien connue. En plus, plusieurs études suggèrent des propriétés vasoactives pour ces molécules

(23,59,88,276,326-330). Rappelons que le calcium est un stimulus majeur pour la contraction des VSMC (3,4,23,54,122,123). Il est donc possible que ces hormones soient impliquées dans le contrôle de la pression artérielle. La PTH est reconnue comme étant un vasodilatateur important (59). Il est donc paradoxal qu'elle soit impliquée dans l'élévation de la pression artérielle. Par contre, la parathyroïdectomie chez les humains et les rats hypertendus abaisse la pression artérielle impliquant son rôle dans le maintien d'une pression artérielle élevée (331). De plus, une augmentation de la pression artérielle est notée chez des rats normotendus à qui il a été transplanté des parathyroïdes de rats hypertendus. Inversement, une baisse de la pression est observée chez des rats hypertendus à qui il a été transplanté des parathyroïdes de rats normotendus (331).

La concentration de calcium cytosolique dans les plaquettes de patients atteints d'hyperparathyroïdie primaire sans hypertension et hypertendus est plus élevée que celle des témoins normaux (300). Finalement, les niveaux de PTH sont élevés chez les humains hypertendus (23,112,272,273) ainsi que chez le rat SHR (23,332) comparativement à leurs témoins normotendus respectifs. Contrairement à l'effet hypotenseur dose-dépendant causé par une injection intraveineuse de PTH, le groupe de Kishimoto (276) a démontré que des rats infusés de façon chronique avec de la PTH répondent plus fortement aux agents vasoconstricteurs e.g. la norépinéphrine ce qui pourrait expliquer l'action hypertensive de la PTH.

Le groupe de Lewanczuk (280) a récemment isolé un facteur d'origine parathyroïdienne qui présente des propriétés vasoactives. Ils ont nommé ce facteur, le PHF signifiant *Parathyroid Hypertensive Factor*. Le PHF est capable d'augmenter les niveaux de calcium intracellulaire des VSMC (280), est présent en plus grande quantité dans la circulation sanguine des rats SHR comparativement aux rats WKY (280), est capable d'augmenter la pression artérielle lorsqu'injecté à des rats normotendus (281) et est régulé négativement par le calcium extracellulaire (282). Par ailleurs, HCaRG est exprimé en plus grande quantité dans la parathyroïde de rats SHR et son expression est régulée négativement par le calcium extracellulaire comme celle de la PTH dans des cellules de

parathyroïdes de rats SHR et WKY (annexe 1, p.XI). Tout comme la PTH et le PHF, HCaRG à initialement été isolé de la parathyroïde. Étant donné les propriétés vasoactives de la PTH et du PHF il est possible que d'autres peptides originant de la parathyroïde aient des propriétés semblables. Vu la régulation du mRNA de HCaRG par le calcium extracellulaire comme la PTH et son expression accrue dans les parathyroïdes de rats SHR comparativement aux rats WKY, il est possible que HCaRG soit impliqué dans des mécanismes dépendants du calcium qui sont anormaux dans l'hypertension artérielle.

Depuis que le groupe de Brown (162) a cloné et caractérisé le récepteur du calcium d'une parathyroïde bovine (BoPCaR1) cela a permis de mieux comprendre le mécanisme par lequel la parathyroïde est capable de détecter les variations de calcium extracellulaire et par le fait même d'impliquer ce récepteur dans les pathologies. Il a été suggéré que la maladie héréditaire l'hypercalcémie néonatale sévère (HNS) est causée par trois mutations dans le récepteur du calcium (CaR) dans les parathyroïdes et les reins de ces patients. Une de ces trois mutations est capable d'inactiver le récepteur lorsqu'exprimé dans des ovocytes de grenouille, *Xenopus laevis* (162). Une hyperprolifération de la parathyroïde est observée chez ces patients impliquant que la voie de signalisation du CaR est importante non seulement pour la régulation de la sécrétion de la PTH mais aussi possiblement pour la modulation de la prolifération des cellules de la parathyroïde (169). Le groupe de Brown a alors suggéré que le CaR agirait comme supresseur de tumeur (169).

L'adénome parathyroïdien est responsable de 75-80% (333) des cas d'hyperparathyroïdie primaire tandis que l'hyperplasie des cellules principales de la parathyroïde d'environ 15% (334) et les carcinomes de la parathyroïde d'environ 1-2% (335). L'hyperparathyroïdie secondaire résulte de l'insuffisance rénale progressive. La rétention de phosphore dans l'insuffisance rénale semble être responsable de l'hypocalcémie observé chez ces patients en diminuant entre autres la production de la  $1,25\text{ (OH)}_2\text{D}_3$  rénale. Dans tous les cas, il y a augmentation du volume des parathyroïdes, dérèglement de la sécrétion de la PTH et subséquemment une diminution de la concentration de calcium plasmatique (335b). De plus, l'hyperparathyroïdie primaire est

associée à l'hypertension dans environ 22-50% des cas (277,336). Nous avons démontré l'expression de HCaRG dans une hyperparathyroïdie primaire et secondaire. D'après sa séquence, HCaRG n'est probablement pas une protéine transmembranaire donc HCaRG n'est vraisemblablement pas un détecteur de calcium. Toutefois, l'expression de HCaRG est modulée de la même façon que la PTH, c.-à-d. est augmentée en présence de calcium extracellulaire faible et diminuée en présence de calcium extracellulaire élevé. Il est intéressant de noter que HCaRG est encore exprimé dans des cellules dont la prolifération est exagérée. L'expression de HCaRG dans trois pathologies (l'hypertension, l'hyperparathyroïdie et la néoplasie) ayant comme point commun l'hyperprolifération devrait nous initier à explorer le rôle de HCaRG dans les phénomènes de prolifération cellulaire.

## **2.2. Densité osseuse dans l'hypertension**

La densité osseuse et le contenu en calcium, sont équivalents chez les rats SHR et WKY de jeune âge et tendent à décroître avec l'âge et ce plus significativement chez les SHR que les WKY (275). Une diminution de la densité osseuse est aussi observée chez des humains hypertendus comparativement aux normotendus (23,216,261,275). La minéralisation osseuse est nécessairement dépendante de la disponibilité du calcium dans la circulation sanguine. En effet, une diminution du contenu en protéines liant le calcium dans l'intestin et le rein observée chez le SHR, favoriserait une diminution de l'absorption de calcium par ces deux organes et par conséquent, une diminution de la densité osseuse (23,75,216). Les rats SHR sont aussi connus pour avoir une concentration de calcium plasmatique faible, sûrement due à une diminution de l'absorption intestinale ou rénale de calcium.

Il est intéressant de noter que la localisation chromosomique de HCaRG sur le chromosome 8 humain q21-q24 (figure 10), est dans un locus exprimant entre autres des pathologies des os. En effet, l'ostéopétrose (déficiency en CA II) est une maladie caractérisée par une diminution de la résorption osseuse, une acidose rénale ainsi que des

calcifications du cerveau (68,337). Cette maladie est transmise de façon autosomale récessive. Une déficience en anhydrase carbonique II (CA II) n'expliquerait qu'un des neuf types d'ostéopétrose chez l'humain (68). Les patients affectés de cette maladie sont diagnostiqués en bas âge dû, entre autres, à un retard de développement et de croissance, à une petite taille et à une fréquence de fractures (68). Le syndrome de déficience en CA II a permis de découvrir que l'activité de l'enzyme CA II est importante pour les fonctions physiologiques des os, des reins et du cerveau (338). Plusieurs isoenzymes de l'anhydrase carbonique existent mais la CA II est la plus largement exprimée. On la retrouve dans divers tissus d'humain tels les os, les reins, le cerveau et les érythrocytes (339). L'activité de la CA II est stimulée par la PTH dans les ostéoclastes (340). L'activité de la CA II dans les ostéoclastes serait responsable de la production de  $H^+$  à partir de  $H_2CO_3$ . La production d'acide est nécessaire pour la résorption osseuse par les ostéoclastes. Dans le rein, la CA II serait responsable de la réabsorption de  $HCO_3^-$  et de l'excrétion de  $H^+$ . Une défaillance de CA II à ce niveau explique l'acidose métabolique due à l'incapacité du rein à excréter le surplus d'acide (68). La CA II est considérée comme gène candidat pour la maladie de déficience en CA II (68). Il a été localisé sur le chromosome humain 8q22.

### **2.3. Protéines intracellulaires liant le calcium dans l'hypertension**

La calmoduline est la protéine liant le calcium la plus étudiée dans l'hypertension artérielle due au fait qu'elle est impliquée dans plusieurs processus cellulaires qui sont anormaux dans l'hypertension tels la contraction des VSMC, la prolifération cellulaire, la sécrétion hormonale, les flux de calcium et le métabolisme du cAMP (1,9,42,125,126,188,260,261). Les niveaux de calmoduline sont diminués dans le cerveau, le coeur, l'aorte et le rein des rats SHR par rapport aux WKY (41). Rappelons que les niveaux des calbindines sont aussi diminués chez les SHR (41). En effet, la CaBP9K intestinale et la CaBP28K rénale sont toutes deux diminuées chez les SHR. Toutes ces protéines lient le calcium avec une grande affinité via leur motif *EF-hand*. Nous avons noté la présence d'un motif apparenté à l'*EF-hand*, c-à-d. 8 sur 12 acides aminés les plus

conservés dans la séquence de HCaRG. Le motif EF-hand est aussi un motif de dimérisation. Cette dimérisation semble augmenter l'affinité du site pour le calcium (201). Étant donné que HCaRG ne possède qu'un motif EF-hand, le site peut possiblement lier le calcium mais avec une plus faible affinité. En revanche, HCaRG possède un contenu de 67% en hélice  $\alpha$  compatible avec une activité de dimérisation. Par transcription couplée à la traduction *in vitro*, nous avons démontré que la protéine HCaRG a une taille d'environ 27KDa lorsque soumise à une électrophorèse sur gel dénaturant SDS-PAGE en présence de  $\beta$ -mercaptoéthanol (figure 8). Par contre, sur le même gel mais en absence d'agent dissociant, nous observons une bande supplémentaire d'environ le double de la taille, c.-à-d. 43KDa (figure 8). Ces résultats suggèrent donc que HCaRG est capable de dimériser et qu'il est possible que cette dimérisation favorise la liaison du calcium.

Étant donné que la concentration cytosolique de calcium est maintenue à un niveau très faible (100nM), environ 98-99% du calcium qui entre dans la cellule doit être séquestré ou tamponné. La nécessité d'avoir des protéines liant le calcium avec une faible affinité (protéine tampon) dans le cytoplasme cellulaire permet une liaison rapide du calcium qui entre dans le cytosol pour par la suite être séquestré dans les organelles intracellulaires (e.g. réticulum endoplasmique) (341). Les sites de liaison de calcium de faible affinité de ces protéines ont toutefois une capacité de liaison élevée (3). Elles sont impliquées principalement dans le contrôle des niveaux de calcium intracellulaire et agissent probablement en synergie avec les protéines liant le calcium de haute affinité. De plus, elles peuvent participer à l'activation de protéines qui modulent les réponses biologiques de la cellule (342). La motilité des protéines tampons est aussi importante pour la durée de la signalisation par le calcium. En effet, lorsque le calcium entre dans la cellule, il a tendance à demeurer à proximité de son site d'entrée. Un tampon mobile pourra alors disperser le calcium à travers la cellule et donc limiter son action alors qu'un tampon immobile va immobiliser le calcium et aura tendance à prolonger la durée du signal (341). Des études d'expression présentement en cours dans notre laboratoire permettent de déterminer si HCaRG est bien une protéine de liaison du calcium comme le suggère sa structure.

L'expression de HCaRG n'est pas ubiquitaire (il n'est pas exprimé dans le foie, dans les poumons, ni dans les ventricules cardiaques de rat, annexe 1, p.XIII) mais est exprimé dans une variété de tissus suggérant que son rôle dans la cellule peut être relié à des processus biologiques importants.

HCaRG est aussi exprimé dans les lymphocytes d'humains hypertendus (figure 7b). Une protéine appartenant à la famille des S100, la pEL98, est aussi exprimée dans les plusieurs cellules circulantes notamment dans les lymphocytes humains (190). Cette protéine est exprimée en grande quantité dans le cytoplasme. Ce même groupe a vérifié l'association de cette protéine avec la motilité cellulaire et la capacité d'invasion car ils avaient démontré précédemment que la pEL98 pouvait s'associer *in vitro* à une protéine du cytosquelette dans un contexte dépendant du calcium (343). Par ailleurs, une corrélation très étroite existe entre l'expression de la pEL98, la motilité et l'invasion cellulaire dans plusieurs lignées de cellules normales et cancéreuses (344). HCaRG étant possiblement une protéine cytosolique pourrait être impliqué dans les processus de motilité et peut être même d'invasion. Les lymphocytes sont un matériel biologique qui est plus aisément accessible chez l'humain. Ainsi, il est souvent possible d'en obtenir en grande quantité pour permettre des études fonctionnelles de HCaRG et aussi pour des analyses génétiques.

### **3. La sécrétion, le calcium et l'hypertension artérielle**

#### **3.1. Calcium et exocytose**

Le métabolisme du calcium est très important pour le processus de sécrétion des glandes endocrines et exocrines (7,41). La sécrétion de neurotransmetteurs, la sécrétion des cathécolamines par les surrénales, la sécrétion d'insuline par le pancréas sont tous des processus dépendants du calcium. Plusieurs protéines liant le calcium ont été associées à ces différents processus. Le calcium, qui est aussi un second messenger intracellulaire, médie plusieurs réponses biologiques suite à la stimulation des glandes endocrines et exocrines (6,30).

### *La parathyroïde*

HCaRG semble exprimé dans plusieurs glandes sécrétrices chez le rat et chez l'humain. L'expression de HCaRG a été initialement démontrée dans la glande parathyroïde de rat avec une plus grande abondance chez les rats SHR que WKY (annexe 1, p.XI). Rappelons que les rats SHR ont un niveau de PTH plasmatique élevé dû probablement à une hyperplasie de la parathyroïde observée chez ces rats (75). Des niveaux de PTH similaires et la présence d'hyperplasie de la parathyroïde se retrouve aussi chez environ 15% des patients atteints d'hyperparathyroïdie primaire (334). Nous avons démontré que HCaRG est exprimé dans la parathyroïde de ces patients (figure 6b) ainsi que dans une parathyroïde normale (figure 6a). Nous avons opté pour la technique de RT-PCR, une technique extrêmement sensible, pour la détection de l'expression de HCaRG car nos études préliminaires, chez le rat, ont démontrées que HCaRG n'était que faiblement détectable par la technique de buvardage de type Northern. HCaRG pourrait être impliqué dans la sécrétion hormonale anormale de ces organes présent dans l'hypertension. En effet, il est possible que l'hyperprolifération de cellules synthétisant HCaRG dans la parathyroïde soient responsable de l'hyperexpression de HCaRG chez les SHR comparativement aux WKY.

### *Le pancréas*

Chez l'humain, HCaRG est exprimé dans la portion endocrine du pancréas c.-à-d. les îlots de Langherans (figure 6c). Par ailleurs, son expression semble aussi intense que dans la parathyroïde normale. Une protéine liant le calcium provenant de la famille des S100, la calcycline favorise la sécrétion d'insuline par des îlots perméabilisés (31). La régulation du processus de sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  du pancréas semble être dépendante du calcium et HCaRG pourrait être un participant important. Des patients souffrant du diabète ont souvent le même profil ionique que les patients souffrant d'hypertension artérielle. Effectivement, des sujets diabétiques hypertendus ou non ont des niveaux de calcium cytosoliques plus élevés que les normotendus non diabétiques



(345,346). Par ailleurs, les niveaux intracellulaires de calcium augmentent dans les VSMC en culture stimulées avec différentes concentrations de glucose (347). Des complications rénales se développent autant chez les diabétiques que chez les hypertendus (348). L'hyperinsulinémie et la résistance à l'insuline sont aussi deux états que les diabétiques obèses partagent avec les hypertendus. Un des liens existant entre l'hypertension et l'hyperinsulinémie est l'augmentation de la pression artérielle par l'insuline. L'insuline est un facteur de croissance qui agit via sa liaison avec un récepteur membranaire qui a une activité tyrosine kinase associée (349). Les voies de signalisation initiées par la phosphorylation de tyrosines impliquent des modifications de la concentration de calcium intracellulaire. Ces modifications de calcium suscitent différentes réponses biologiques comme la croissance et la prolifération cellulaire (346). Les anomalies du maintien de la concentration de calcium cytosolique rencontrées dans l'hypertension et le diabète peuvent être responsables des anomalies de prolifération dans ces maladies (350). L'hypersecretion d'insuline observée chez ces patients menant à un état d'hypertension peut possiblement impliquer HCaRG. L'expression de HCaRG est élevée dans le pancréas et le stimulus de la sécrétion de l'insuline par le pancréas semble être un processus dépendant du calcium (31).

### *La surrenale*

La médullosurrénale est la région de la glande surrenale responsable de la sécrétion des cathécolamines (adrénaline, noradrénaline). Un des effets de ces hormones est d'augmenter la pression artérielle. En effet, l'activité du système nerveux sympathique, qui est responsable de la sécrétion des neurotransmetteurs, est augmentée chez certains individus hypertendus (351). Le phéochromocytome est une tumeur qui affecte les cellules chromaffines de la médullosurrénale. La présence de cette tumeur induit une hypersecretion des cathécolamines et provoque des crises hypertensives incontrôlées (352). Le signal principal pour la sécrétion des cellules chromaffines bovines est la concentration de calcium intracellulaire. Celle-ci augmente de 6 à 10 fois sa valeur basale lorsque les cellules sont stimulées (7). La variété de récepteurs qui stimulent l'exocytose des granules

chromaffines (e.g. récepteurs à l'angiotensine II, à l'endothéline, nicotiniques) sont liés à des changements de la concentration intracellulaire de calcium. Ces changements sont dus soit à l'entrée de calcium du milieu extérieur soit à la libération de calcium des stock intracellulaires suite à la production d'IP<sub>3</sub> (6). C'est le calcium extracellulaire plutôt qu'intracellulaire qui active le processus d'exocytose car la sécrétion par les cellules chromaffines bovines est abolie lorsque le calcium extracellulaire est retiré du milieu.

Plusieurs protéines liant le calcium sont impliquées dans le processus stimulus-sécrétion des cellules chromaffines de la surrénale (6,32). Entre autres, la synexine est capable d'induire l'agrégation des granules chromaffines bovines en présence de calcium (352) *in vitro* suggérant que cette protéine peut favoriser les interactions membranaires lors de l'exocytose. En fait, Cardenas *et al.* (32) ont déterminé qu'une diminution du contenu en synexine dans les cellules chromaffines diminuait la capacité de sécrétion de ces cellules impliquant cette protéine dans ce processus. La protéine annexine II (calpactine), qui lie le calcium avec une affinité plus faible, est aussi capable d'induire l'agrégation des granules chromaffines suite à leur stimulation par un agoniste (194,354). Des évidences récentes suggèrent que l'annexine II serait impliquée dans une étape tardive du mécanisme d'exocytose. Il serait un participant ou un modulateur potentiel du récepteur de calcium qui médie la fusion des membranes (6). HCaRG est exprimé dans la surrénale normale (figure 6a). Étant donné que le processus de stimulus-sécrétion est un processus dépendant du calcium HCaRG pourrait être impliqué dans la modulation de ce processus.

### *Les cellules mammaires*

HCaRG est aussi exprimé dans le sein normal (figure 7a). Il a été démontré que la prolifération des cellules mammaires en culture peut être modulée par le calcium extracellulaire. En présence d'une concentration de calcium faible (0,046mM), les cellules mammaires prolifèrent plus rapidement et leur longévité est prolongée en comparaison avec des cellules incubées en présence de 0,46mM de calcium extracellulaire (355). Le mécanisme par lequel ces cellules détectent les variations de calcium n'est pas encore

élucidé. Le calcium est aussi essentiel pour la différenciation de l'épithélium de la glande mammaire induite par la prolactine. Contrairement à la prolifération, une diminution de la concentration de calcium extracellulaire réduit la synthèse des RNA et inhibe la production de protéines du lait par des glandes mammaires en culture (33). L'expression de HCaRG étant régulé négativement par le calcium extracellulaire pourrait être plus important pour la prolifération que pour la différenciation des cellules mammaires. Encore une fois, HCaRG pourrait être associé au phénomène de prolifération dans ces cellules.

### *Les intestins*

Nous avons démontré que HCaRG est exprimé dans le colon et l'iléon humain normal (figure 7a). Une étude de Black *et al.* (34) a démontré une modulation par le calcium des cellules duodénales d'embryon de poussin. En effet, ils ont démontré que des concentrations physiologiques de calcium modulent le taux de différenciation de ces cellules. Fan *et al.* (192) ont étudié la distribution tissulaire chez le rat d'une protéine liant le calcium, la CBP 65/67, faisant partie de la famille des annexines. Elle est localisée dans plusieurs tissus de rat normaux notamment, le pancréas, l'estomac, les intestins, le coeur et le rein. Étant donné que son expression n'est pas limitée à des tissus spécifiques, il est possible que cette protéine soit impliquée dans des fonctions cellulaires basales importantes. HCaRG est aussi exprimé dans une variété de tissus, normaux et pathologiques incluant le colon et l'iléon humain, ce qui pourrait impliquer son importance dans des processus physiologiques importants.

Une infinité de mécanismes cellulaires impliquent le calcium et plusieurs de ces mécanismes sont défectueux dans certaines maladies comme l'hypertension, le cancer, l'athérosclérose (21). HCaRG, étant un gène régulé négativement par le calcium, pourrait participer dans plusieurs de ces processus dans les cellules normales et pathologiques. L'élucidation de la fonction de HCaRG permettra de déterminer son rôle potentiel dans les maladies où des anomalies du métabolisme du calcium sont présents soient l'hypertension artérielle et le cancer.

#### 4. Analyses génétiques de HCaRG

La carte de restriction du gène de HCaRG a permis de révéler un polymorphisme de restriction (RFLP) de 10Kpb entre les souches de rats SHR et BN.*lx* (figure 9a). Le génotypage d'une série de 33 souches de rats recombinantes consanguines (RIS) pour ce RFLP a permis d'observer une distribution des différentes souches des rats RIS en deux groupes. Un groupe de 14 souches qui possèdent l'allèle SHR et un autre groupe de 19 souches qui possèdent l'allèle BN.*lx*. Une analyse de coségrégation de la distribution allélique du RFLP de HCaRG avec celle de 456 marqueurs sur tous les chromosomes des RIS (289) a permis de localiser HCaRG sur le chromosome 7 de rat.

Les poids relatifs du coeur et du rein sont significativement plus élevés pour les rats SHR nouveau-né que les rats BN (356). Par ailleurs, il a été démontré chez le rat adulte que le poids du coeur et du rein sont des traits ayant une plus forte détermination génétique que la pression artérielle (357). La distribution allélique de RFLP de HCaRG a aussi été comparée à celle de différents phénotypes intermédiaires de l'hypertension afin de vérifier s'il existe des corrélations. Trois analyses ont été effectuées, une comprenant toutes les souches de rats RIS, une autre comprenant les RIS issus d'un croisement entre une mère hypertendue et un père normotendu (*SXB*) et une dernière comprenant les RIS issus d'un croisement entre une mère normotendue et un père hypertendu (*BXS*). La raison pour laquelle on analyse les groupes *SXB* et *BXS* séparément est que cela permet de différencier les corrélations entre les phénotypes et les gènes maternel ou paternel ainsi que les gènes hypertendus ou normotendus. L'analyse comprenant tous les RIS n'a révélé aucune association du RFLP de HCaRG avec soit la pression systolique, la pression diastolique, la pression moyenne, le ratio du poids du coeur sur le poids corporel chez le nouveau-né et chez l'adulte ainsi que le ratio du poids du rein sur le poids corporel chez le nouveau-né et chez l'adulte (tableau IV). Par contre, lorsque l'on tient compte seulement des RIS *SXB*, le phénotype ratio du poids du rein sur le poids corporel devient significatif chez le nouveau-né et chez l'adulte (tableau IV). Il est intéressant de noter que le groupe de Dobešová (358), a démontré chez le rat nouveau-né une corrélation positive entre le poids relatif du

coeur et la pression artérielle de leur mère seulement dans le croisement SXB. D'après ces résultats il est possible que HCaRG soit impliqué dans l'hyperplasie du rein observée dans l'hypertension. De plus, le groupe de Dobešová (358) a également démontré qu'il existe une corrélation positive des poids relatifs du coeur et du rein entre les rats nouveau-nés et les rats adultes. Ceci suggère que HCaRG peut être un marqueur de l'hypertrophie rénale dans le développement de l'hypertension artérielle (359).

## V-CONCLUSIONS

Notre groupe de recherche a récemment identifié un nouveau gène régulé négativement par le calcium extracellulaire dont les taux de mRNA sont plus élevés chez le rat génétiquement hypertendu. Nos études de HCaRG de rat et d'humain mis ensemble nous ont permis d'observer un certain lien avec le calcium. Nous avons démontré chez le rat, que l'expression de HCaRG est régulée négativement par le calcium extracellulaire et par deux systèmes hormonaux particuliers, la voie de la PKC (stimulée par la PMA) et la voie des stéroïdes (stimulée par la dexaméthasone). Nous avons également observé que le motif apparenté au *EF-hand* (motif de liaison du calcium) est conservé dans la séquence humaine et de rat nous suggérant une activité de liaison du calcium. Par ailleurs, nos études en cours dans le laboratoire examinent le rôle de la protéine HCaRG dans la liaison du calcium. Nous avons localisé le gène de HCaRG sur le chromosome 8 humain q21-24 dans une région qui exprime deux groupes de pathologies des os et des reins.

Nos études nous ont permis de démontrer que HCaRG est également exprimé dans la parathyroïde humaine tout comme cela avait été initialement démontré chez le rat. Nous avons aussi montré que HCaRG est exprimé dans plusieurs tissus humains normaux et pathologiques (hypertension, cancer). Particulièrement, HCaRG semble exprimé dans plusieurs glandes sécrétrices humaines notamment la parathyroïde, le pancréas, la surrénale et le sein suggérant une activité de HCaRG dans le processus de sécrétion qui est un mécanisme dépendant du calcium. Le profil de l'expression de HCaRG nous permettra, entre autre, à faciliter l'identification des rôles de HCaRG. Des études fonctionnelles préliminaires de HCaRG ont été entreprises en particulier sur l'effet de la surexpression de HCaRG sur l'activité des transporteurs d'ions. HCaRG semble inhiber l'activité du cotransporteur  $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$  lorsque les cellules sont soumises à un choc hyperosmotique impliquant un rôle pour HCaRG dans la modulation du cotransporteur. L'expression de HCaRG est accrue dans les cellules de parathyroïdes de rats SHR comparativement aux mêmes cellules des rats WKY. Nous avons également démontré que HCaRG est exprimé

dans les lymphocytes d'humains hypertendus. Étant donné que plusieurs anomalies du métabolisme du calcium sont observées dans l'hypertension artérielle humaine et expérimentale, il est possible que HCaRG y soit impliqué.

Les projets futurs du laboratoire consisteront à étudier plus particulièrement la fonction intracellulaire de HCaRG et à identifier ses rôle dans la pathogénie de l'hypertension artérielle.

## VI-RÉFÉRENCES

- 1 Hait, W.N., S. Lazo, *Calmodulin: A potential target for cancer chemotherapeutic agents.*, J. Clin. Oncol., 4;994-1012, 1986.
- 2 Hatton, D.C., Q. Yue, D.A. McCarron, *Mechanisms of calcium's effects on blood pressure.*, Sem. Nephrol., 15;593-602, 1995
- 3 Niki, I., H. Yokokura, T. Sudo, M. Kato, H. Hidaka, *Ca<sup>2+</sup> signaling and intracellular Ca<sup>2+</sup> binding proteins.*, J. Biochem., 120;685-698, 1996
- 4 Bingham Smith, J., *Calcium homeostasis in smooth muscle cells.*, New Horizons, 4;2-18, 1996.
- 5 Mailland, M., R. Waelchli, M. Ruat, H.G. Boddeke, K. Seuwen, *Stimulation of cell proliferation by calcium and a calcimimetic compound.*, Endocrinology, 138;3601-3605, 1997.
- 6 Burgoyne, R.D., *Control of exocytosis in adrenal chromaffin cells.*, Biochim. Biophys. Acta, 1071;174-202, 1991.
- 7 Stauderman, K.A., M.M. Murawsky, R.M. Pruss, *Agonist-dependent patterns of cytosolic Ca<sup>2+</sup> changes in single bovine adrenal chromaffin cells: Relationship to catecholamine release.* Cell. Reg., 1;683-691, 1990.
- 8 Bajjalieh, S.M., R.H. Scheller, *The biochemistry of neurotransmitter secretion.*, J. Biol. Chem., 270;1971-1974, 1995.
- 9 Cox, J.A., M. Comte, E.A. Stein., *Activation of human erythrocyte Ca<sup>2+</sup>-dependent Mg<sup>2+</sup>-activated ATPase by calmodulin and calcium: Quantitative analysis.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 79;4265-4269, 1982.
- 10 Touyz, R.M., F.J. Milne, *Alterations in intracellular cations and cell membrane ATPase activity in patients with malignant hypertension.*, J. Hypertens., 13;864-874, 1995.
- 11 Hepler, P.K., *The role of calcium in cell division.*, Cell calcium, 16;322-330, 1994.



- 12 Catalioto, R.M., A.R. Renzetti, M. Criscuoli, L. Morbidelli, A. Subissi, *Role of calcium in angiotensin II induced prostaglandin release and DNA synthesis in rat vascular smooth muscle cells.*, J. Cardiovasc. Pharmacol., 27;195-200, 1996.
- 13 Brown, E.M., *Extracellular  $Ca^{2+}$  sensing, regulation of parathyroid cell function, and role of  $Ca^{2+}$  and other ions as extracellular (first) messengers.*, Physiol. Rev., 71;371-411, 1991.
- 14 Wu, C-C., D.F. Bohr, *Mechanisms of calcium relaxation of vascular smooth muscle.*, Am. J. Physiol., 261;H1411-H1416, 1991.
- 15 Pörsti, I., P. Arvola, H. Wuorela, H. Vapaatalo, *High calcium diet augments vascular potassium relaxation in hypertensive rats.*, Hypertension, 19;85-92, 1992.
- 16 Shahani, K., S.M. Kaup, *Métabolisme du calcium: aperçu.*, Nutrition actualité, 13;47-65, 1989.
- 17 Dominiczak, A.F., D.F. Bohr, *Cell membrane abnormalities and the regulation of intracellular calcium concentration in hypertension.*, Clin. Sci., 79;415-423, 1990.
- 18 Jackson, T., *Structure and function of G protein coupled receptors.*, Pharmac. Ther., 50;425-442, 1991.
- 19 Neer, E.J., D.E. Clapham, *Roles of G protein subunits in transmembrane signalling.*, Nature, 333;129-134, 1988.
- 20 Berridge, M.J., R.F. Irvine, *Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction.*, Nature, 312;315-321, 1984.
- 21 McCarty, M.F., *Up-regulation of intracellular signalling pathways may play a central pathogenic role in hypertension, atherogenesis, insulin resistance and cancer promotion-the "PKC syndrome".*, Medical Hypoth., 46;191-221, 1996.
- 22 Kilhoffer, M-C., J. Haiech, J. Demaille, *Ion binding to calmodulin. A comparison with other intracellular calcium-binding proteins.*, Molec. Cell. Biochem., 51;33-54, 1983.
- 23 Oshima, T., E.W. Young, *Systemic and cellular calcium metabolism and hypertension.*, Sem. Nephrol., 15;496-503, 1995.

- 24 Zicha, J., *Red cell ion transport abnormalities in experimental hypertension.*, Fundam. Clin. Pharmacol., 7;129-141, 1993.
- 25 Rusch, N.J., K. Hermsmeyer, *Calcium currents are altered in the vascular muscle cell membrane of spontaneously hypertensive rats.*, Circ. Res., 63;997-1002, 1988.
- 26 Kahn, A.M., H. Shelat, J.C. Allen, *Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange is present in sarcolemmal vesicles from dog superior mesenteric artery.*, Am. J. Physiol., 250;H313-H319, 1986.
- 27 Williamson, J.R., *Inositol lipid metabolism and intracellular signalling mechanisms.*, News Physiol. Sci., 1;72-76, 1986.
- 28 Rasmussen, H., Y. Takuwa, S. Park, *Protein kinase C in the regulation of vascular smooth muscle contraction.*, FASEB J., 1;177-185, 1987.
- 29 Rozengurt, E., S.A. Mendoza, *Early stimulation of Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> antiport, Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pump activity and Ca<sup>2+</sup> fluxes in fibroblast mitogenesis.*, Curr. Topics Membr. Trans., 27;163-191, 1986.
- 30 Hutton, J.C., *Calcium-binding proteins and secretion.*, Cell Calcium, 7;339-352, 1986.
- 31 Okazaki, K., I. Niki, S. Iino, S. Kobayashi, H. Hidaka, *A role of calyculin, a Ca<sup>2+</sup>-binding protein, on the Ca<sup>2+</sup>-dependent insulin release from the pancreatic  $\beta$  cell.*, J. Biol. Chem., 269;6149-6152, 1994.
- 32 Cardenas, A.M., G.A.J. Kuijpers, H.B. Pollard, *Effect of protein synthesis inhibitors on synexin levels and secretory response in bovine adrenal medullary chromaffin cells.*, Biochim. Biophys. Acta, 1234;255-260, 1995.
- 33 Wilde, C., H.R. Hasan, D.A. White, R.J. Mayer, *The effect of calcium on synthesis and degradation of mammary cytosolic proteins and casein.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 103;934-942, 1981.
- 34 Black, B.L., J.E. Smith, *Regulation of goblet cell differentiation by calcium in embryonic chick intestine.*, FASEB J., 3;2653-2659, 1989.

- 35 Lipscombe, D., D.V. Madison, M. Poenie, H. Reuter, R.Y. Tsien, R.W. Tsien, *Spatial distribution of calcium channels and cytosolic calcium transients in growth cones and cell bodies of sympathetic neurons.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85;2398-2402, 1988.
- 36 Blaustein, M.P., *Calcium transport and buffering in neurons.*, Trends Neurosci., 11;438-443, 1988.
- 37 Cole, K., E. Kohn, *Calcium mediated signal transduction: biology, biochemistry, and therapy.*, Cancer and Metastasis Reviews, 13;31-44,1994.
- 38 Hamet, P., *Cancer and hypertension. An unresolved issue.*, Hypertension, 28;321-324, 1996.
- 39 Kerr, J.F.R., A.H. Willie, A.R. Currie., *Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.*, Br. J. Cancer., 26;239-257, 1972.
- 40 Meyer, P., *Increased intracellular calcium: From hypertension to cancer.*, J. Hypertens., 5, suppl 4;S3-S4, 1987.
- 41 Orlov, S.N., J-M. Li, J. Tremblay, P. Hamet, *Genes of intracellular calcium metabolism and blood pressure control in primary hypertension.*, Sem. Nephrol., 15;569-592, 1995.
- 42 Means, A.R., *Calcium, calmodulin and cell cycle regulation.*, FEBS Lett., 347;1-4, 1994.
- 43 Boynton, A.L., J.F. Whitfield, J.P. MacManus, *Calmodulin stimulates DNA synthesis by rat liver cells.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 95;745-749, 1980.
- 44 Takuwa, N., A. Iwamoto, M. Kumada, K. Yamashita, Y. Takuwa, *Role of calcium influx in bombesin-induced mitogenesis in Swiss 3T3 fibroblasts.*, J. Biol. Chem., 266;1403-1409, 1991.
- 45 Ko, Y.D., A. Sachinidis, G.H. Graack, M. Appenheimer, A.J. Wiczorek, R. Düsing, H. Vetter, *Inhibition of angiotensin II and platelet-derived growth factor-induced vascular smooth muscle cell proliferation by calcium entry blockers.*, Clin. Invest., 70;113-117, 1992.

- 46 Bevan, R.D., E. Van Marthens, J.A. Bevan, *Hyperplasia in vascular smooth muscle cells in vascular disease*, Circ. Res., 38, suppl 2;58-62, 1976.
- 47 Folkow, B., "Structural factor" in primary and secondary hypertension., Hypertension., 16;89-101, 1990.
- 48 Barrett, T.B., E.P. Benditt, *Platelet-derived growth factor gene expression in human atherosclerotic plaques and normal artery wall.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 85;2810-2814, 1988.
- 49 Sachinidis, A., R. Locher, W. Vetter, D. Tatje, J. Hoppe, *Different effects of platelet-derived growth factor isoforms on rat vascular smooth muscle cells.*, J. Biol. Chem., 265;10238-10243, 1990.
- 50 Yamada, H., J. Mizuguchi, M. Nakinishi, *Antigen receptor-mediated calcium signals in B cells as revealed by confocal fluorescence microscopy.*, FEBS lett., 284;249-251, 1991.
- 51 Ilg, E.C., B.W. Schäfer, C.W. Heizmann, *Expression pattern of S100 calcium-binding proteins in human tumors.*, Int. J. Cancer, 68;325-332, 1996.
- 52 Sowers, J.R., M.B. Zemel, P.C. Zemel, P.R. Standley, *Calcium metabolism and dietary calcium in salt sensitive hypertension.*, Am. J. Hypertens., 4;557-563, 1991.
- 53 Bianchi, G., D. Cusi, G. Vezzoli, *Role of cellular sodium and calcium metabolism in the pathogenesis of essential hypertension.*, Sem. Nephrol., 8;110-119, 1988.
- 54 Motley, E.D., R.J. Paul, M.A. Matlib, *Role of Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchange in the regulation of vascular smooth muscle tension.*, Am. J. Physiol., 264;H1028-H1040, 1993.
- 55 Ferrandi, M., P. Manunta, S. Balzan, J.M. Hamlyn, G. Bianchi, P. Ferrari, *Ouabain-like factor quantification in mammalian tissues and plasma. Comparison of two independent assays.*, Hypertension, 30;886-896, 1997.
- 56 Bara, M., A. Guiet-Bara, J. Durlach, *Regulation of sodium and potassium pathways by magnesium in cell membranes.*, Magnes. Res., 6;167-177, 1993.
- 57 Quamme, G.A., *Control of magnesium transport in the thick ascending limb.*, Am. J. Physiol., 256;F197-F210, 1989.

- 58 Watson, P.H., D.A. Hanley, *Parathyroid hormone: regulation of synthesis and secretion.*, Clin. Invest. Med., 16;58-77, 1992.
- 59 Bukoski, R.D., D. Kremer, *Calcium-regulating hormones in hypertension: vascular actions.*, Am. J. Clin. Nutr., 54;220S-226S, 1991.
- 60 Friedlander, G., C. Amiel, *Cellular mode of action of parathyroid hormone.*, Adv. Nephrol., 23;265-279, 1994.
- 61 Theofan, G., A.P. Nguyen, A.W., Norman, *Regulation of calbindin-28K gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> is correlated to receptor occupancy.*, J. Biol. Chem., 261; 16943-16947, 1986.
- 62 Kowarski, S., L.A. Cowen, M.T. Takahashi, D. Schachter, *Tissue distribution and vitamin D dependence of IMCAL in the rat.*, Am. J. Physiol., 253;G411-G419, 1987.
- 63 Bindels, R.J.M., *Active Ca<sup>2+</sup> transport in primary cultures of rabbit kidney CCD: Stimulation by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and PTH.*, Am. J. Physiol., F799-F807, 1991.
- 64 Weisinger, J.R., M.J. Favus, C.B. Langman, D.A. Bushinsky, *Regulation of 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> by calcium in the parathyroidectomized, parathyroid hormone replete rat.*, J. Bone Mineral Res., 4;929-935, 1989.
- 65 Marx, S.J., U.A. Liberman, C.A. Eil, *Calciferols: actions and deficiencies in actions.*, Vitamins Hormones, 40;235-308, 1983.
- 66 Nijweide, P.J., E.H. Burger, J.H.M. Feyen, *Cells of bone: proliferation, differentiation, and hormonal regulation.*, Physiol. Rev., 66;855-886, 1986.
- 67 Kurokawa, K., *The kidney and calcium homeostasis.*, Kidney Int., 45;S97-S105, 1994.
- 68 Whyte, M.P., *Carbonic anhydrase II deficiency.*, Clin. Orthopaed. Rel. Res., 294;52-63, 1993.
- 69 Suda, T., N. Udagawa, I. Nakamura, C. Miyaura, N., Takahashi, *Modulation of osteoclast differentiation by local factors.*, Bone, 17;87S-91S, 1995.

- 70 Roodman, G.D., *Advances in bone biology: The osteoclast.*, Endocrine Rev., 17;308-332, 1996.
- 71 Martin, T.J., K.W. Ng, *Mechanism by which cells of the osteoblast lineage control osteoclast formation and activity.*, J. Cell. Biochem., 56;357-366, 1994.
- 72 Juppner, H., A.B. Abou-Samra, M. Freeman, X.F. Kong, E. Schipani, J. Richards, L.F. Kolakowski Jr., J. Hock, J.T. Potts Jr., H.M. Kronenberg, *A G-protein-linked receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide.*, Science, 254;1024-1026, 1991.
- 73 Feyen, J.H., P. Elford, F.E. Dipadova, U. Trechsel, *Interleukin-6 is produced by bone and modulated by parathyroid hormone.*, J. Bone Miner. Res., 4;633-638, 1989.
- 74 Mac Carthy, E.P., W. Yamashita, A. Hsu, B.S. Ooi, *1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and rat vascular smooth muscle cell growth.*, Hypertension, 13;954-959, 1989.
- 75 Merke, J., P.A. Lucas, A. Szabo, G. Cournot-Witmer, G. Mall, R. Bouillon, T. Druëke, J. Mann, E. Ritz, *Hyperparathyroidism and abnormal calcitriol metabolism in the spontaneously hypertensive rat.*, Hypertension, 13;233-242, 1989.
- 76 Takahashi, S., S. Goldring, M. Katz, S. Hilsenbeck, R. Williams, G.D. Roodman, *Down regulation of calcitonin receptor mRNA expression by calcitonin during human osteoclast-like cell differentiation.*, J. Clin. Invest., 95;167-171, 1995.
- 77 Lee, S.K., S.R. Goldring, J.A. Lorenzo, *Expression of the calcitonin receptor in bone marrow cell cultures and the bone: A specific marker of the differentiated osteoclast that is regulated by calcitonin.*, Endocrinol., 136;4572-4581, 1995.
- 78 Talmage, R.V., S.A. Grubb, H. Norimatsu, C.J. Vanderwiel, *Evidence for an important physiological role for calcitonin.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 77;609-613, 1980.
- 79 Suki, W.N., D. Rouse, *Hormonal regulation of calcium transport in thick ascending limb renal tubules.*, Am J. Physiol., 241;F171-F174, 1981.
- 80 Linkhart, T.A., S. Moran, D.J. Baylink, *Growth factors for bone growth and repair: IGF, TGFbeta and BMP.*, Bone, 19, suppl 1;1S-12S, 1996.

- 81 Girasole, G., R.L. Jilka, G. Passeri, S. Boswell, G. Bodser, D.C. Williams, S.C. Manolagas, *17 $\beta$ -estradiol inhibits interleukin-6 production by bone marrow-derived stromal cells and osteoblasts in vitro: A potential mechanism for the antiosteoporotic effect of estrogens.*, J. Clin. Invest., 89;883-891, 1992.
- 82 Lindsay, R., D.M. Hart, J.M. Aitken, E.B. MacDonald, J.B. Anderson, A.C. Clarke, *Long term prevention of postmenopausal osteoporosis by estrogen. Evidence for an increased bone mass after delayed onset of estrogen treatment.*, Lancet, 1;1038-1041, 1976.
- 83 Jilka, R.L., G. Hangoc, G. Girasole, G. Passeri, D.C. Williams, J.S. Abrams, B. Boyce, H. Broxmeyer, S.C. Manolagas, *Increased osteoclast development after estrogen loss: Mediation by interleukin-6.*, Science, 257;88-91, 1992.
- 84 Arjmandi, B.H., B.W. Hollis, D.N. Kalu, *In vivo effect of 17 $\beta$ -estradiol on intestinal calcium absorption in rats.*, Bone Miner., 26;181-189, 1994.
- 85 Arjmandi, B.H., M.A. Salih, D.C. Hebert, S.H. Sims, D.N. Kalu, *Evidence for estrogen receptor-linked calcium transport in the intestine.*, Bone Miner., 21;63-74, 1993.
- 86 Breimer, L.H., I. MacIntyre, M. Zaidi, *Peptides from the calcitonin genes: molecular genetics, structure and function.*, Biochem. J., 255;377-390, 1988.
- 87 Uddman, R., L. Edvinsson, E. Ekblad, R. Hakanson, F. Sundler, *Calcitonin gene-related peptide (CGRP): perivascular distribution and vasodilatory effects.*, Regul. Pept., 15;1-23, 1986.
- 88 Supowit, S.C., C.V. Ramana, K.N. Westlund, D.J. DiPette, *Calcitonin gene-related peptide gene expression in the spontaneously hypertensive rat.*, Hypertension., 21;1010-1014, 1993.
- 89 Brain, S.D., T.J. Williams, J.R. Tippins, H.R. Morris, I. MacIntyre, *Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator.*, Nature, 313;54-56, 1985.
- 90 Lappe, R.W., M.J. Slivjak, J.A. Todt, R.L. Wendt, *Hemodynamic effect of calcitonin gene-related peptide in conscious rats.*, Regul. Pept., 19;307-312, 1987.

- 91 Hirata, Y., Y. Takagi, S. Takata, Y. Fukuda, H. Yoshima, T. Fujita, *Calcitonin gene-related peptide receptor in cultured vascular smooth muscle and endothelial cells.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 151;113-1131, 1988.
- 92 Bell, D.R., E.M. Dec, H.J. Rensberger, *Selective effects of arterial pressure in hypertension upon inhibition of cGMP versus cAMP mediated vascular relaxation.*, *Clin. Exp. Hypertens.*, 18;773-791, 1996.
- 93 DiPette, D.J., K.N. Westlund, O.B. Holland, *Dietary calcium modulates spinal cord content of calcitonin gene-related peptide in the rat.*, *Neurosci. Lett.*, 95;335-340, 1988.
- 94 Ahren, B., R. Ekman, P. Laurberg, *Calcium stimulates the release of calcitonin gene-related peptide from the canine thyroid.*, *Am. J. Physiol.*, 256;E597-E599, 1989.
- 95 Bo-Linn, G.W., G.R., Davis, D.J. Buddrus, S.G. Morawski, C. Santa Ana, J.S. Fordtran, *An evaluation of the importance of gastric acid secretion in the absorption of dietary calcium.*, *J. Clin. Invest.*, 73;640-647, 1984.
- 96 Gross, M., R. Kumar, *Physiology and biochemistry of vitamin D-dependent calcium binding proteins.*, *Am. J. Physiol.*, 259;F195-F209, 1990.
- 97 Bréhier, A., C. Perret, M. Thomasset, *1,25-Dihydroxycholecalciferol and calcium regulate the calbindin-D9K (CaBP 9K) gene expression in fetal rat duodenal organ culture.*, *J. Bone Miner. Res.*, 4, suppl 1;S292, 1989.
- 98 Dupret, J.M., P. Brun, C. Perret, N. Lomri, M. Thomasset, P. Cuisinier-Gleizes, *Transcriptional and post-transcriptional regulation of vitamin D-dependent calcium binding protein gene expression in the rat duodenum by 1,25-dihydroxycholecalciferol.*, *J. Biol. Chem.*, 262;16553-16557, 1987.
- 99 Ghijsen, W.E.J.M., C.H. Van Os, *1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> regulates ATP-dependent calcium transport in basolateral plasma membranes of rat enterocytes.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 689;170-172, 1982.



- 100 Yamada, M., H. Hanai, E. Kaneko, M. Fujita, *Decreased calcium pump activity in duodenal epithelial cells from spontaneously hypertensive rats.*, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 203;440-445, 1993.
- 101 Blair, H.C., P.H. Schlesinger, F.P. Ross, S.L. Teitelbaum, *Recent advances towards understanding osteoclast physiology.*, Clin. Orthopaed. Rel. Res., 294;7-22, 1993.
- 102 Mundy, G.R., *Local control of bone formation by osteoblasts.*, Clin. Orthopaed. Rel. Res., 313;19-26, 1995.
- 103 Rouse, D., W.N. Suki, *Renal control of extracellular calcium.*, Kidney Int., 38;700-708, 1990.
- 104 Gmaj, P., H. Murer, R. Kinne, *Calcium ion transport across plasma membranes isolated from rat kidney cortex.*, Biochem. J., 178;549-557, 1979.
- 105 Gmaj, P., H. Murer, E. Carafoli, *Localization and properties of a high affinity (Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>)-ATPase in isolated kidney cortex plasma membranes.*, FEBS Lett., 144;226-230, 1982.
- 106 Takeyama, K., S. Kitanaka, T. Sato, M. Kobori, J. Yanigisawa, S. Kato, *25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> 1 $\alpha$ -hydroxylase and vitamin D synthesis.*, Science 277;1827-1830, 1997.
- 107 Treschsel, U., J.A. Eisman, J.A. Fischer, J.P. Bonjour, H. Fleisch, *Calcium-dependent parathyroid hormone-independent regulation of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>.*, Am. J. Physiol., 239;E119-E124, 1980.
- 108 Takaichi, K., K. Kurokawa, *High Ca<sup>2+</sup> inhibits peptide hormone-dependent cAMP production specifically in thick ascending limbs of Henle.* Miner. Electrolyte Metab., 12;342-346, 1986.
- 109 Clemens, T.L., S.A. McGlade, K.P. Garrett, G.L. Craviso, G.N. Hendy, *Extracellular calcium modulates vitamin D-dependent calbindin D28K gene expression in chick kidney cells.*, Endocrinology, 124;1582-1584, 1989.

- 110 Szabo, A., J. Merke, E. Beier, G. Mall, E. Ritz, *1,25 (OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub> inhibits parathyroid cell proliferation in experimental uremia.*, *Kidney Int.*, 35;1049-1056, 1989.
- 111 DeMay, M.B., M.S. Kiernan, H.F. DeLuca, H.M. Kronenberg, *Sequences in the human parathyroid hormone gene that bind to the 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptor and mediate transcriptional repression in response to 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 89;8097-8101, 1992.
- 112 McCarron, D.A., P.A. Pingree, R.J. Rubin, S.M. Gaucher, M. Molitch, S. Krutzik, *Enhanced parathyroid function in essential hypertension: A homeostatic response to a urinary calcium leak.*, *Hypertension*, 2;162-168, 1980.
- 113 Beck, N., H., Singh, S.W. Reed, R.D. Davis, *Direct inhibitory effect of hypercalcemia on renal actions of parathyroid hormone.*, *J. Clin. Invest.*, 53;717-725, 1974.
- 114 Mathias, R.S., E.M. Brown, *Divalent cations modulate PTH-dependent 3'-5'-cyclic adenosine monophosphate production in renal proximal tubular cells.*, *Endocrinology*, 128;3005-3012, 1991.
- 115 Lijnen, P., *Alterations in sodium metabolism as an etiological model for hypertension.*, *Cardiovasc. Drugs Ther.*, 9;377-399, 1995.
- 116 Smith, J.B., R-M. Lyu, L. Smith, *Sodium-calcium exchange in aortic myocytes and renal epithelial cells. Dependence on metabolic energy and intracellular sodium.*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 639;505-520, 1991.
- 117 Rapp, J.P., *Aortic response to vanadate: independence from (Na,K) ATPase and comparison of Dahl salt-sensitive and salt-resistant rats.*, *Hypertension*, 3, suppl 3;I168-I172, 1981.
- 118 Yano, K., A. Zarain-Herzberg, *Sarcoplasmic reticulum calsequestrins: Structural and functional properties.*, *Molec. Cell. Biochem.*, 135;61-70, 1994.
- 119 Milner, R.E., K.S. Famulski, M. Michalak, *Calcium binding proteins in the sarcoplasmic/endoplasmic reticulum of muscle and nonmuscle cells.*, *Molec. Cell. Biochem.*, 112;1-13, 1992.

- 120 Pozzan, T., R. Rizzuto, P. Volpe, *Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores.*, *Physiol. Rev.*, 74;595-636, 1994.
- 121 Yamamoto, H., C. Van Breemen, *Ca<sup>2+</sup> compartments in saponin-skinned cultured vascular smooth muscle cells.*, *J. Gen. Physiol.*, 87;369-389, 1986.
- 122 Bendhack, L.M., R.V. Sharma, R.C. Bhalla, *Altered signal transduction in vascular smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats.*, *Hypertension*, 19, suppl 2, II142-II148, 1992.
- 123 Orlov, S.N., T.J. Resink, J. Bernhardt, F. Ferracin, F.R. Buhler, *Vascular smooth muscle cell calcium fluxes: regulation by angiotensin II and lipoproteins.*, *Hypertension*, 21;195-203, 1993.
- 124 Hartshorne, D.J., T. Kawamura, *Regulation of contraction-relaxation in smooth muscle.*, *News Physiol. Sci.*, 7;59-64, 1992.
- 125 Vogel, H.J., *Calmodulin: A versatile calcium mediator protein.*, *Biochem. Cell Biol.*, 72;357-376, 1994.
- 126 Ochsner, M., *Ca<sup>2+</sup> transient, cell volume, and microviscosity of the plasma membrane in smooth muscle.*, *Biochem. Pharmacol.*, 53;1765-1777, 1997.
- 127 Himmel, H.M., R. Whorton, H.C. Strauss, *Intracellular calcium, currents, and stimulus-response coupling in endothelial cells.*, *Hypertension*, 21;112-127, 1993.
- 128 Dolor, R.J., L.M. Hurwitz, Z. Mirza, H.C. Strauss, A.R. Whorton, *Regulation of extracellular calcium entry in endothelial cells: Role of the intracellular calcium pool.*, *Am. J. Physiol.*, 262;C171-C181, 1992.
- 129 Hansen, B.A., D.C. Battle, M.E. O'Donnell, *Sodium-calcium exchange in bovine endothelial cells.*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 639;566-569, 1991.
- 130 Jacob, R., *Agonist-stimulated divalent cation entry into single cultured human umbilical vein endothelial cells.*, *J. Physiol.*, 421;55-77, 1990.
- 131 Danthuluri, N.R., D. Kim, T.A. Brock, *Intracellular alkalinization leads to Ca<sup>2+</sup> mobilization from agonist-sensitive pools in bovine aortic endothelial cells.*, *J. Biol. Chem.*, 265;19071-19076, 1990.

- 132 Nasu, F., K. Inomata, *Ultracytochemical demonstration of Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity in the rat saphenous artery and its innervated nerve terminal.*, J. Electron Microsc., 39;487-491, 1990.
- 133 Russell, J., D. Lettieri, L.M. Sherwood, *Direct regulation by calcium of cytoplasmic messenger ribonucleic acid coding for pre-proparathyroid hormone in isolated bovine parathyroid cells.*, J. Clin. Invest., 72;1851-1855, 1983.
- 134 Macgregor, R.R., D.A. Hinton, R.D. Ridgeway, *Effects of calcium on synthesis and secretion of parathyroid hormone and secretory protein I.*, Am. J. Physiol., 254; E299-E305, 1988.
- 135 Yamamoto, M., T. Igarashi, M. Muramatsu, M., Fukagawa, T. Motokura, E. Ogata, *Hypocalcemia increases and hypercalcemia decreases the steady-state level of parathyroid hormone messenger RNA in the rat.*, J. Clin. Invest., 83;1053-1056, 1989.
- 136 Liu, J., A.I. Kahri, A-M. Teppo, R. Voutilainen, *Regulation of parathyroid hormone gene expression and peptide secretion in human parathyroid cells.*, Eur. J. Endocrinol., 130;394-401, 1994.
- 137 Habener, J.F., B. Kemper, J.T. Potts Jr., *Calcium dependent degradation of parathyroid hormone: a possible mechanism for the regulation of hormone stores.*, Endocrinology, 97;431-441, 1975.
- 138 D'Amour, P., J. Palardy, G., Bahsali, L.E. Mallette, A. DeLean, R. LePage, *The modulation of circulating parathyroid hormone immunoheterogeneity in man by ionized calcium concentration.*, J. Clin. Endocrinol. Metab., 74;525-532, 1992
- 139 Morrissey, J.J., J.W. Hamilton, R.R. MacGregor, D.V. Cohn, *The secretion of parathyroid fragments 34-84 and 37-84 by dispersed porcine parathyroid cells.*, Endocrinology, 107;164-171, 1980.
- 140 Hanley, D.A., K. Takatsuki, J.M. Sultan, A.B. Schneider, L.M. Sherwood, *Direct release of parathyroid hormone fragments from functioning bovine parathyroid glands in vitro.*, J. Clin. Invest., 62;1247-1254, 1978.

- 141 Cantley, L.K., J. Russell, D. Lettieri, L.M. Sherwood, *1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> suppresses parathyroid hormone secretion from bovine parathyroid cells in tissue culture.*, *Endocrinology*, 117;2114-2119, 1985.
- 142 Sugimoto, T., A.J. Brown, C. Ritter, J. Morrissey, E. Slatopolsky, K.J. Martin, *Combined effects of dexamethasone and 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on parathyroid hormone secretion in cultured bovine parathyroid cells.*, *Endocrinology*, 125;638-641, 1989.
- 143 Ridgeway, R.D., R.R. Macgregor, *Opposite effects of 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> on synthesis and release of PTH compared with secretory protein I.*, *Am. J. Physiol.*, 254;E279-E286, 1988.
- 144 Greenberg, C., S.C. Kukreja, E.N. Bowser, G.K. Hargis, W.J. Henderson, G.A. Williams, *Parathyroid hormone secretion: effects of estradiol and progesterone.*, *Metabolism* 36;151-154, 1987.
- 145 Slatopolsky, E., A. Mercado, A. Morrison, J. Yates, S. Klahr, *Inhibitory effect of hypermagnesemia on the renal action of parathyroid hormone.*, *J. Clin. Invest.*, 58;1273-1279, 1976.
- 145b Rude, R.K., F.R. Singer, *Magnesium deficiency and excess.*, *Ann. Rev. Med.*, 32;245-259, 1981.
- 146 Fujimi, T., H. Baba, M. Fukase, T. Fugita, *Direct inhibitory effect of amino-terminal parathyroid hormone fragment (PTH 1-34) on PTH secretion from bovine parathyroid primary cultured cells in vitro.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 178;953-958, 1991.
- 147 Martin, K.J., K.A., Hruska, J. Lewis, C. Anderson, E. Slatopolsky, *The renal handling of parathyroid hormone: role of peritubular uptake and glomerular filtration.*, *J. Clin. Invest.*, 60;808-814, 1977.
- 148 Daligaard, H., M. Egfjord, E. Lewin, K. Olgaard, *Metabolism of N-terminal and C-terminal parathyroid hormone fragments by isolated perfused rat kidney and liver.*, *Endocrinology*, 134;1373-1381, 1994.

- 149 Naveh-Many, J., H. Mayer, J. Silver, *Sigmoidal relationship between calcium and parathyroid hormone mRNA but not with calcitonin mRNA in the rat.*, J. Bone Miner. Res., 3, suppl 1;S211, 1988.
- 150 Brown, E., P. Enyedi, M. LeBoff, J. Rotberg, J. Preston, C. Chen, *High extracellular  $Ca^{2+}$  and  $Mg^{2+}$  stimulate accumulation of inositol phosphates in bovine parathyroid cells.*, FEBS Lett., 218;113-118, 1987.
- 151 Okazaki, T., T. Igarashi, H.M. Kronenberg, *5'-flanking region of the parathyroid hormone gene mediated negative regulation by 1,25 (OH) $_2$  vitamin D $_3$ .*, J. Biol. Chem., 263;2203-2208, 1988.
- 152 Silver, J., J. Russell, L.M. Sherwood, *Regulation by vitamin D metabolites of messenger ribonucleic acid for preproparathyroid hormone in isolated bovine parathyroid cells.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 82;4270-4273, 1985.
- 153 Hanley, D.A., L.M. Ayer, *Calcium-dependent release of carboxyl-terminal fragments of parathyroid hormone by hyperplastic human parathyroid tissue in vitro.*, J. Clin. Endocrinol. Metab., 63;1075-1079, 1986.
- 154 D'Amour, P., F. Labelle, L. Lecavalier, V. Plourde, D. Harvey, *Influence of serum  $Ca^{2+}$  concentration on circulating molecular forms of PTH in three species.*, Am. J. Physiol., 251;E680-E687, 1986.
- 155 D'Amour, P., J. Palardy, G. Bahsali, L.E. Mallette, A. DeLean, R. Lepage, *The modulation of circulating parathyroid hormone in man by ionized calcium concentration.*, J. Clin. Endocrinol. Metab., 74;525-532, 1992.
- 156 Okazaki, T., J.D. Zajac, T. Igarashi, E. Ogata, H.M. Kronenberg, *Negative regulatory elements in the human parathyroid hormone gene.*, J. Biol. Chem., 266;21903-21910, 1991.
- 157 McHaffie, G.S., S.H. Ralston, *Origin of a negative calcium response element in an ALU-repeat: Implications for regulation of gene expression by extracellular calcium.*, Bone, 17;11-14, 1995.

- 158 Okazaki, T., K. Ando, T. Igarashi, E. Ogata, T. Fijita, *Conserved mechanism of negative gene regulation by extracellular calcium.*, J. Clin. Invest., 89;1268-1273, 1992.
- 159 Brown, E.M., M. Pollak, C.E. Seidman, J.G. Seidman, Y-H Wu Chou, D. Riccardi, S.C. Hebert, *Calcium-ion-sensing cell-surface receptors.*, New Engl. J. Med., 333;234-240, 1995.
- 160 Hebert, S.C., E.M. Brown, *The extracellular calcium receptor.*, Curr. Opin. Cell Biol., 7;484-492, 1995.
- 161 Hebert, S.C., E.M. Brown, H.W. Harris, *Role of the  $Ca^{2+}$ -sensing receptor in divalent mineral ion homeostasis.*, J. Exp. Biol., 200;295-302, 1997.
- 162 Brown, E.M., G. Gamba, D. Riccardi, M. Lombardi, R. Butters, O. Kifor, A. Sun, M.A. Hediger, J. Lytton, S.C. Hebert, *Cloning and characterization of an extracellular  $Ca^{2+}$ -sensing receptor from bovine parathyroid.*, Nature, 366;575-580, 1993.
- 163 Riccardi, D., J. Park, W-S Lee, G. Gamba, E.M. Brown, S.C. Hebert, *Cloning and functional expression of a rat kidney extracellular calcium/polyvalent cation-sensing receptor.*, Proc. Natl. Acad. Sci., 92;131-135, 1995.
- 164 Ruat, M., M.E. Molliver, A.M. Snowman, S.H. Snyder, *Calcium sensing receptor: molecular cloning in rat and localization to nerve terminals.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92;3161-3165, 1995.
- 165 Aida, K., S. Koishi, M. Tawata, T. Onaya, *Molecular cloning of a putative  $Ca^{2+}$ -sensing receptor cDNA from human kidney.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 214;524-529, 1995.
- 166 Garrett, J.E., H. Tamir, O. Kifor, R.T. Simin, K.V. Rogers, A. Mithal, R.F. Gagel, E.M. Brown, *Calcitonin-secreting cells of the thyroid express an extracellular calcium receptor gene.*, Endocrinology, 136;5202-5211, 1995.

- 167 Garrett, J.E., I.V. Capuano, L.G. Hammerland, B.C. Hung, E.M. Brown, S.C. Hebert, E.F. Nemeth, F. Fuller, *Molecular cloning and functional expression of human parathyroid calcium receptor cDNAs.*, J. Biol. Chem., 270;12919-12925, 1995.
- 168 Brown, E.M., M. Pollak, D. Riccardi, S.C. Hebert, *Cloning and characterization of an extracellular  $Ca^{2+}$ -sensing receptor from parathyroid and kidney: new insights into the physiology and pathophysiology of calcium metabolism.*, Nephrol. Dial. Transplant., 9;1703-1706, 1994.
- 169 Brown, E.M., M. Pollak, S.C. Hebert, *Molecular mechanisms underlying the sensing of extracellular  $Ca^{2+}$  by parathyroid and kidney cells.*, Eur. J. Endocrinol., 132;523-531, 1995.
- 170 Brown, E.M., G.E.-H. Fuleihan, C.J. Chen, O. Kifor, *A comparison of the effects of divalent and trivalent cations on parathyroid hormone release, 3',5'-cyclic-adenosinemonophosphate accumulation, and the levels on inositol phosphates in bovine parathyroid cells.*, Endocrinology, 127;1064-1071, 1990.
- 171 Brown, E.M., C. Katz, R. Butters, O. Kifor, *Neomycin mimics the effects of high extracellular calcium concentrations on parathyroid function in dispersed bovine parathyroid cells.*, Endocrinology, 128;3047-3054, 1991.
- 172 Ridefelt, P., P. Hellman, C. Wallfelt, G. Åkerström, J. Rastad, E. Gylfe, *Neomycin interacts with  $Ca^{2+}$  sensing of normal and adenomatous parathyroid cells.*, Molec. Cell. Endocrinol., 83;211-218, 1992.
- 173 Brown, E.M., C. Kratz, R. Butters, O. Kifor, *Polyarginine, polylysine and protamine mimic the effects of high extracellular calcium concentrations on dispersed bovine parathyroid cells.*, J. Bone Miner. Res., 6;1217-1225, 1991.
- 174 Nemeth, E.F.,  *$Ca^{2+}$  receptor-dependent regulation of cellular functions.*, News Physiol. Sci., 10;1-5, 1995.
- 175 Moallem, E., J. Silver, T. Naveh-Many, *Regulation of parathyroid hormone messenger RNA levels by protein kinase A and C in bovine parathyroid cells.*, J. Bone Miner. Res., 10;447-452, 1995.



- 176 Brown, E.M., S.C. Hebert, *A cloned  $Ca^{2+}$ -sensing receptor: A mediator of direct effects of extracellular  $Ca^{2+}$  on renal function?*, J. Am. Soc. Nephrol., 6;1530-1540, 1995.
- 177 Rogers, K.V., C.K. Dunn, R.L. Conklin, S. Hadfield, B.A. Petty, E.M. Brown, S.C. Hebert, E.F. Nemeth, J.Fox, *Calcium receptor messenger ribonucleic acid levels in the parathyroid glands and kidney of vitamin D-deficient rats are not regulated by plasma calcium or 1,25-dihydroxyvitamin  $D_3$* , Endocrinology, 136;499-504, 1995.
- 178 Izzo, N.J., C.E. Seidman, S. Collins, W.S. Colucci,  *$\alpha$ 1-adrenergic receptor mRNA level is regulated by norepinephrine in rabbit aortic smooth muscle cells.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87;6268-6271, 1990.
- 179 Böhm, M., P. Gierschik, A. Knorr, U. Schmidt, K. Weismann, E. Erdmann, *Cardiac adenylyl cyclase,  $\beta$ -adrenergic receptors, and G proteins in salt-sensitive hypertension.*, Hypertension, 22;715-727, 1993.
- 180 Racke, F.K., E.F. Nemeth, *Cytosolic calcium homeostasis in bovine parathyroid cells and its modulation by protein kinase C.*, J. Physiol., 468;141-162, 1993.
- 181 Racke, F.K., E.F. Nemeth, *Protein kinase C modulates hormone secretion regulated by extracellular polycations in bovine parathyroid cells.*, J. Physiol., 468;163-176, 1993.
- 182 Pollak, M.R., E.M. Brown, H.L. Estep, P.N. McLaine, O. Kifor, J. Park, S.C. Hebert, C.E. Seidman, J.G. Seidman, *Autosomal dominant hypocalcemia caused by a  $Ca^{2+}$ -sensing receptor gene mutation.*, Nature Genet., 8;303-307, 1994.
- 183 Brown, E.M., S.C. Hebert, *A cloned extracellular  $Ca^{2+}$ -sensing receptor: Molecular mediator of the actions of extracellular  $Ca^{2+}$  on parathyroid and kidney cells?*, Kidney Int., 49;1042-1046, 1996.
- 184 Bai, M., S.H.S. Pearce, O. Kifor, S. Trivedi, U.G. Stauffer, R.V. Thakker, E.M. Brown, *In vivo and in vitro characterization of neonatal hyperparathyroidism resulting from a de novo, heterozygous mutation in the  $Ca^{2+}$ -sensing receptor gene:*

- Normal maternal calcium homeostasis as a cause of secondary hyperparathyroidism in familial benign hypocalciuric hypercalcemia.*, J. Clin. Invest., 99;88-96, 1997.
- 185 Kifor, O., F.D. Moore, P. Wang, M. Goldstein, P. Vassilev, I. Kifor, S.C. Hebert, E.M. Brown, *Reduced immunostaining for the extracellular  $Ca^{2+}$ -sensing receptor in primary and uremic secondary hyperparathyroidism.*, J. Clin. Endocrinol. Metab., 81;1598-1606, 1996.
- 186 Heizmann, C.W., *Calcium-binding proteins: Basic concepts and clinical implications.*, Gen. Physiol. Biophys., 11;411-425, 1992.
- 187 Bourlon, P-M., A. Faure-Dussert, B. Billaudel, B.C. Sutter, G. Tramu, M. Thomasset, *Relationship between calbindin-D28K levels in the A and B cells of the rat endocrine pancreas and the secretion of insulin and glucagon: Influence of vitamin D<sub>3</sub> deficiency and 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>.*, J. Endocrinol., 148;223-232, 1996.
- 188 Doubell, A.F., C. Lazure, J. Tremblay, G. Thibault, *Identification of a calcium dependent atrial secretory binding protein as calmodulin.*, Cardiovasc. Res., 28;705-709, 1994.
- 189 Gibbs, F.E.M., M.C. Wilkinson, P.S. Rudland, R. Barraclough, *Interactions in vitro of p9Ka, the rat S-100-related, metastasis-inducing, calcium-binding protein.*, J. Biol. Chem., 269;18992-18999, 1994.
- 190 Takenaga, K., Y. Nakamura, S. Sakiyama, *Cellular localization of pEL98 protein, an S100-related calcium binding protein, in fibroblasts and its tissue distribution analyzed by monoclonal antibodies.*, Cell Struct. Funct., 19;133-141, 1994.
- 191 Pietrobon, D., F. Di Virgilio, T., Pozzan, *Structural and functional aspects of calcium homeostasis in eukaryotic cells.*, Eu. J. Biochem., 193;599,622, 1990.
- 192 Fan, H., D. Josic, Y-P Lim, W. Reutter, *cDNA cloning and tissue-specific regulation of expression of a rat calcium-binding protein 65/67. Identification as a homologue of annexin VI.*, Eur. J. Biochem., 230;741-751, 1995.

- 193 Sagot, I., F. Regnouf, J.P. Henry, L.A. Pradel, *Translocation of cytosolic annexin 2 to a Triton-insoluble membrane subdomain upon nicotine stimulation of chromaffin cultured cells.*, FEBS lett., 410;229-234, 1997.
- 194 Regnouf, F., I. Sagot, B. Delouche, G. Devilliers, J. Cartaud, J-P Henry, L-A Pradel, *"In vitro" phosphorylation of annexin 2 heterotetramer by protein kinase C.*, J. Biol. Chem., 270;27143-27150, 1995.
- 195 Baker, M.E., *Similarity between phospholipase C and the regulatory domain of protein kinase C.*, Mol. Cell. Endocrinol., 61;129-131, 1989.
- 196 Essen, L.O., O. Perisic, D.E. Lynch, M. Katan, R.L. Williams, *A ternary metal binding site in the C2 domain of phosphoinositide-specific phospholipase C-delta1.*, Biochemistry, 36;2753-2762, 1997.
- 197 Clark, D.J., L-L Lin, R.W. Kriz, C.S. Ramesha, L.A. Sultzman, A.Y. Lin, N. Milona, J.L. Knopf, *A novel arachidonic acid selective cytosolic PLA<sub>2</sub> containing a Ca<sup>2+</sup> dependent translocation domain with homology to PKC and GAP.*, Cell, 65;1043-1051, 1991.
- 198 Perin, M.S., V.A. Fried, G.A. Mignery, R. Jahn, T.C. Südhof, *Phospholipid binding by a synaptic vesicle protein homologous to the regulatory region of protein kinase C.*, Nature 345;260-263, 1990.
- 199 Mochly-Rosen, D., H. Khaner, J. Lopez, *Identification of intracellular receptor proteins for activated protein kinase C.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 88;3997-4000, 1991.
- 200 Ron, D., J. Luo, D. Mochly-Rosen, *C2 region derived peptides inhibit translocation and function of beta protein kinase C in vivo.*, J. Biol. Chem., 270;24180-24187, 1995.
- 201 Kohn, W.D., C.T. Mant, R.S. Hodges, *α-helical protein assembly motifs.*, J. Biol. Chem., 272;2583-2586, 1997.

- 202 Tremblay, J., E. Cahng, J. Kunes, P. Hamet, *Cyclic nucleotides and calmodulin-phosphodiesterase activator: Potential biochemical markers of salt sensitivity.*, Clin. Exp. Hypertens., Theory and Practice., 13;735-743, 1991.
- 203 Whitfield, J.F., J.P. Durkin, D.J. Franks, L.P. Kleine, L. Raphs, R.H. Rixon, M. Sikorska, P.R. Walker, *Calcium, cyclic AMP and protein kinase C-partners in mitogenesis.*, Cancer Metastas. Res., 5;205-250, 1987.
- 204 Wood, T.L., Y. Kobayashi, G. Frantz, S. Vargnese, S. Christokos, A.J. Tobin, *Molecular cloning of mammalian 28000 Mr vitamin D-dependent calcium binding protein (calbindin-D28K): Expression of calbindin-D28K RNAs in rodent brain and kidney.*, DNA., 7;585-593, 1988.
- 205 Ahn, S.H., H. Sawada, G.L. Nicholson, *Differential expression of annexin-1 in human mammary ductal epithelial cells in normal and bening and malignant breast tissues.*, Clin. Exp. Metastas., 15;151-156, 1997.
- 206 Bernier, S.M., Y. Yamada, *Modulation of annexin V during chondrocytic differentiation in vitro.*, Ann. N.Y. Acad. Sci., 785;212-214, 1996.
- 207 Perretti, M., J.D. Croxtall, S.K. Wheller, N.J. Goulding, R. Hammon, R.J. Flower, *Mobilizing lipocortin 1 in adherent human leucocytes down regulates their transmigration.*, Nat. Med., 2;1259-1262, 1996.
- 208 Nishizuka, Y., *Studies and perspectives of protein kinase C.*, Science, 233;305-312, 1986.
- 209 Farago, A., Y. Nishizuka, *Protein kinase C in transmembrane signalling.*, FEBS Lett., 268;350-354, 1990.
- 210 Lau, K., B. Eby, *The role of calcium in genetic hypertension.*, Hypertension, 7;657-667, 1985.
- 211 McCarron, D.A., N.N. Yung, B.A. Ugoretz, S. Krutzik, *Disturbances of calcium metabolism in the spontaneously hypertensive rats: Attenuation of hypertension by calcium supplementation.*, Hypertension., 4;I162-I167, 1981.

- 212 Bukoski, R.D., *Intracellular  $Ca^{2+}$  metabolism of isolated resistance arteries and cultured vascular myocytes of spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto normotensive rats.*, J. Hypertens., 8;37-43, 1990.
- 213 Ishida-Kainouchi, M., H. Matsuura, T. Ishida, G. Kajiyama, T. Oshima, *Platelet calcium handling in spontaneously hypertensive rats and in three strains of normotensive rats.*, J. Hypertens., 11;509-514, 1993.
- 214 Yamakawa, H., H. Suzuki, M. Nakamura, Y. Ohno, T. Satura, *Disturbed calcium metabolism in offspring of hypertensives.*, Hypertension, 19;528-534, 1992.
- 215 Oshima, T., E.W. Young, D.A. McCarron, *Abnormal platelet and lymphocyte calcium handling in prehypertensive rats.*, Hypertension, 18;111-115, 1991.
- 216 MacGregor, G.A., F.P. Cappuccio, *The kidney and essential hypertension: A link to osteoporosis?*, J. Hypertens., 11;781-785, 1993.
- 217 Resnick, L.M., *Calcium metabolism in the pathophysiology and treatment of clinical hypertension.*, Am. J. Hypertens., 2;179S-185S, 1989.
- 218 Zoccali, C., F., Mallamaci, M. Postorino, F. Cuzzola, D. Leonardis, S. Parlongo, F. Salnitro, *Hyperfiltration and calcium metabolism in essential hypertension.*, Am. J. Hypertens., 4;944-950, 1991.
- 219 Miller, F.J. Jr., K.C. Dellsperger, D.D. Gutterman, *Myogenic constriction of human coronary arterioles.*, Am. J. Physiol., 273, 1 pt 2;H257-H264, 1997.
- 220 Orlov, S.N., P.V. Gulak, I.S. Litvinov, Y.V. Postnov, *Evidence of altered structure of the erythrocyte membrane in spontaneously hypertensive rats.*, Clin. Sci., 63;43-45, 1982.
- 221 Orlov, S.N., Y.V. Postnov,  *$Ca^{2+}$  binding and membrane fluidity in essential and renal hypertension.*, Clin. Sci., 63;281-284, 1982.
- 222 Gonzalez, J.M., W.N. Suki, *Cell calcium and arterial blood pressure.*, Sem. Nephrol., 15;564-568, 1995

- 223 Thompson, L.E., G.J. Rinaldi, D.F. Bohr, *Decreased activity of the sodium-calcium exchanger in tail artery of stroke-prone spontaneously hypertensive rats.*, Blood Vessels, 27;197-201, 1990.
- 224 Bing, R.F., A.M. Heagerty, J.D. Swales, *Membrane handling of calcium in essential hypertension.*, J. Hypertens., 5, suppl4;S529-S535, 1987.
- 225 Rembold, C.M., *Regulation of contraction and relaxation in arterial smooth muscle.*, Hypertension, 20;129-137, 1992.
- 226 Erne, P., P. Bolli, E. Burgisser, F. Buhler, *Correlation of platelet calcium with blood pressure: Effect of antihypertensive therapy.*, N. Engl. J. Med., 310;1084-1088, 1984.
- 227 Campese, V.M., F. Karubian, *Salt sensitivity in hypertension: Implications for the kidney.*, J. Am. Soc. Nephrol., 2, suppl 1;S53-S61, 1991.
- 228 Haddy, F.J., M.B. Pamnani, *Role of dietary salt in hypertension.*, J. Am. Coll. Nutr., 14;428-438, 1995.
- 229 Tamura, H., L. Hopp, M. Kino, A. Tokushige, B.M. Searle, F. Khalil, A. Aviv, *Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> regulation in cultured vascular smooth muscle cell of the spontaneously hypertensive rat.*, Am. J. Physiol., 250;C939-C947, 1986.
- 230 M'Buyamba-Kabangu, J.R., P. Lijnen, R. Fagard, A. Amery, *Intraerythrocyte sodium concentration in black families with and without hypertension.*, Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol., 8;437-442, 1986.
- 231 Hatton, D.C., D.A. McCarron, *Dietary calcium and blood pressure in experimental models of hypertension.*, Hypertension, 23;513-530, 1994.
- 232 Lingrel, J.B., J. Orłowski, M.M. Shull, E.M. Price, *Molecular genetics of Na-K-ATPase.*, Prog. Nucleic Acid Res., 38;37-89, 1990.
- 233 Bianchi, G., G. Tripodi, G. Casari, S. Salardi, B.R. Barber, R. Garcia, P. Leoni, D. Cusi, M. Ferrandi, L.A. Pinna, F.E. Barelle, P. Ferrari, *Two point mutations within the adducin genes are involved in blood pressure variation.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 91;3999-4003, 1994.

- 234 Joshi, R., D.M. Gilligan, E. Otto, T. McLaughlin, V. Bennet, *Primary structure and domain organization of human alpha and beta adducin.*, J. Cell. Biol., 115;665-675, 1991.
- 235 Tripodi, G., F. Valtorta, L. Torielli, E. Chierigatti, S. Salrudi, L. Trusolino, A. Menegon, P. Ferrari, P.C. Marchisio, G. Bianchi, *Hypertension-associated point mutations in the adducin alpha and beta subunits affect actin cytoskeleton and ion transport.*, J. Clin. Invest., 97;2815-2822, 1996.
- 236 Ferrandi, M., G. Tripodi, S. Salardi, M. Florio, R. Modica, P. Barassi, P. Parenti, A. Shainskaya, S. Karlish, G. Bianchi, P. Ferrari, *Renal Na, K-ATPase in genetic hypertension.*, Hypertension, 28;1018-1025, 1996.
- 237 Manunta, P., L. Del Vecchio, K. Amar, G. Bianchi, *Genetic determinants and renal mechanisms in essential hypertension.*, J. Human Hypertens., 10;649-656, 1996.
- 238 Kaplan, M.R., D.B. Mount, E. Delpire, *Molecular mechanisms of NaCl cotransport.*, Annu. Rev. Physiol., 58;649-668, 1996.
- 239 Haas, M., *The Na-K-Cl cotransporters.*, Am. J. Physiol., 267;C869-C885, 1994.
- 240 O'Donnell, M.E., *Endothelial cell sodium-potassium-chloride cotransport. Evidence of regulation by Ca<sup>2+</sup> and protein kinase C.*, J. Biol. Chem., 266;11559-11566, 1991.
- 241 Scott, D.M., *Sodium cotransport systems: Cellular, molecular and regulatory aspects.*, Bioessays, 7;71-78, 1987.
- 242 Orlov, S.N., T.J. Resink, J. Bernhardt, F.R. Buhler, *Volume-dependent regulation of sodium and potassium fluxes in cultured vascular smooth muscle cells: Dependence on medium osmolarity and regulation by signalling systems.*, J. Membrane Biol., 129;199-210, 1992.
- 243 Hoffmann, E.K., P.B. Dunham, *Membrane mechanisms and intracellular signalling in cell volume regulation.*, Int. Rev. Cytol., 161;173-262, 1995.
- 244 Orlov, S.N., J. Tremblay, P. Hamet, *Cell volume in vascular smooth muscle cells is regulated by bumetanide-sensitive ion transport.*, Am. J. Physiol., C1388-C1397, 1996.

- 245 Smith, J.B., L. Smith., *Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> cotransport in cultured vascular smooth muscle cells: Stimulation by angiotensin II and calcium ionophores, inhibition by cyclic AMP and calmodulin antagonists.*, J. Memb. Biol., 99;51-63, 1987.
- 246 Orlov, S.N., J. Tremblay, P. Hamet, *Altered  $\beta$ -adrenergic regulation of Na-K-Cl cotransport in cultured smooth muscle cells from the aorta of spontaneously hypertensive rats.*, Am. J. Hypertens., 8;739-747, 1995.
- 247 Owen, N.E., *Regulation of Na/K/Cl co-transport in vascular smooth muscle cell.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 125;500-508, 1984.
- 248 Cacciafesta, M., C. Ferri, A. Carlomagno, G. Piccirillo, C.D. Angelis, A. Santucci, L. Guidoni, A.M. Luciani, A. Rosi, V. Viti, F. Balsano, *Increased sodium, potassium cotransport activity in salt-sensitive essential hypertensive patients.*, J. Hypertens., 11, suppl 5;S254-S255, 1993.
- 249 Hamet, P., *À la recherche des gènes de l'hypertension artérielle.*, Union Médicale du Canada, 124;37-47, 1995.
- 250 Orlov, S.N., T.J. Resink, J. Bernhardt, F.R. Bühler, *Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pump and Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> cotransport in cultured vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive and normotensive rats: baseline activity and regulation.*, J. Hypertens., 10;733-740, 1992.
- 251 Kuro-o, M., K. Hanaoka, Y. Hiroi, T. Noguchi, Y. Fujimori, S-i Takewaki, M. Hayasaka, H. Katoh, A. Miyagishi, R. Nagai, Y. Yazaki, Y-i Nabeshima, *Salt-sensitive hypertension in transgenic mice overexpressing Na<sup>+</sup>-Proton exchanger.*, Circ. Res., 76;148-153, 1995.
- 252 Phan, V.N., M. Kusuhara, P.A. Lucchesi, B.C. Berk, *A 90-KD Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger kinase increased activity in spontaneously hypertensive rat vascular smooth muscle.*, Hypertension, 29;1265-1272, 1997.
- 253 Aviv, A., *The links between cellular Ca<sup>2+</sup> and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in the pathophysiology of essential hypertension.*, Am. J. Hypertens., 9;703-707, 1996.



- 254 Côrtes, S.F., V.S. Lemos, J.C. Stoclet, *Alterations in calcium stores in aortic myocytes from spontaneously hypertensive rats.*, *Hypertension*, 29;1322-1328, 1997.
- 255 Bing, R.F., G.C. Booth, A.M. Heagerty, J.D. Swales, *Erythrocyte membrane calcium binding in normotensive and hypertensive subjects.*, *J. Hypertens.*, 4, suppl 6;299S-302S, 1986.
- 256 Touyz, R.M., R.J. Milne, S.G. Reinach, *Altered calcium binding to erythrocyte membrane in essential hypertensives: Relation to magnesium.*, *J. Human Hypertens.*, 7;59-64, 1993.
- 257 Young, E.W., C.D. Morris, D.A. McCarron, *Urinary calcium excretion in essential hypertension.*, *J. Lab. Clin. Med.*, 120;624-632, 1992.
- 258 Hamet, P., M. Daignault-Gélinas, J. Lambert, M. Ledoux, L. Wissell-Cambioti, F. Bellavance, E. Mongeau, *Epidemiologic evidence of an interaction between calcium and sodium intake impacting on blood pressure: a Montréal study.*, *Am J. Hypertens.*, 5;378-385, 1992.
- 259 Zemel, M.B., B.A. Bedford, P.C. Zemel, O. Marwah, J.R. Sowers, *Altered cation transport in non-insulin-dependent diabetic hypertension: effects of dietary calcium.*, *J. Hypertens.*, 6, suppl 4;S228-S230, 1988.
- 260 Orlov, S.N., N.I. Pokudin, Y.V. Postnov, *CaM-dependent Ca<sup>2+</sup> transport in erythrocytes of spontaneously hypertensive rats.*, *Pfluegers Arch. Eur. J. Physiol.*, 397;54-56, 1983.
- 261 McCarron, D.A., D. Hatton, J-B. Roullet, C. Roullet, *Dietary calcium, defective cellular Ca<sup>2+</sup> handling, and arterial pressure control.*, *Can. J. Pharmacol.*, 72;937-944, 1994.
- 262 Tremblay, J., Y.I. Wen, P. Hamet, *Calmodulin levels in spontaneously hypertensive rats and mice.*, *Fed. Proc.* 43;1242, 1984 (abrégé).
- 263 Hamet, P., J. Tremblay, S.C. Pang, S.V. Walter, Y.I. Wen, *Primary vs secondary events in hypertension.*, *Can. Physiol. Pharmacol.*, 63;380-386, 1985.

- 264 Huang, S-L., Y.I. Wen, D.B. Kupranycz, S.C. Pang, G. Schlager, P. Hamet, J. Tremblay, *Abnormality of calmodulin activity in hypertension. Evidence of the presence of an activator.*, J. Clin. Invest., 82;276-281, 1988.
- 265 Chan, T.C.K., D.V. Godin, M.C. Sutter, *Erythrocyte membrane abnormalities in hypertension: A comparison between two animal models.*, Clin. Exp. Hypertens. Part A Theory Pract., A5;691-719, 1983.
- 266 Cantaro, S., L. Calo, A. Vianello, S. Fanaro, G.P. Rossi, B. Borsatti, *Platelet CaM concentration and phospholipase A<sub>2</sub> activity in essential hypertension.*, Regul. Pept., S-4;144-147, 1985.
- 267 Chang, E., P. Hamet, J. Tremblay, *Biochemical characteristics of a calmodulin-phosphodiesterase activator increased in spontaneously hypertensive mice and rats.*, J. Cardiovasc. Pharmacol., 23, suppl 2;S42-S49, 1994.
- 268 Chang, E., J. Kunes, P. Hamet, J. Tremblay, *Increase of calmodulin activator in hypertension. Modulation by dietary sodium and calcium.*, Am. J. Hypertens., 3;210S-215S, 1990.
- 269 Drüeke, T., U. Hennessen, B. Nabara, L.B. Nasr, P.A. Lucas, P. Dang, M. Thomasset, B. Lacour, E. Coudrier, D.A. McCarron, *Ultrastructural and functional abnormalities of intestinal and renal epithelium in the SHR.*, Kidney Int., 37;1438-1448, 1990.
- 270 Drüeke, T.B., U. Hennessen, P.A. Lucas, B. Nabara, L. Ben Nasr, M. Thomasset, B. Lacour, E. Coudrier, D.A. McCarron, *Epithelial abnormalities in intestine and kidney of the spontaneously hypertensive rat.*, Am. J. Hypertens., 3;195S-201S, 1990.
- 271 Kowarski, S., L.A. Cowen, D. Schachter, *Decreased content of integral membrane calcium-binding protein (IMCAL) in tissues of the spontaneously hypertensive rat.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83;1097-1100, 1986.
- 272 Zachariah, P.K., G.L. Schwartz, C.G. Strong, S.G. Ritter, *Parathyroid hormone and calcium. A relationship in hypertension.*, Am. J. Hypertens., 1;79S-82S, 1988.

- 273 Brickman, A.S., M.D. Nyby, K. Von Hungen, P. Eggena, M.L. Tuck, *Calcitropic hormones, platelet calcium, and blood pressure in essential hypertension.*, *Hypertension*, 16;515-522, 1990.
- 274 Young, E.W., C.D. Morris, S. Holcomb, G. McMillan, D.A. McCarron, *Regulation of parathyroid hormone and vitamin D in essential hypertension.*, *Am. J. Hypertens.*, 8;957-964, 1995.
- 275 Bourgooin, P., P. Lucas, C. Roullet, A. Pointillart, M. Thomasset, M. Brami., L. Comte, B. Lacour, M. Garabedian, D.A. McCarron, *Developmental changes of  $Ca^{2+}$ ,  $PO_4$ , and calcitriol metabolism in spontaneously hypertensive rats.*, *Am. J. Physiol.*, 259;F104-F110, 1990.
- 276 Kishimoto, H., K. Tsumura, S. Fujioka, S. Uchimoto, H. Morii, *Chronic parathyroid hormone administration reverses the antihypertensive effect of calcium loading in young spontaneously hypertensive rats.*, *Am. J. Hypertens.*, 6;234-240, 1993.
- 277 Hellström, J., G. Birke, C.A. Edvall., *Hypertension in hyperparathyroidism.*, *Br. J. Urol.*, 30;13-24, 1958.
- 278 Onishi, T., M. Tsuji, S. Morimoto, Y. Okada, M. Arima, H. Itatani, K. Kinoshita, T. Sonoda, Y. Kumahara, *Changes of urinary cyclic AMP excretion and plasma parathyroid hormone levels before and after parathyroidectomy in patients with primary hyperparathyroidism.*, *Clin. Endocrinol.*, 11;307-312, 1979.
- 279 Dominiczak, A.F., F. Lyall, J.J. Morton, H.J. Dargie, I.T. Boyle, T.T. Tune, G. Murray, P.F. Semple, *Blood pressure, left ventricular mass and intracellular calcium in primary hyperparathyroidism.*, *Clin. Sci.*, 78;127-132, 1990.
- 280 Pang, P.K.T., C.G. Benishin, J. Shan, R.Z. Lewanczuk, *PHF: The new parathyroid hypertensive factor.*, *Blood Pressure*, 3;148-155, 1994.
- 281 Lewanczuk, R.Z., J. Wang, Z.R. Zhang, P.K.T. Pang, *Effects of spontaneously hypertensive rat plasma on blood pressure and tail artery calcium uptake in normotensive rats.*, *Am. J. Hypertens.*, 2;26-31, 1989.

- 282 Lewanczuk, R.Z., A. Chen, P.K.T. Pang, *The effects of dietary calcium on blood pressure in spontaneously hypertensive rats may be mediated by parathyroid hypertensive factor.*, Am. J. Hyperten., 3;349-353, 1990.
- 283 Benishin, C.G., R.Z. Lewanczuk, P.K. Pang, *Purification of parathyroid hypertensive factor from plasma of spontaneously hypertensive rats.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 88;6372-6376, 1991.
- 284 Pravenec, M., P. Klir, V. Kren, J. Zicha, J. Kunes, *An analysis of spontaneous hypertension in spontaneously hypertensive rats by means of new recombinant inbred strains.*, J. Hypertens., 7;217-222, 1989.
- 285 Folkow, B., *Physiological aspects of primary hypertension*, Physiol. Rev., 62;347-504, 1982.
- 286 Folkow, B., M. Hallback, J.V. Jones, M. Sutter, *Dependence on external calcium for the noradrenaline contractility of the resistance vessels in spontaneously hypertensive and renal hypertensive rats as compared to normotensive controls.*, Acta Physiol. Scand., 101;84-97, 1977.
- 287 Hatton, D.C., R.A. Buchholz, R.D. Fitzgerald, *Autonomic control of heart rate and blood pressure in SHR during aversive classical conditioning.*, Comp. Physiol. Psych., 95;978-990, 1981.
- 288 Rapp, J.P., *Dissecting the primary causes of genetic hypertension in rats.*, Hypertension, 18, suppl1;I18-I28, 1991.
- 289 Pravenec, M., D. Gauguier, J.J. Schott, J. Buard, V. Kren, V. Bila, C. Szpirer, J. Szpirer, J.M. Wang, H. Huang, E. St Lezin, M.A. Spence, P. Flodman, M. Printz, G.M. Lathrop, G. Vergnaud, T.W. Kurtz, *A genetic linkage map of the rat derived from recombinant inbred strains.*, Mammalian Genome, 7;117-127, 1996.
- 290 Chomczynski, P., N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.*, Anal. Biochem., 162;156-159, 1987.
- 291 Hartree, E.F., *Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response.*, Analyt. Biochem., 48;422-427, 1972.

- 292 Pravenec, M., D. Gauguier, J-J. Scott, J. Buard, V. Kren, V. Bila, C. Szpirer, *Mapping of quantitative trait loci for blood pressure and cardiac mass in the rat by genome scanning of recombinant inbred strains.*, J. Clin. Invest., 96;1973-1978, 1995.
- 293 Lang, F., M. Ritter, H. Völkl, D. Häussinger, *The biological significance of cell volume.*, Renal Physiol. Biochem., 16;48-65, 1993.
- 294 Gluzman, Y., *SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants.*, Cell, 23;175-182, 1981.
- 295 Strynadka, N.C.J., M.N.G. James, *Crystal structures of the helix-loop-helix calcium-binding proteins.*, Ann. Rev. Biochem., 58;951-998, 1989.
- 296 Haiech, J., M-C. Kilhoffer, T.J. Lukas, T.A. Craig, D.M. Roberts, D.M. Watterson, *Restoration of the calcium binding activity of mutant calmodulins toward normal by the presence of a calmodulin binding structure.*, J. Biol. Chem., 266;3427-3431, 1991.
- 297 Hou, J., J. Parrish, H-J Lüdecke, M. Sapru, Y. Wang, W. Chen, A. Hill, J. Siegel-Bartelt, H. Northrup, F.F.B. Elder, C. Chinault, B. Horsthemke, M.J. Wagner, D.E. Wells, *A 4-megabase YAC contig that spans the Langer-Giedion syndrome region on human chromosome 8q24.1: Use in refining the location of the trichorhinophalangeal syndrome and multiple exostoses genes (TRPS1 and EXT1).*, Genomics, 29;87-97, 1995.
- 298 Ahn, J., H-J Lüdecke, S. Lindow, W.A. Horton, B. Lee, M.J. Wagner, B. Horsthemke, D.E. Wells, *Cloning of the putative tumor suppressor gene for hereditary multiple exostoses (EXT1).*, Nature Genet., 11;137-143, 1995.
- 299 Touyz, R.M., B. Tolloczko, E.L. Schiffrin, *Blunted attenuation of angiotensin II mediates Ca<sup>2+</sup> transients by insulin in cultured unpassaged vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats.*, Am. J. Hypertens., 8;104-112, 1995.

- 300 Fardella, C., J.A. Rodriguez-Portales, *Intracellular calcium and blood pressure: comparison between primary hyperparathyroidism and essential hypertension.*, *Endocrinol. Invest.*, 18;827-832, 1995.
- 301 O'Neill, W.C., D.F., Steinberg, *Functional coupling of  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ - $2\text{Cl}^-$  cotransport and  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent  $\text{K}^+$  channels in vascular endothelial cells.*, *Am. J. Physiol.*, 269;C267-C274, 1995.
- 302 Orlov, S.N., S.R. Kuznetsov, I.A. Kolosova, S.L. Aksentsev, S.V. Konev, *Volume-dependent regulation of ion carriers in human and rat erythrocytes: Role of cytoskeleton and protein phosphorylation.*, *Russ. J. Physiol.*, 83,134-147, 1997.
- 303 Hamet, P., L. Richard, T-V Dam, E. Teiger, S.N. Orlov, L. Gaboury, F. Gossard, J. Tremblay, *Apoptosis in target organs of hypertension.*, *Hypertension*, 26;642-648, 1995.
- 304 Orlov, S.N., T-V. Dam, J. Tremblay, P. Hamet, *Apoptosis in vascular smooth muscle cells: Role of cell shrinkage.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 221;708-715, 1996.
- 305 Walter, S.V., P. Hamet, *Enhanced DNA synthesis in heart and kidney of newborn spontaneously hypertensive rats.*, *Hypertension*, 8;520-525, 1986.
- 306 Pang, S.C., C. Long, M. Poirier, J. Tremblay, J. Kunes, M. Vincent, J. Sassard, L. Duzzi, G. Bianchi, J. Ledingham, E.L. Phelan, F.O. Simpson, K. Ikeda, Y. Yamori, P. Hamet, *Cardiac and renal hyperplasia in newborn genetically hypertensive rats.*, *J. Hypertens.*, 4, suppl 3;S119-S122, 1986.
- 307 Hamet, P., *Proliferation and apoptosis of vascular smooth muscle in hypertension.*, *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, 4;1-7, 1995.
- 308 Hadrava, V., J. Tremblay, P. Hamet, *Abnormalities in growth characteristics of aortic smooth muscle cells in spontaneously hypertensive rats.*, *Hypertension*, 13;589-597, 1989.
- 309 Paquet, J.L., M. Baudoiu-Legros, P. Marche, P. Meyer, *Enhanced proliferating activity of cultured smooth muscle cells from SHR.*, *Am. J. Hypertens.*, 2;108-110, 1989.

- 310 Hamet, P., J. Tremblay, S.C. Pang, S.V. Walter, Y.I. Wen, *Primary versus secondary events in hypertension.*, Can. J. Physiol. Pharmacol., 63;380-386, 1985.
- 311 Vaux, D.L. *Toward an understanding of the molecular mechanisms of physiological cell death.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 90;786-789, 1993.
- 312 Teiger, E., T-V Dam, L. Richard, C. Wisnewsky, B.S. Tea, L. Gaboury, J. Tremblay, K. Schwartz, P. Hamet., *Apoptosis in pressure overload-induced heart hypertrophy in the rat.*, J. Clin. Invest., 97;2891-2897, 1996.
- 313 Hamet, P., D. de Blois, T-V Dam, L. Richard, E. Teiger, B.S. Tea, S.N. Orlov, J. Tremblay, *Apoptosis in vascular wall remodeling in hypertension.*, Can. J. Physiol. Pharmacol., 74; 850-861, 1996.
- 314 Orrenius, S., *Apoptosis: Molecular mechanisms and implications for human disease.*, J. Int. Med., 237;529-536, 1995.
- 315 Wicki, R., I. Marenholz, D. Mischke, B.W. Schäfer, C.W. Heizmann, *Characterization of the human S100A12 (calgranulin C, p6, CAAF1, CGRP) gene, a new member of the S100 gene cluster on chromosome 1q21.*, Cell Calcium, 20;459-464, 1996.
- 316 Gotzos, V., B. Schwaller, J-CH. Gander, M. Bustos-Castillo, M.R. Celio, *Heterogeneity of expression of the calcium-binding protein calretinin in human colonic cancer cell lines.*, Anticancer Res., 16;3491-3498, 1996.
- 317 Davies, B.R., R. Barraclough, M.P.A. Davies, P.S. Rudland, *Production of the metastatic phenotype by DNA transfection in a rat mammary model.*, Cell Biol. Int., 17;871-879, 1993.
- 318 Davies, B.R., M.P.A. Davies, F.E.M. Gibbs, R. Barraclough, P.S. Rudland, *Induction of the metastatic phenotype by transfection of a benign rat mammary epithelial cell line with the gene for p9Ka, a rat calcium-binding protein, but not with the oncogene EJ-ras-1.*, Oncogene, 8;999-1008, 1993.
- 319 Nygren, P., R. Larsson, E. Gylfe, E. Lindh, S. Ljunghall, J. Rastad, G. Åkerström, *Development of abnormal parathyroid cell function during monolayer culture and its*

- relation to cellular hypertrophy and proliferation.*, Acta Path. Microbiol. Immunol. Scand., 95, sect A;207-214, 1987.
- 320 Rudberg, C., L. Grimelius, H. Johansson, S. Ljungnall, R. Odselius, H. Perroft, J. Rastad, L. Wide, G. Akerstrom, *Alteration in density, morphology and parathyroid hormone release of dispersed parathyroid cells from patients with hyperparathyroidism.*, Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand., 94, sect A;253-261, 1986.
- 321 Cryns, V.L., S.M. Yi, H. Tahara, R.D. Gaz, A. Arnold, *Frequent loss of chromosome arm 1p DNA in parathyroid adenomas.*, Genes Chromos. Cancer, 13;9-17, 1995.
- 322 Moley, J.F., M.B. Brother, C-T Fong, P.S. White, S.B. Baylin, B. Nelkin, S.A. Wells, G.M. Brodeur, *Consistent association of 1p loss of heterozygosity with pheochromocytomas from patients with multiple endocrine neoplasia type 2 syndromes.*, Cancer Res., 52;770-774, 1992.
- 323 Leister, I., A. Weith, S. Brüderlein, C. Cziepluch, D. Kangwanpong, P. Schlag, M. Schwab, *Human colorectal cancer: High frequency of deletions of chromosome 1p35.* Cancer Res., 50;7232-7235, 1990.
- 324 Bièche, I., M-H Champème, F. Matifas, C.S. Cropp, R. Callahan, R. Lidereau, *Two distinct regions involved in 1p deletion in human primary breast cancer.*, Cancer Res., 53;1990-1994, 1993.
- 325 Maher, E.R., J.R.W. Yates, *Familial renal cell carcinoma: Clinical and molecular genetic aspects.*, Br. J. Cancer, 63;176-179, 1991.
- 326 Bindels, R.J.M., L.A.M. Van Den Broek, M.J.M. Jongen, W.H.L. Hackeng, C.W.G.M. Lowik, C.H. Van Os, *Increased plasma calcitonin levels in young spontaneously hypertensive rats: role in disturbed phosphate homeostasis.*, Pflugers Arch., 408;395-400, 1987.
- 327 Clementi, G., E. Rapisarda, C.E. Giore, A. Prato, M. Amico Roxas, C. Millia, R. Bernardine, S. Maugeri, U. Scapagnini, *Effects of salmon calcitonin on plasma renin activity and systolic blood pressure in the rat.*, Neurosci. Lett., 66;351-355, 1986.



- 238 Supowit, S.C., H. Zhao, D.M. Hallman, D.J. DiPette, *Calcitonin gene-related peptide is a depressor of deoxycorticosterone-salt hypertension in the rat.*, Hypertension, 29;945-950, 1997.
- 329 Westlund, K.N., D.J. DiPette, J. Carson, O.B. Holland, *Decreased spinal cord content of calcitonin gene related peptide in the spontaneously hypertensive rat.* Neurosci. Lett., 131;183-186, 1991.
- 330 Kristal-Boneh, E., P. Froom, G. Harari, J. Ribak, *Association of calcitriol and blood pressure in normotensive men.*, Hypertension, 30;1289-1294, 1997.
- 331 Pernot, F., C. Burkhard, A. Gairard, *Parathyroid cross-transplantation and development of high blood pressure in rats.*, J. Cardiovasc. Pharmacol., 23, suppl 2;S18-S22, 1994.
- 332 Pang, P.K.T., Lewanczuk, R.Z., *Parathyroid origin of a new circulating hypertensive factor in spontaneously hypertensive rats.*, Am. J. Hypertens., 2;898-902, 1989.
- 333 Palmer, J.A., W.A. Brown, W.H. Kerr, I.B. Rosen, N.A. Watters, *The surgical aspects of hyperparathyroidism.*, Arch. Surg., 110;1004-1007, 1975.
- 334 Harrison, T.S., B. Duarte, R.E. Reitz, R. Princethal, J.F. Seaton, E.M. Badder, W.P. Graham 3rd., *Primary hyperparathyroidism: four to eight year postoperative follow up demonstrating persistent functional insignificance of microscopic parathyroid hyperplasia and decreased autonomy of parathyroid hormone release.*, Ann. Surg., 194;429-437, 1981.
- 335 Evans, H.L., *Criteria for diagnosis of parathyroid carcinoma.*, Surg. Pathol., 4;244-265, 1991.
- 335b Slatopolsky, E., J.A. Delmez, *Pathogenesis of secondary hyperparathyroidism.*, Nephrol. Dial. Transplant., 11 (suppl 3); 130-135, 1996.
- 336 George, J.M., A.S. Rabson, A. Ketcham, F.C. Bartter, *Calcareous renal disease and hyperparathyroidism.*, Q. J. Med., 34;291-301, 1965.
- 337 Felix, R., W. Hofstetter, M.G. Cecchini, *Recent developments in the understanding of the pathophysiology of osteopetrosis.*, Eur. J. Endocrinol., 134;143-156, 1996.

- 338 Sly, W.S., D. Hewett-Emmett, M.P. Whyte, Y-S. Yu, R.E. Tashian, *Carbonic anhydrase II deficiency identified as the primary defect in the autosomal recessive syndrome of osteopetrosis with renal tubular acidosis and cerebral calcification.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80;2752-2756, 1983.
- 339 Kumpulainen, T., *Immunohistochemical localization of human carbonic anhydrase isoenzymes.*, Ann. N.Y. Acad. Sci., 429;359-368, 1984.
- 340 Anderson, R.E., W.S.S. Jee, D.M. Woodbury, *Stimulation of carbonic anhydrase in osteoclast by parathyroid hormone.*, Calcif. Tissue Int., 37;646-650, 1985.
- 341 Zhou, Z., E. Neher, *Mobile and immobile calcium buffers in bovine adrenal chromaffin cells.*, J. Physiol., 469;245-273, 1993.
- 342 Hermann, A., J.A. Cox, *Sarcoplasmic calcium-binding protein.*, Comp. Biochem. Physiol., 111B;337-345, 1995.
- 343 Takenaga, K., Y. Nakamura, S. Sakiyama, Y. Hasegawa, K. Sato, H. Endo, *Binding of pEL98 protein, an S100-related calcium-binding protein, to nonmuscle tropomyosin.*, J. Cell Biol., 124;757-768, 1994.
- 344 Takenaga, K., Y. Nakamura, H. Endo, S. Sakiyama, *Involvement of S100-related calcium-binding protein pEL98 (or mts1) in cell motility and tumor cell invasion.*, Jap. J. Cancer Res., 85;831-839, 1994.
- 345 Resnick, L.M., *Calcium metabolism in hypertension and allied metabolic disorders.*, Diabetes Care., 14;505-520, 1991.
- 346 Levy, J., J.R. Gavin, J.R. Sowers, *Diabetes mellitus: A disease of abnormal cellular calcium metabolism?*, Am. J. Med., 96;260-273, 1994.
- 347 Barbagallo, M., J. Shan, P.K. Pang, L.M. Resnick, *Glucose induced alterations of cytosolic free calcium in cultured rat tail artery vascular smooth muscle cells.*, J. Clin. Invest., 95;763-767, 1995.
- 348 Nosadini, R., A. Semplicini, P. Fioretto, L. Lusiani, R. Trevisan, V. Donadon, G. Zanette, G.L. Nicolosi, V. Dall'Aglio, D. Zanuttini, G.C. Viberti, *Sodium-lithium*

- countertransport and cardiorenal abnormalities in essential hypertension.*, Hypertension, 18;191-198, 1991.
- 349 Schlessinger, J., A. Ullrich, *Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases.*, Neuron, 9;383-391, 1992.
- 350 Solini, A., F. Di Virgilio, A. Sfriso, M. Bruseghin, G. Crepaldi, R. Nosadini., *Intracellular calcium handling by fibroblasts from non-insulin dependent diabetic patients with and without hypertension and microalbuminuria.*, Kidney Int., 50;618-626, 1996.
- 351 Jacobs, M-C., J.W.M. Lenders, J.J. Willemsen, T. Thien, *Adrenomedullary secretion of epinephrine is increased in mild essential hypertension.*, Hypertension, 29;1303-1308, 1997.
- 352 Bravo, E.L., *Evolving concepts in the pathophysiology, diagnosis, and treatment of pheochromocytoma.*, Endocrinol. Rev., 15;356-368, 1994.
- 353 Creutz, C.E., S. Moss, J.M. Edwardson, I. Hide, B. *Differential recognition of secretory vesicles by annexins.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 184;347-352, 1992.
- 354 Drust, D.S., C.E. Creutz, *Aggregation of chromaffin granules by calpactin at micromolar levels of calcium.*, Nature, 331;88-91, 1988.
- 355 McGrath, C.M., H.D. Soule, *Calcium regulation of normal human mammary epithelial cell growth in culture.*, In Vitro, 20;652-662, 1984.
- 356 Kuneš, J., S.C. Pang, M. Cantin, J. Genest, P. Hamet, *Cardiac and renal hyperplasia in newborn spontaneously hypertensive rats.*, Clin. Sci., 72;271-275, 1987.
- 357 Kuneš, J., V. Kren, P. Klír, J. Zicha, M. Pravenec, *Genetic determination of heart and kidney weights studied using a set of recombinant inbred strains: the relationship to blood pressure.*, Hypertension, 8;1091-1095, 1990.
- 358 Dobešová, Z., J. Zicha, J. Kuneš, *Newborn organ weight and spontaneous hypertension: Recombinant inbred strain study.*, Clin. Exp. Hypertens., 19;403-415, 1997.

- 359 Hamet, P., Z. Pausova, P. Dumas, Y.L. Sun, J. Tremblay, M. Pravenec, J. Kunes, D. Krenova, V. Kren, *Newborn and adult recombinant inbred strains: a tool for the search of genetic determinants of target organ damage in hypertension.*, *Kidney Int.*, 1997 (soumis).

## **VII-ANNEXE 1**

### **1. Manuscrit de HCaRG**

**A NOVEL HYPERTENSION-RELATED CALCIUM-REGULATED GENE (HCaRG)  
MODULATED IN THE PARATHYROID BY EXTRACELLULAR CALCIUM**

**Johanne Tremblay<sup>1\*</sup>, Hong-Peng Jia<sup>1</sup>, Sylvie Richard<sup>1</sup>, Francis Gossard<sup>1</sup>, Yulin Sun<sup>1</sup>,  
Michal Pravenec<sup>2</sup>, Vladimir Kren<sup>3</sup>, Pavel Hamet<sup>1</sup> and Richard Lewanczuk<sup>4</sup>**

**<sup>1</sup>Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montréal, Canada**

**<sup>2</sup>Institute of Physiology, Academy of Sciences, Prague, Czech Republic**

**<sup>3</sup>Institute of Biology, Faculty of Medicine, Prague, Czech Republic**

**<sup>4</sup>Department of Endocrinology, University of Alberta, Edmonton, Canada**

**Key words: Calcium, gene, hypertension**

**Short title: A novel hypertension-related-calcium-regulated gene**

**\*To whom correspondence should be addressed.**

**Laboratory of Cellular Biology of Hypertension**

**Centre Hospitalier Universitaire de Montréal**

**3840 St. Urbain St., Montréal, Québec H2W 1T8, Canada**



## SUMMARY

As negative calcium balance is present in the spontaneously hypertensive rat, we set up a search for gene(s) involved in this dysregulation. A cDNA library was constructed from spontaneously hypertensive rat parathyroid gland which is a key regulator of serum ionized calcium. RNA extracted from parathyroid cells cultured in low calcium was reversed-transcribed and submitted to rapid amplification of cDNA ends to generate products used for northern blots, *in situ* hybridization and to screen the library. From 7 overlapping DNA fragments, a 1100 bp novel cDNA containing an open reading frame of 224 codons was reconstituted. The deduced protein showed no transmembrane domain, a 67%  $\alpha$ -helix content and a calcium-binding site EF-hand motif. mRNA levels of this novel gene were significantly higher in hypertensive rats. *In situ* hybridization was positive for the parathyroid gland, the adrenal cortex and medulla, and the tubular fraction of the kidney cortex. No hybridization was detected in liver, lung and heart ventricles. Expression of the gene was negatively regulated by extracellular calcium in cultured parathyroid cells and positively regulated by PMA and dexamethasone under physiological calcium concentrations. Above results strongly suggest a novel hypertension-related-calcium-regulated gene. Chromosomal mapping using rat recombinant inbred strains localized this gene to the long arm of rat chromosome 7.

## INTRODUCTION

The concentration of ionized calcium in plasma is maintained within a very narrow range. The major players maintaining extracellular calcium homeostasis are the calciotropic hormones, parathyroid hormone (PTH),<sup>1</sup> 1,25 dihydroxyvitamin D and calcium itself. Indeed, extracellular calcium regulates its own concentration as an extracellular messenger by acting on recently-cloned calcium receptors or calcium sensors. The Ca sensor (receptor) is linked to several intracellular second messenger systems via guanylyl nucleotide-regulating G proteins and activates a phosphoinositide-specific phospholipase C, leading to accumulation of inositol 1,4,5 trisphosphate (IP3) and diacylglycerol (1-3).

Cells of the parathyroid gland possess such a calcium sensor (1,4,5) Even slight reductions in extracellular ionized calcium concentration (in the order of 1-2% or less) elicit prompt increases in the rate of PTH secretion and of its mRNA levels. Historically, study of the parathyroid gland has focused on the chemistry, regulation, synthesis and secretion of PTH. There is growing interest in other calcium-regulating proteins of the gland that are also negatively regulated by extracellular calcium, such as chromogranin A or Secretory Protein-I (SP-I) (6) as well as in a hypertensive

---

### <sup>1</sup>List of abbreviations

<b>BN</b>	Brown Norway
<b>ORF</b>	Open reading frame
<b>PHF</b>	Parathyroid hypertensive factor
<b>PTC</b>	Parathyroid cells
<b>PMA:</b>	Phorbol 12-myristate 13-acetate
<b>PTH:</b>	Parathyroid hormone
<b>RACE:</b>	Rapid amplification of cDNA ends
<b>RT:</b>	Reverse transcription
<b>PCR:</b>	Polymerase chain reaction
<b>SDS:</b>	Sodium dodecyl sulfate
<b>SHR:</b>	Spontaneously hypertensive rat
<b>WKY:</b>	Wistar-Kyoto rats



factor of parathyroid origin, PHF (7,8). We have also described a cellular factor in heart, vascular smooth muscle cells and kidneys with similar calcium regulation (9,10).

Arterial hypertension is associated with numerous disturbances of calcium metabolism depicted not only in human hypertension but also in experimental models of genetic as well as acquired hypertension (11-15). These abnormalities are not uniform but depend on several variables, including the type of hypertension (low renin versus high renin), dietary ions and energy intake (16). Disturbances in renal and intestinal handling of calcium in hypertension have been reported by a number of investigators (17). Urinary calcium has generally been found to be increased (so-called urinary leak) and intestinal calcium absorption diminished in genetically hypertensive rats (17). In the spontaneously hypertensive rat (SHR), there is also a decrease in bone calcium content as well as in mineral density and therefore a negative calcium balance compared with normotensive WKY control rats. Cytoplasmic free calcium concentration has most often been found to be increased in circulating platelets, lymphocytes, erythrocytes, and vascular smooth muscle cells of hypertensive animals and humans (for review, see (18)). Furthermore, sensitivity to several vasoconstrictors and extracellular calcium has been shown to be increased in vascular beds of SHR in the early hypertensive stage (19). It has been proposed that widespread abnormalities of intracellular calcium handling (not limited to cells of the cardiovascular system) are involved in the pathogenesis of primary hypertension. In SHR, as well as in low renin hypertensive patients, there seems to be an inverse relationship between extracellular and intracellular calcium (20). Plasma membrane-mediated maldistribution of calcium/magnesium between intracellular and extracellular sites would lead to a state of high intracellular calcium concentration in the presence of low extracellular calcium, according to the hypothesis of Resnick (20). A high salt diet also decreases extracellular calcium levels with a reciprocal salt-induced elevation in intracellular free calcium (21). The molecular and genetic mechanisms of these disturbances in hypertension remain unresolved.

The parathyroid gland has been linked with hypertension in the SHR. Given its role in calcium homeostasis, we hypothesized that certain genetic abnormalities might be responsible for the link between hypertension, calcium homeostasis and the parathyroid gland in some forms of hypertension. To identify new genes that might be abnormally regulated by extracellular calcium in the parathyroid gland of genetically hypertensive rats, we prepared a cDNA library from the parathyroids of SHR. Using a combination of rapid amplification of cDNA ends (RACE) and screening of the library, a 1100-bp cDNA was reconstituted with an open reading frame of 672 bp followed by a poly A tail. No complete homology to the cDNA sequence was found in the GenBank. This novel gene is negatively regulated by extracellular calcium with higher levels in SHR. The deduced protein possesses an EF-hand-like motif, that could be involved in intracellular calcium regulation.

## **EXPERIMENTAL PROCEDURES**

### ***Parathyroid cell cultures***

Parathyroid cells (PTC) were isolated from SHR and WKY rats. Primary cultures were passaged in DMEM medium with 10% fetal calf serum as described previously (22). Forty-eight hours before the experiments, the cells were maintained in F12 medium containing a low (0.3 mM) or normal Ca concentration (2.0 mM).

### ***RNA, genomic DNA and cDNA preparation***

Total RNA was prepared from PTC using the standard guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform method (23) and kept at -70°C until used. Total RNAs were prepared from SHR or WKY rat PTC incubated under conditions described above. cDNAs, unless stated, were synthesized using random hexamers for 1st strand synthesis. Genomic DNA was extracted from liver of SHR and BN rats as well as from their 31 recombinant inbred strains as described (24). Genomic DNA was also extracted from human lymphocytes.

### ***RACE***

Four mixtures of degenerate oligonucleotide primers were initially designed according to a putative amino acid sequence of PHF with the following degenerate sequence: 5' TA(T/C) TCI GTI TCI CA(T/C) TT(T/C) A/(CG) 3'. From initial RACE experiments (described below) one unique sequence primer TAC TCC GTG TCC CAC TTC CG was selected for its ability to generate RT-PCR DNA fragments from PTC total RNA and used subsequently as candidate primer for 3'-RACE. In brief, for 3'-RACE, total RNA from PTC was reverse-transcribed with a hybrid primer consisting of oligo(dT) (17 mer) extended by a unique 17-base oligonucleotide (adaptor). Amplification by PCR was subsequently performed using the adaptor which bound to cDNA at its 3'-ends, and the candidate primer mentioned above. For 5'-RACE, RT was undertaken with an internal primer derived from the sequence of the cDNA fragment generated by 3'-RACE. A dA homopolymer was then appended to tail the first strand reaction products using terminal deoxynucleotidyl transferase. Finally, PCR amplification was accomplished with the hybrid primer described previously and a second internal primer upstream to the first one.

### ***Subcloning***

The DNA fragments generated from RACE experiments were separated by electrophoresis, isolated from agarose gel and extracted by the phenol-chloroform method (23). pSP72 vector plasmid (Promega), was digested at the Sma I site and ligated to blunted DNA fragments with T4 DNA ligase. Transformed DH5 $\alpha$  bacteria were grown and recombinant bacteria were selected by PCR.

### ***Sequencing***

Double-stranded sequencing of cloned cDNA inserts was performed with Sequenase Version 2.0 (USB). 5  $\mu$ g of recombinant vector template were denatured, annealed with T7 or SP6 primers, and labelled with S<sup>35</sup>-dATP by extension, using the chain termination method of Sanger

according to the manufacturer protocol (Sequence Version 2.0, DNA sequencing kit from United States Biochemical (USB), Cleveland, Ohio).

### ***SHR parathyroid cDNA library***

Parathyroid glands were removed from approximately 100 12-week-old SHR and frozen immediately in liquid nitrogen. The glands were added to a guanidinium thiocyanate solution and homogenized. Poly A RNA was obtained by phenol-chloroform extraction, ethanol precipitation and separation on an oligo(dT) column and stored in ethanol at -80°C until used. The cDNA library was constructed with the above RNA as template and the ZAP-cDNA synthesis kit (Stratagene, La Jolla, CA). A summary of the protocol is as follows: mRNA was reverse transcribed from an XhoI-linker oligo(dT) primer using Moloney-Murine leukemia virus reverse transcriptase. Second strand synthesis was then produced with DNA polymerase I in the presence of RNaseH. cDNA was extracted with phenolchloroform (1:1), precipitated with sodium acetate, washed with 80% ethanol and resuspended in sterile water. Following this step, cDNA termini were blunted by incubation with the Klenow fragment of DNA polymerase I and dNTPs in a ligase buffer. cDNA was again precipitated, washed and resuspended. After this wash, EcoRI adaptors were added using T4 ligase and the ends phosphorylated with T4 polynucleotide kinase. This mixture was then digested with Xho 1 to release adaptors from the 3' end of the cDNA. The resulting mixture was separated on a Sephacryl S-400 column. Eluted cDNA was precipitated with 100% cold ethanol and resuspended in sterile water. Subsequent to the above process, cDNAs were ligated into the Uni-ZAP XR vector using T4 DNA ligase, thus forming the cDNA library. The resultant library was packaged into Gigapack II Gold packaging extract. The packaged products were plated onto XL1-Blue MRF' cells and recombinant numbers determined. The library was then amplified by mixing the packaging mixture with host bacteria (XL1-Blue MRF' cells). It was stored at -80°C until screened. For screening, phages were plated onto bacterial host plates (XL1-Blue MRF') and incubated overnight. After chilling at 4°C for 2 hours, a nitrocellulose filter was overlaid for 2 minutes. The filter was then denatured in 1.5M

NaCl/0.5M NaOH and neutralized in 1.5M NaCl with 0.5M Tris-HCl (pH 8.0). The filter was rinsed and DNA crosslinked to it with UV light. The filters were then pre-hybridized and hybridized using standard techniques with a digoxigenin-dUTP labeled probe (Boehringer Mannheim Biochemica). The probes used were derived from 3'- and 5'- RACE DNA fragments described earlier.

#### ***Northern blot hybridization and semi-quantitative RT-PCR***

Ten  $\mu$ g of total RNA from PTC were denatured at 68°C and separated on denaturing formamide 1% agarose gel. The gel was transferred onto nitrocellulose by vacuum with 20X SSC. The membrane was then exposed to UV light to fix RNA, and pre-hybridized in a solution containing 1X SSPE, 0.1%SDS, 1X Denhardt's and 10% dextran sulfate for at least 4 hours. Hybridization was performed overnight in the same buffer containing  $^{32}$ P -labeled probes generated from cDNA clone(s) by PCR or random labeling. For semi-quantitative determinations of specific mRNA, total RNA was extracted from incubated PTC and reverse-transcribed. Two sets of PCR reactions with radioactive nucleotides were then performed on the cDNA mixture: a first using specific primers from sequenced DNA and a second using primers to rat ribosomal 18S RNA (rRNA). Results were expressed as ratio of the density of specific DNA band to 18S rRNA band detected and quantified with the PhosphoImager (Molecular Dynamics).

#### ***In situ mRNA hybridization***

Tissues from SHR and WKY rats were rinsed in phosphate buffer, fixed in 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin. 3 to 5  $\mu$ m sections were cut and mounted on microscope slides pretreated with aminopropylthiethoxysilane. The slides were dried at 37°C, then at 60°C for 10 minutes prior to use. The probe used was a unique 3'-RACE 300-bp fragment (Fig. 2) which had been subcloned into the BamH I site of a pSP72 vector. Briefly, plasmid DNA was purified and linearized with HindIII or EcoR I digestion, followed by phenol-chloroform extraction. After gel confirmation, the DNA was transcribed using T7 or Sp6 polymerases to create sense and

antisense riboprobes. The probes were labeled with digoxigenin-UTP, using a tailing reaction. They were validated by dot-blot hybridization with template DNA. Prehybridization of slides was undertaken after de-waxing in xylene followed by progressive ethanol-water hydration (95% to 50%). The slides were rinsed in phosphate buffered saline (PBS) and incubated with proteinase K (20 µg/ml) for 20 minutes at room temperature. Following this digestion, they were rinsed successively in glycine buffer, PBS and then dehydrated in ethanol. Actual prehybridization was done with 50% formamide, 0.2% SDS, 0.1% Sarcosyl, 5X SSC and 2% blocking reagent (Boehringer Mannheim Biochemica) for 1 hour at 60°C.

Hybridization was performed by adding the probe (200 ng/ml) in a volume of 50 µl of 4X SSC and 50% formamide per section. The slides were incubated overnight at 60°C in a humidified chamber. During hybridization, a coverslip was placed over the tissue section. Following hybridization, it was removed and the sections rinsed in 4X SSC, then washed in 4X SSC for 15 minutes, followed by washing in 2X SSC for 15 minutes, at room temperature. Finally, the sections were washed with 0.1% SSC for 30 minutes at 60°C. For coloration, the sections were washed with Buffers 1 and 2 of the DIG Luminescent Detection Kit (Boehringer Mannheim Biochemica). They were incubated with anti-DIG alkaline phosphatase antibody 1:500 in Buffer 2 for 40 minutes, then washed twice in Buffer 1 for 15 minutes and in Buffer 3 for 2 minutes. Incubation in the color solution (NBT/x-phos) was carried out for 45 minutes, after which the slides were washed in distilled water and dry-mounted with Geltol.

### ***In vitro translation***

The full length of HCaRG coding sequence was synthesized by RT-PCR with specific primers and inserted downstream of the T7 promoter into the pSP 72 vector. *In vitro* transcription and translation were performed using a TNT-T7 coupled reticulocyte lysate system (Promega) in the presence of <sup>35</sup>S-methionine. A plasmid containing the luciferase gene and supplied by the manufacturer was used as a control. The synthesized proteins were analyzed by 15% SDS

polyacrylamide gel electrophoresis in the absence or presence of  $\beta$ -mercaptoethanol. Radioactive protein bands were detected by scanning with a PhosphoImager (Molecular Dynamics).

***RFLP analysis and chromosomal mapping***

Southern blot analysis was performed on 10 $\mu$ g genomic DNA of SHR and BN.lx rats with the following restriction enzymes BamH I, Bgl II, EcoR I, Hind III, Kpn I and Pst I. The probe consisted of the <sup>32</sup>P-labeled fragment of 860bp of HCaRG shown in Fig. 2 (upper). A clear RFLP genotyping for the B (BN.lx) allele (12 kb) or S (SHR) allele (2.2 kb) was then detected with the Bgl II restriction enzyme in the 33 recombinant inbred strains using the Map Manager program of Manly (version 2.6.5) (25). The strain distribution pattern of this RFLP was then analyzed by Pearson's correlation for segregation with 500 markers localized in the rat genetic map (26). The address of RATMAP is <http://www.ratmap.gen.gu.se>

## RESULTS

### *Isolation of a novel cDNA negatively regulated by extracellular calcium in the parathyroid*

Using sense candidate primers and a hybrid primer (oligo dT), 3'-RACE generated one major 700bp fragment that was digested and cloned in the BamH I site of pSP72. As a BamH I site was present in the 700-bp fragment, a recombinant plasmid containing a 300-bp insert was isolated and sequenced. No homologous sequence was found in GenBank. PTC from WKY rats and SHR were cultured in normal or low calcium medium. Total RNA was extracted and separated on denaturing formamide agarose gel. After transfer and hybridization with the <sup>32</sup>P labeled 300-bp fragment, a RNA transcript of about 1.4 kb was detected in each lane (Figure 1). mRNA levels were found to be 5 fold higher in cells incubated in low calcium medium for both WKY and SHR cells suggesting this new gene to be regulated by extracellular calcium. In addition, the mRNA levels of this gene were about 2-fold higher in SHR compared to WKY cells in both low and high calcium conditions. Because this new mRNA appeared to be regulated by extracellular calcium and expressed more in cells from hypertensive animals, we have named it, Hypertensive-related-Calcium-regulated-gene (HCaRG). The 300bp fragment was used subsequently for *in situ* hybridization, to screen the PTC library and to generate new oligonucleotide primers to extend the cDNA towards the 5'- and 3'-ends. In further 3'-RACE experiments, generated cDNA fragments were cloned in a blunt Sma I site of pSP72. From seven overlapping DNA fragments isolated in the above experiments, a 1100-bp cDNA was reconstituted (Figure 2 upper) suggesting an almost full-length cDNA sequence estimated at 1.4kb in northern hybridization experiments (Figure 1).

### *Sequence and structure of the novel rat cDNA*

The rat 1100-bp cDNA reconstituted sequence contained an open reading frame of 224 codons preceded by 2 in-frame stop codons and followed by the most frequent variant of the polyA tail (Figure 2 lower). The cDNA deduced protein contains 224 amino acids with a calculated molecular weight of 22456 Da. The estimated pI of the protein is 6.0. It contains no membrane



spanning motif but has 67% of alpha-helix content. There are 2 cysteins in the sequence, suggesting possible intramolecular disulfide bridges (C64-C218). The protein has several putative phosphorylation sites and one potential Asn-glycosylation site. A homology to the calcium-binding EF-hand motif (8 out of 10 most conserved amino acids) was found (Figure 3). Further analysis of the putative protein structure with the PROPSEARCH database did not reveal any other strong consensus motif. An homology search in GenBank using the total cDNA sequence revealed some similarities with two uncharacterized randomly-selected human cDNA fragments. Thus, at first glance, HCaRG appears to be a novel gene not yet reported and does not seem to belong to any described protein families.

#### ***Hormonal regulation of HCaRG mRNA levels in PTC***

We initiated studies on the regulation of HCaRG expression in PTC. Cells between 5-9 passages were used. Lowering of ambient calcium from 2.0 mM to 0.3 mM induced a rapid increase of HCaRG mRNA levels (maximum at 2 hours), lasting up to 48 hours (not shown). This effect of lowering calcium is mimicked by a protein kinase C agonist (10  $\mu$ M, PMA) in normal calcium medium. Dexamethasone (1  $\mu$ M) also increased the mRNA level of HCaRG in normal calcium medium, but inhibited it slightly in low calcium medium (Figure 4). Similar effects were noted in cells derived from WKY or SHR (not shown).

#### ***In situ mRNA hybridization***

HCaRG expression was determined in WKY and SHR tissues by *in situ* hybridization. Labeled antisense riboprobe hybridized to parathyroid glands of both WKY and SHR with a higher signal in SHR (Figure 5). Expression was also detected in the medulla and zona fasciculata of the adrenal cortex (Figure 6a), again with higher hybridization in the SHR medulla as compared to WKY rats (Fig 6b). In the kidney, labeling was almost exclusively located in the renal cortex and concentrated in the tubular part contrasting with a virtual absence of the signal in glomeruli (Figure 7). In all these organs, the signal was clearly higher in hypertensive animals (Figures 5,

6b, and 7). Organs which presented only traces of hybridization were the liver (Figure 7) the lung and heart ventricles (not shown). The sense probe was used as a negative control and appropriately revealed a low signal under our hybridization conditions, demonstrating specificity of the reaction.

#### ***In vitro translation of HCaRG***

To confirm that HCaRG mRNA encodes a peptide of expected size, the cDNA of HCaRG inserted into pSP72 was incubated *in vitro* in a coupled transcription/translation labelling system. The HCaRG cDNA was transcribed by T7 RNA polymerase, and translated in rabbit reticulocyte lysate. As shown in Figure 8, HCaRG mRNA directed the synthesis of a peptide with a molecular mass of 29kDa which closely corresponded to the molecular weight estimated from the amino acid sequence.

#### ***Chromosomal localization of HCaRG***

From initial restriction digestions of rat genomic DNA, a Bgl II polymorphism was found in HCaRG gene in SHR and BN.lx rats (Figure 9). We have used this polymorphism to determine the chromosome localization of rat HCaRG using recombinant inbred strains. The allelic distribution of the Bgl II polymorphism in 33 RI strains detected by HCaRG was compared to the strain distribution pattern of 500 markers in the same RI strains (see Experimental procedures). We have found that HCaRG locus co-segregated with D7Cebrp187s3/D7Cebr77s1 on chromosome 7 with recombination fraction of zero in 31 RIS. Therefore, HCaRG gene was placed in a 4.4 centimorgan long region between Myc and CYP11B2 of rat chromosome 7 (Fig. 9). On the right side of Figure 9, a possible position of human homologous gene is depicted as based on conserved linkage on rat chromosome 7 and human chromosome 8.

## DISCUSSION

The cloning of a novel extracellular calcium-responsive gene (HCaRG) in the rat parathyroid gland is described here. HCaRG mRNA levels were higher in cultured PTC in low calcium medium and in several organs of SHR compared to their normotensive counterparts. A decrease in extracellular calcium elevated the levels of HCaRG mRNA and conversely an increase in extracellular calcium reduced HCaRG in the parathyroid gland. The recent cloning of an extracellular calcium-sensing receptor from the parathyroid gland has provided novel insights into the mechanisms of direct action of extracellular calcium on several cell types. The calcium receptor is a member of the superfamily of G protein-coupled receptors activating phospholipase C. In the parathyroid gland, it is a key mediator of inhibition of PTH expression by high calcium. The calcium sensor has been shown, in the kidney, to directly inhibit tubular reabsorption of calcium and magnesium in the thick ascending loop (for review see (27)). In PTC cultures prepared from human parathyroid adenomas, low extracellular calcium (0.3 mM) and a protein kinase C agonist (TPA, 160  $\mu$ M) increased PTH secretion and mRNA levels whereas augmenting calcium in the incubation medium reduced PTH mRNA. TPA blocked the inhibitory action of high calcium, confirming that protein kinase C mediates the effect of the calcium sensor. We show here that HCaRG gene expression is regulated in a manner similar to PTH in PTC isolated from the rat. In addition to PMA and low extracellular calcium, HCaRG mRNA levels are upregulated by a glucocorticoid receptor agonist, dexamethasone, under physiological extracellular calcium conditions.

To date, very few extracellular calcium-negative responsive genes have been cloned. Parathormone was the first gene described to possess a negative calcium-responsive element in its 5' flanking region. Several types of negative calcium responsive elements (nCARE) have been described: type 2 is a regulatory element consisting of a palindromic core sequence and several upstream T nucleotides originally described in PTH gene (REF). Its transcriptional inhibitory

activity is orientation-specific. A recent report has shown (28) that the nCARE core is contained in an Alu-repeat found to be present in 111 copies in the human genome, suggesting the possibility that other genes may possess a functional nCARE including HCaRG.

No homologous protein sequence to HCaRG open reading frame was found in the SWISSPROTEIN database. It is thus premature to speculate about its protein function. Nevertheless, HCaRG is not only expressed in the parathyroid gland but also in the adrenal cortex and medulla, and in the kidney cortex. Higher levels in the tissues of genetically hypertensive animals were found consistently, suggesting abnormalities of HCaRG regulation in several organs of SHR that could be due to either: 1) decreased extracellular calcium levels; 2) an abnormal response to extracellular calcium; or 3) abnormal transcription/stability of HCaRG in hypertensive rats or a combination of these. The first possibility has already been demonstrated in SHR: as mentioned in the Introduction, a state of negative calcium balance has been described in SHR. The second possibility is unlikely since cell culture studies have shown the same sensitivity to ambient calcium in PTC from SHR and normotensive WKY rats. The third possibility appears to apply here and will be tested in future studies.

The HCaRG coding sequence contains 1 consensus motif known as the EF-hand or HLH Ca motif. This motif generally consists of a 12 residues Ca-binding loop flanked by 2  $\alpha$ -helices. Eight of 10 most conserved amino acids are present in HCaRG but its calcium binding properties remain to be determined. Usually, the basic structural/functional unit consists of a pair of calcium-binding sites rather than a single HLH motif. HCaRG contains only 1 EF-like motif but it is possible that its high  $\alpha$ -helix content favors coiled-coil interactions and dimerization of the protein. Pairing of the 2 EF-hand motifs may enhance its calcium function. Hodges et al.(29,30) have demonstrated that domain III of troponin C (a synthetic 34-residue calcium-binding domain) can form a symmetric 2-site homodimer in a head-to-tail arrangement in the presence of calcium (31). Similarly, a 39-residue proteolytic fragment containing calcium binding site IV of troponin

C was shown to form a dimer (32). These studies and others (33,34) have demonstrated that dimerization of single HLH structures controls calcium affinity and that even homodimers can bind 2 calcium molecules with positive cooperativity (30). Hydrophobic interactions at the interface between calcium-binding sites appear to stabilize the calcium domains. Our *in vitro* translation studies showed the appearance of a protein band of about 43 kDa under non-reducing conditions. HCaRG appears to form reductant-sensitive, non-covalent homodimers compatible with its putative high content of  $\alpha$ -helix. The existence of a functional calcium domain in HCaRG remains to be established.

From a search of homologous sequences in Genebank, two short cDNA sequences from a human infant brain cDNA library were found (accession numbers R21076 and R46252). These partial sequences had been selected randomly from that cDNA library. Homology was also found with short fragments of exon-like sequence on human chromosome 8. From these partially homologous human sequences and rat HCaRG sequence, specific human primers were synthesized and used to RT-PCR amplify DNA fragments using human genomic DNA as template. A 900-bp fragment was isolated, cloned and partially sequenced. A 464-bp of this cDNA fragment was found to be 75% homologous to the rat sequence with 86% homology in the deduced amino acid sequence (not shown). The EF-hand-like motif found in rat HCaRG was observed in the human sequence. Human HCaRG was found to be expressed in several human tissues including the parathyroid glands, the adrenals, placenta, lymphocytes, pancreas, breast and colon (not shown).

In conclusion, we have cloned the cDNA of a novel gene that is regulated negatively by extracellular calcium and showed greater expression in several organs of the genetically hypertensive rat model of hypertension which is known to demonstrate a negative calcium balance. HCaRG mRNA levels are rapidly regulated by calcium probably via its action on calcium receptor signaling leading to protein kinase C activation and via steroid hormones. Experiments

defining the role of its protein product at the cellular level and its involvement in the pathogenesis of hypertension are currently in progress.

## ACKNOWLEDGMENTS

These studies were supported in part by grants from the Medical Research Council of Canada (MT- 12563 to J T and RL) and Bayer AG to PH. Sylvie Richard was the recipient of a studentship from the Société Québécoise de l'Hypertension. The authors would like to acknowledge the excellent technical help of Mrs Suzanne Cossette, Carole Long, Mary Ahay and Soledad Sawada. Analyses of the protein structure of rat HCaRG was performed by Dr. Pawel Grochulski from the Biotechnology Institute of Montreal. The secretarial skills of Mrs. Juliette Gosselin and Josée Bédard-Baker and the editorial help of Mr. Ovid Da Silva are greatly appreciated.

## REFERENCES

1. Shoback, D. M., Membreno, L. A., and McGhee, J. (1988) *Endocrinology* **123**, 382-389(Abstract)
2. Brown, E. M., Enyedi, P., LeBoff, M., Rothberg, J., Preston, J., and Chen, C. (1987) *FEBS Lett* **218**, 113-118
3. Kifor, O., Kifor, I., and Brown, E. M. (1992) *J Bone Mineral Res* **7**, 1327-1336
4. Brown, E. M. (1991) *Physiol Rev* **71**, 371-411
5. Nygren, P., Gylfe, E., and Larsson, R. (1988) *Biochim Biophys Acta* **260**
6. Cohn, D. V., Fasciotto, B. H., Zhang, J. X., and Gorr, S. U. (1994) in *The parathyroids: Basic and clinical concepts* (Bilezikian, J. P., Marcus, R., and Levine, M. A., eds) pp. 107-119, Raven Press, New York
7. Kaneko, T., Ohtani, R., Lewanczuk, R. Z., and Pang, P. K. T. (1989) *Am J Hypertens* **2**, 549-552
8. Shan, J., Lewanczuk, R. Z., Benishin, C. G., and Pang, P. K. T. (1990) *J Hypertens* **8** (Suppl. 3), S118
9. Huang, S. L., Wen, Y. I., Kupranycz, D. B., Pang, S. C., Schlager, G., Hamet, P., and Tremblay, J. (1988) *J Clin Invest* **82**, 276-281
10. Dumas, P., Tremblay, J., and Hamet, P. (1994) *Am J Med Sci* **307**(Suppl. 1), 130-137



11. Sowers, J. R., Zemel, M. B., Standley, P. R., and Zemel, P. C. (1989) *J Lab Clin Med* **114**, 338-348
12. Resnick, L. M. (1987) *Am J Med* **82 (suppl 1B)**, 16-25
13. Resnick, L. M., Laragh, J. H., Sealey, J. E., and Alderman, M. H. (1983) *N Engl J Med* **309**, 888-891
14. Erne, P. and Hermsmeyer, K. (1989) *Hypertension* **14**, 145-151
15. Feinleib, M., Lenfant, C., and Miller, S. A. (1984) *Science* **226**, 384-386
16. Sowers, J. R. (1989) *Clin Nutr* **8**, 158-163(Abstract)
17. Drueke, T. B., Chabanis, S., Roullet, C., Duchambon, P., LaCour, B., and McCarron, D. A. (1994) *Am J Med Sci* **307(supp 1)**, S96-S101
18. Orlov, S. N., Li, J. M., Tremblay, J., and Hamet, P. (1995) *Semin Nephrol* **15**, 569-592
19. Lais, L. T. and Brody, M. J. (1978) *Eur J Pharmacol* **47**, 177-189
20. Resnick, L. M. (1995) in *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis, and Management (2nd Ed.)* (Laragh, J. H. and Brenner, B. M., eds) pp. 1169-1191, Raven Press, New York
21. Hatton, D. C. and McCarron, D. A. (1994) *Hypertension* **23**, 513-530
22. Benishin, C., Labeledz, T., Guo, D. D., Lewanczuk, R. Z., and Pang, P. K. (1993) *Am J Hypertens* **6**, 134-140
23. Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) *Anal Biochem* **162**, 156-159

24. Hamet, P., Kong, D., Pravenec, M., Kunes, J., Kren, V., Klir, P., Sun, Y. L., and Tremblay, J. (1992) *Hypertension* **19**, 611-614
25. Manly, K. F. (1993) *Mammalian Genome* **4**, 303-313
26. Pravenec, M., Gauguier, D., Schott, J. J., Buard, I., Kren, V., Bila, V., Szpirer, C., Wang, J. M., Huang, H., St-Lezin, E., Spence, M. A., Flodman, P., Pritz, M., Lathrop, G. M., Vergnaud, G., and Kurtz, T. W. (1996) *Mammalian Genome* **7**, 117-127
27. Brown, E. M. and Hebert, S. C. (1996) *Am J Med Sci* **312**, 99-109
28. McHaffie, G. S. and Ralston, S. H. (1995) *Bone* **17**, 11-14
29. Reid, R. E., Garipey, J., Saund, A. K., and Hodges, R. S. (1981) *J Biol Chem* **256**, 2742-2751
30. Kohn, W. D., Mant, C. T., and Hodges, R. S. (1997) *J Biol Chem* **272**, 2583-2586
31. Shaw, G. S., Hodges, R. S., and Sykes, B. D. (1992) *Biochemistry* **31**, 9572-9580
32. Kay, L. E., Forman-Kay, J. D., McCubbin, W. D., and Kay, C. M. (1991) *Biochemistry* **30**, 4323-4333
33. Shaw, G. S., Hodges, R. S., Kay, C. M., and Sykes, B. D. (1994) *Protein Sci* **3**, 1010-1019
34. Linse, S., Thulin, E., and Sellers, P. (1993) *Protein Sci* **2**, 985-1000

**FIGURE LEGENDS****FIGURE 1.**

Northern analysis of total RNA from PTC incubated in low or normal calcium medium. Parathyroid cells from WKY (right panel) rats and SHR (left panel) were incubated for 48 hours in low (0.3 mM) or normal (2 mM) extracellular calcium-containing medium. Total RNAs extracted and separated as described in Materials and Methods were hybridized with <sup>32</sup>P-labelled HCaRG probe (upper panels). As controls, ribosomal 18S RNA was hybridized with a <sup>32</sup>P-labelled specific probe (lower panels).

**FIGURE 2.**

**Upper:** Reconstitution scheme of HCaRG cDNA. Overlapping fragments leading to the reconstitution of HCaRG rat 1100-bp cDNA are shown including the full length 672-bp open reading frame. cDNA fragments were initially obtained using 5'-RACE and 3'-RACE strategies as well as by screening a SHR parathyroid cDNA library. Black boxes represent overlapping sequences. The first cDNA fragment was obtained by 3'-RACE (3r 290). This initial fragment was used to screen the SHR parathyroid cDNA library. Fragments hcarg 2c-t3 + 2c-t7, hcarg 825, HCaRG 10-ic, and hcarg 10-174 were isolated from the cDNA library. Fragments 5r 285 and 5r 260 were obtained by 5'-RACE. This reconstitution was confirmed by sequencing a 860-bp PCR product with nested primers of 5r 260 and HCaRG 825. A 200-bp scale is shown.

**Lower:** Nucleotide and deduced amino acid sequences of HCaRG. The translation initiation start site and the termination codon are indicated in bold. The deduced amino acids are indicated in italics. A putative EF-hand motif sequence is underlined (see Fig.2)

**FIGURE 3.**

Sequence alignment of EF-hand motifs found in several calcium-binding proteins including calmodulin (CaM EF-hand motifs), 1 to 4 troponin C (2 EF-hand motifs), 1 to 2 actin-binding protein (ACTB, 1 EF hand motif) and the EF-hand-like motif in HCaRG. Amino acids found in more than one sequence are boxed.

**FIGURE 4.**

Regulation of HCaRG mRNA levels in parathyroid cells. Cells were incubated with extracellular calcium (2 and 0.3 mM, left and right panels respectively), PMA (10  $\mu$ M), a protein kinase C agonist (upper panel), and dexamethasone (1 $\mu$ M) (lower panel). Total RNA was extracted from PTC, reverse transcribed and PCR amplified with rHCaRG or ribosomal 18S RNA primers in the presence of labelled precursors. Bands were quantified and HCaRG expression was measured as a ratio to 18S rRNA..

**FIGURE 5.**

Detection of HCaRG expression in tissues of WKY rats and SHR by *in situ* hybridization. Tissue slices were hybridized according to the protocol described in Materials and Methods. The probe used was the initial 3'-RACE 300-bp fragment subcloned in pSP 72 vector to create sense and antisense riboprobes. The probes were labeled with digoxigenin-UTP and revealed by anti-DIG alkaline phosphatase. HCaRG probe hybridized to parathyroid glands of both WKY and SHR.

**FIGURE 6.**

- a) HCaRG mRNA was detected in the medulla and zona fasciculata of the adrenal gland with higher signal in the medulla. Sense controls showed a very low hybridization signal.
- b) HCaRG mRNA expression in WKY and SHR medulla of the adrenol.

**FIGURE 7.**

HCaRG expression in the kidney was concentrated in the tubular fraction with no signal in glomeruli (left). The liver showed very diffuse coloration with both antisense and sense probes (right).

**FIGURE 8.**

In vitro translation of HCaRG cDNA. The cDNA was cloned into SP72 vector and used for coupled transcription/translation in the presence of  $^{35}\text{S}$ -Methionine. Lane 1: molecular weight markers; lane 2: translation products of the control luciferase gene; lane 3: translation products without the vector; lane 4: translation products from HCaRG cDNA; lane 5: translation product of HCaRG cDNA. Proteins were separated by 15% PAGE in the presence of  $\beta$ -mercaptoethanol (lane 1 to 4) or in the absence of  $\beta$ -mercaptoethanol (line 5).

**FIGURE 9.**

Localization of HCaRG on rat chromosome 7. A HCaRG Bgl II polymorphism was used as marker on genomic DNA from SHR and BN.lx normotensive rat inbred strains with multiple well characterized SDPs. HCaRG cosegregated with D7Cebrp187s3/D7Cebr77s1 of rat chromosome 7 in 31 out of 33 strains. Two recombinations mapped the HCaRG between Cyp11b2 and Myc genes. cM represents distance in centimorgans on rat chromosome 7. On the right side, a possible linkage position of human homologous gene is depicted as based on conserved linkages on rat chromosome 7 and human chromosome 8.

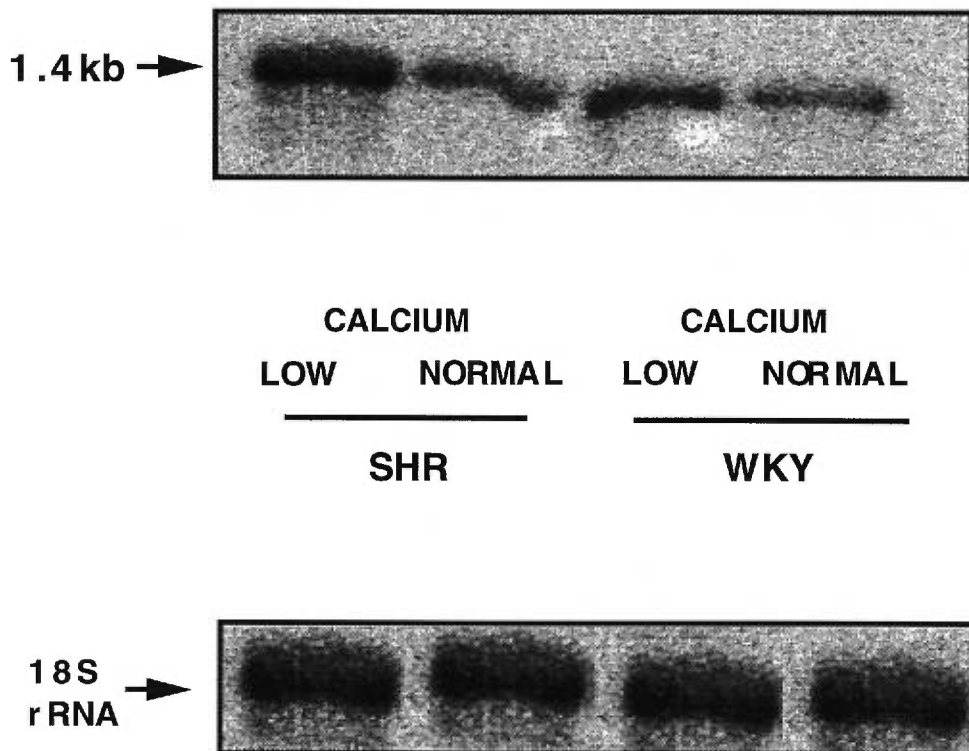
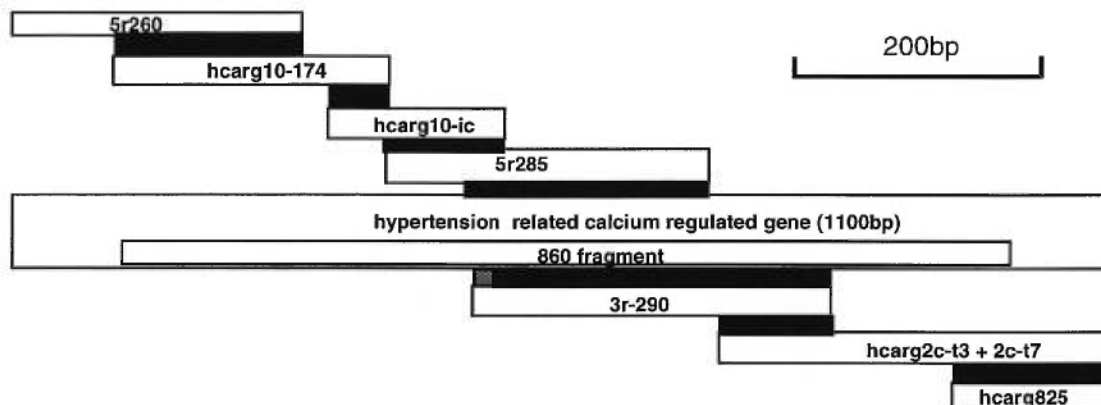


Figure 1



```

GC AGG AGC CAC AGC CAG CTA CGG CGG CTA GGT TCC 35
TTC AGG TGC AGA GGG CGG TAA AGG CTT GGT TTG TAT TTG TAA TGC AAC TGT GGT TAG GAC CTT CTC TTC GGA CTG 110
GTC AAG AAA CGG GAA GAA AGGATG TCT GCT TTG GGG GCT GCA GCT CCA TAC TTG CAC CAT CCC GCT GAC AGT CAC 185
Met Ser Ala Leu Gly Ala Ala Ala Pro Tyr Leu His His Pro Ala Asp Ser His
AGT GCC CGG GTC AGT TTC CTG GGT TCC CAG CCC TCT CCA GAA GTG ACG GCC GTG GCT CAG CTC TTG AAG GAC TTA 260
Ser Gly Arg Val Ser Phe Leu Gly Ser Gln Pro Ser Pro Glu Val Thr Ala Val Ala Gln Leu Leu Lys Asp Leu
GAC AGG AGC ACC TTC AGA AAG TTG TTG AAA CTT GTA GTC GGG GCC CTG CAT GGG AAA GAC TGC AGA GAA GCT GTG 335
Asp Arg Ser Thr Phe Arg Lys Leu Leu Lys Leu Val Val Gly Ala Leu His Gly Lys Asp Cys Arg Glu Ala Val
GAG CAA CTT GGT GCC AGC GCC AAC CTG TCA GAA GAG GGT CTG GCC GTC CTG CTG GCG GGC ACA CAC ACC CTG CTC 410
Glu Gln Leu Gly Ala Ser Ala Asn Leu Ser Glu Glu Arg Leu Ala Val Leu Leu Ala Gly Thr His Thr Leu Leu
CAG CAG GCT CTC CGG CTG CCC CCT GCT AGT CTA AAG CCA GAT GCC TTC CAG GAA CAG CTC CAG GAA CTT GGC AAT 485
Gln Gln Ala Leu Arg Leu Pro Ala Ser Leu Lys Pro Asp Ala Phe Gln Glu Glu Leu Gln Glu Leu Gly Ile
CCT CAG GAT CTA ATT GGA GAT TTG GCC AGT TTG CCA TTT GGG AGT CAA GCG CCT CTT CTC GAC TCT GTA GCC CAA 560
Pro Gln Asp Leu Ile Gly Asp Leu Ala Ser Leu Ala Phe Gly Ser Gln Arg Pro Leu Leu Asp Ser Val Ala Gln
CAG CAG GGA TCC TCG CTG CCT CAC GTG TCT TAC TTC GGG TGG GGG GTG GAC GTG GCC ATC TCA ACC AGC GCT CAG 635
Gln Gln Gly Ser Ser Leu Pro His Val Ser Tyr Phe Arg Trp Arg Val Asp Val Ala Ile Ser Thr Ser Ala Gln
TCC CGC TCC CTG CAA CGG AGT GTT CTC ATG CAG CTG AAG CTC ACA GAT GGA TCT GCA CAC GCG TTC GAG GTG CCC 710
Ser Arg Ser Leu Gln Pro Ser Val Leu Met Gln Leu Lys Leu Thr Asp Gly Ser Ala His Arg Phe Glu Val Pro
ATA GCC AAA TTT CAG GAG CTG CGG TAC AGT GTA GCC TTG GTC CTT AAG CAG ATG CCA GAA CTG GAG AAG AAG TGT 785
Ile Ala Lys Phe Gln Glu Leu Arg Tyr Ser Val Ala Leu Val Leu Lys Glu Met Ala Glu Leu Glu Lys Lys Cys
GAG CGC AAA CTG CAG GAC TGA CTG AAC CCT GGT ACT GTG GGT GCT GAA GCT GGT ACC ACA CAG CCC CCC ACT 860
Glu Arg Lys Leu Gln Asp
GGT GAT GAG CCC AAC TCC ATT GAG GTC CTG CAT GTG AGA ACG TAT TTT AAG TGA AAA GAC AGC GGG ACT TTC AGG 935
TTT TGT TTT ATG AGT CAA CAG CTG GGC AGG GTG GCA CAG TTT ATA ATC TCA GCC CTT GGA AGT CTG AGG CTG GAG 1010
AAT GGG AAG TGT AAG CTG GGC CTG GCT TTC ATA GTG AGG CTC AGT GTC GAA TTA AAG AGG TAA AGC AAC TAT TAA 1085
AAA AAA AAA AAA AAA 1100

```

Figure 2

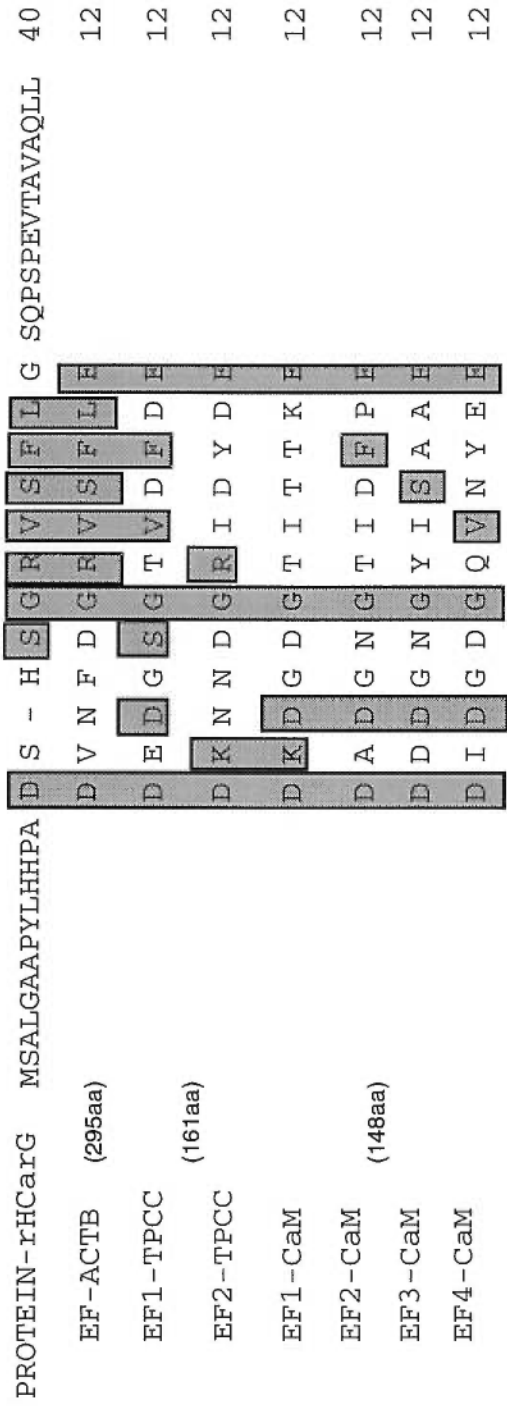
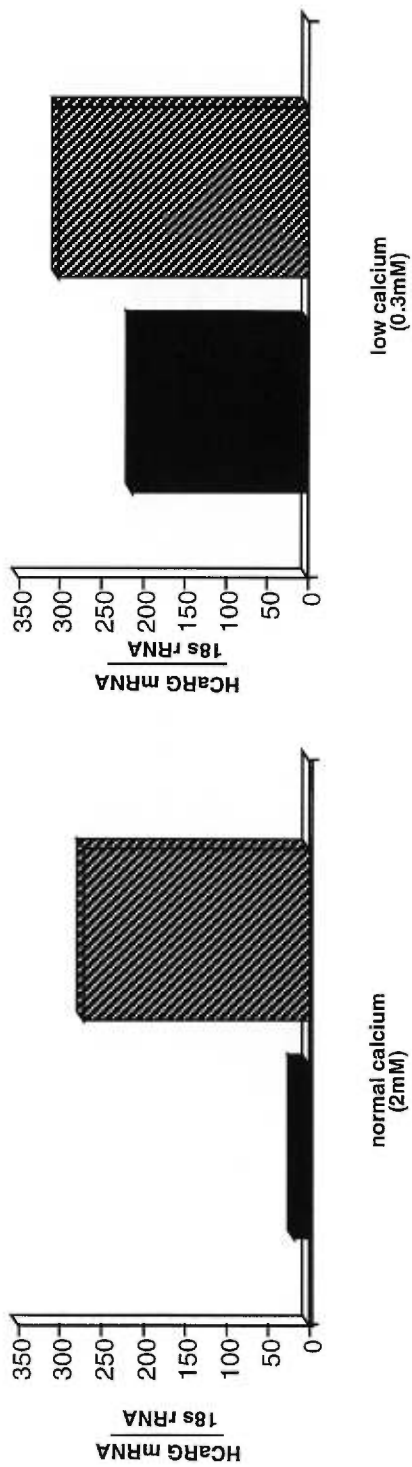


Figure 3



### A. PMA



### B. DEXAMETHASONE

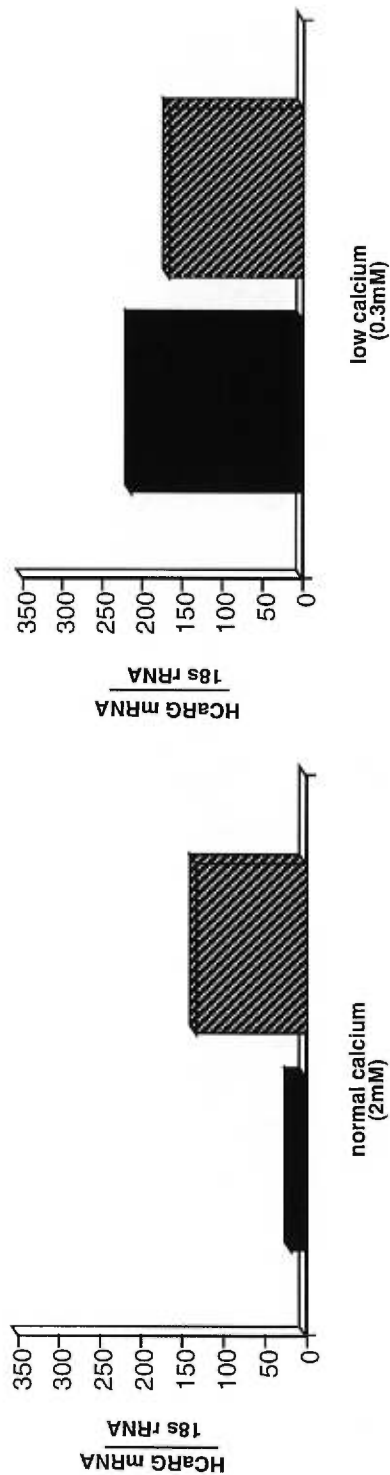


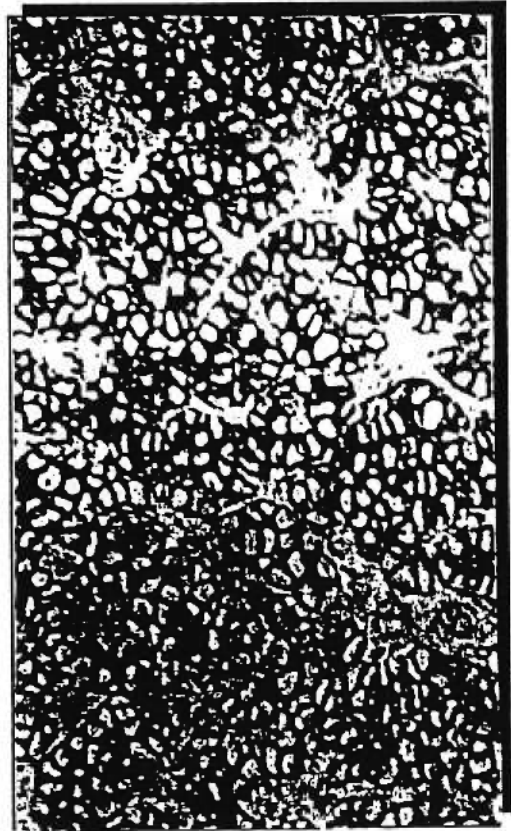
Figure 4



SHR PARATHYROID ANTISENSE



SHR PARATHYROID SENSE

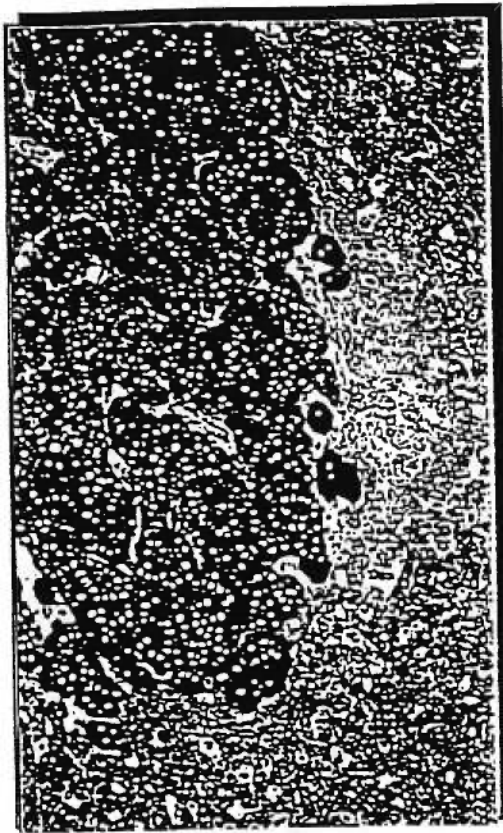


WKY PARATHYROID ANTISENSE



WKY PARATHYROID SENSE

Figure 5



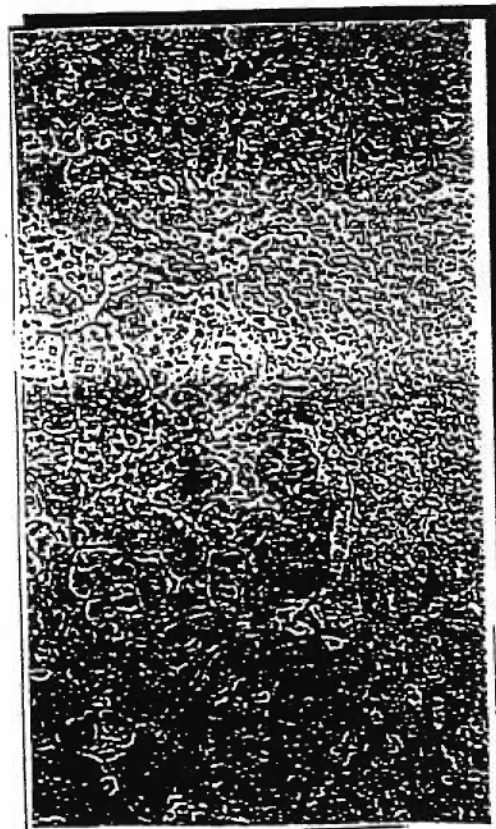
SHR ADRENAL ANTISENSE



SHR ADRENAL SENSE



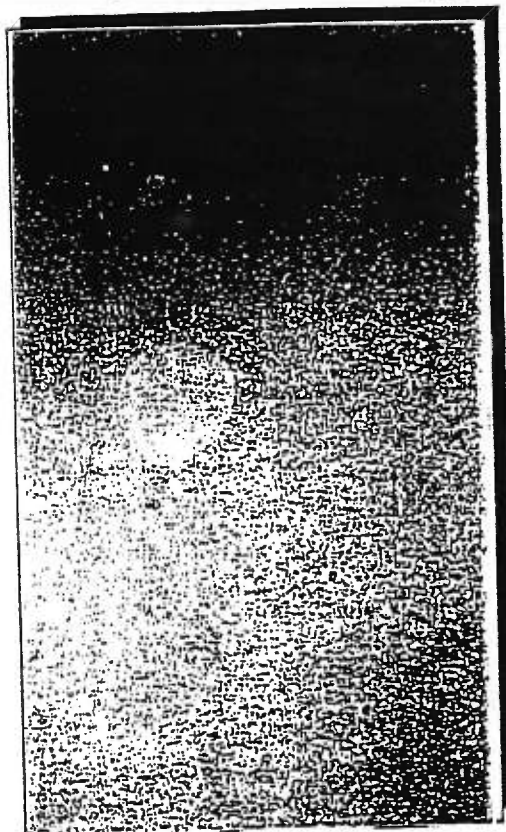
WKY ADRENAL ANTISENSE



WKY ADRENAL SENSE



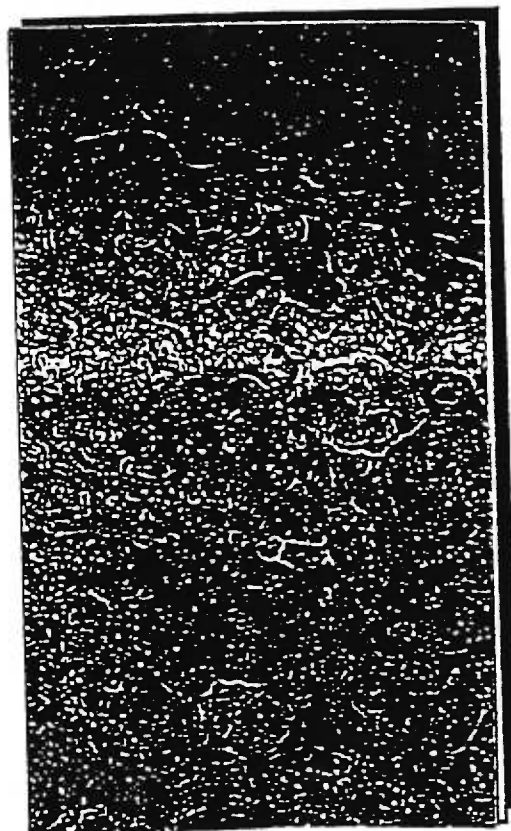
SHR LIVER ANTISENSE



SHR LIVER SENSE



SHR KIDNEY ANTISENSE



SHR KIDNEY SENSE

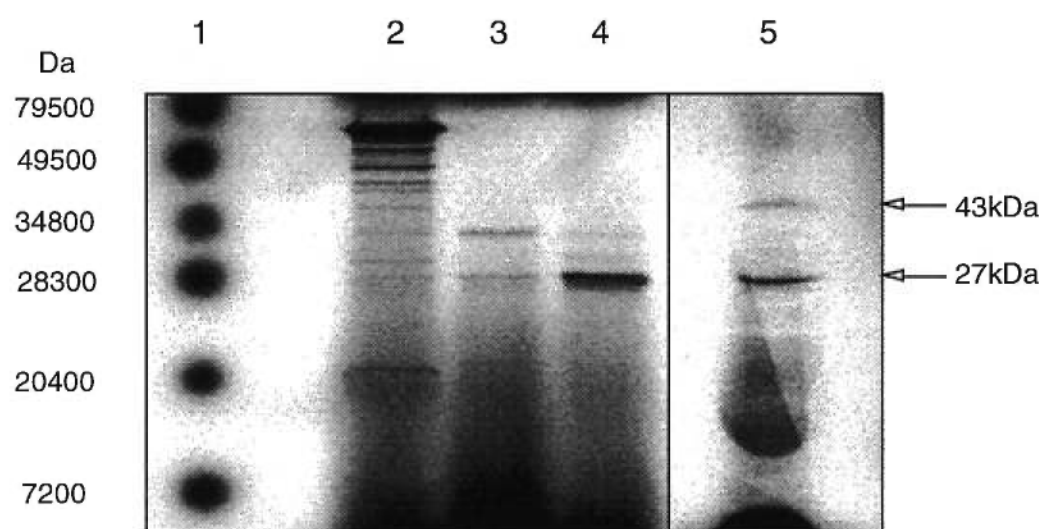


Figure 8

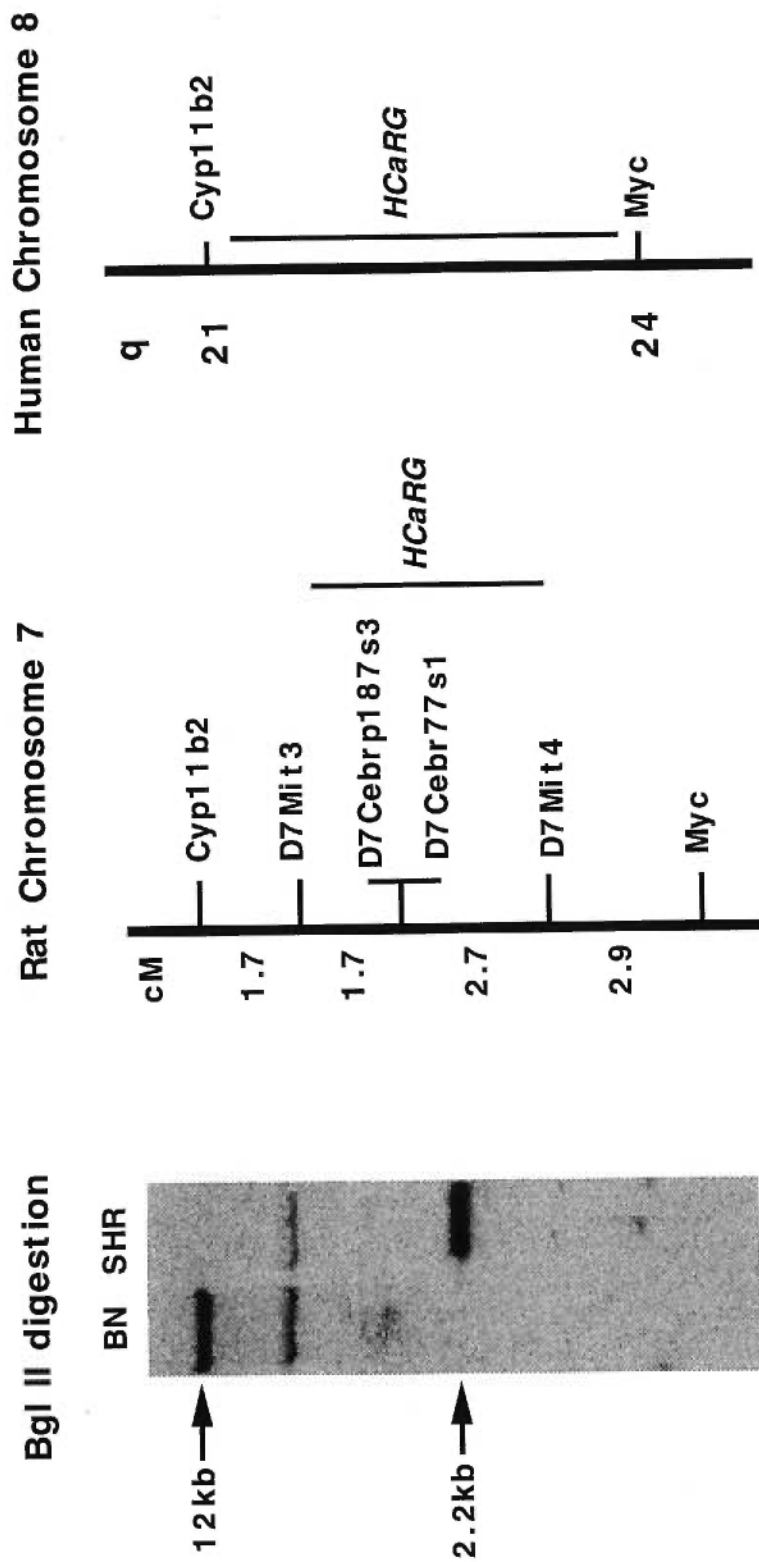


Figure 9