

2m11.2917.7

Université de Montréal

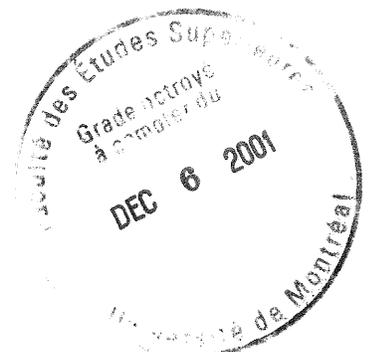
**Effet de l'angiotensine II sur le transport de calcium  
par la membrane luminale de tubules proximaux et distaux**

par Alain Charbonneau  
Département de Physiologie  
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 physiologie

Août 2001

© Alain Charbonneau, 2001



W  
4  
158  
2001  
N. 125

Université de Montréal  
Faculté de études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Effet de l'angiotensine II sur le transport de calcium  
par la membrane luminale de tubules proximaux et distaux

présenté par:

Alain Charbonneau

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

|                          |                            |
|--------------------------|----------------------------|
| Président rapporteur:    | Dr Daniel Lajeunesse       |
| Directrice de recherche: | Dr Michèle Gagnan-Brunette |
| Membre du jury:          | Dr John S.D. Chan          |

Mémoire accepté le .....

## RÉSUMÉ

La présence de récepteurs de l'angiotensine II (ANGII) tout le long du néphron et d'un système local de production de cette hormone suggèrent qu'elle aurait un ou plusieurs effets tubulaires directs. L'étude actuelle propose de déterminer l'effet de l'ANGII sur le transport de  $\text{Ca}^{2+}$  par des membranes lumineales de néphrons de lapin.

Des suspensions de tubules proximaux (PT) et distaux (DT) de lapins sont purifiées et traitées avec l'hormone. Les vésicules de membranes lumineales sont ensuite obtenues de ces tubules et servent à mesurer le transport de calcium. Les résultats nous montrent que l'ANGII stimule le transport de  $\text{Ca}^{2+}$  par les membranes lumineales provenant des deux sites. En variant la dose, on obtient une courbe dose-réponse biphasique avec un maximum d'effet à  $10^{-12}\text{M}$  d'hormone. L'ANGII augmente le  $V_{\text{max}}$  dans le PT et le  $V_{\text{max}}$  de la composante à haute affinité dans le DT, sans toucher les autres paramètres cinétiques. Lorsque du losartan est ajouté dans le milieu d'incubation tubulaire, l'effet de l'ANGII est aboli, suggérant que l'hormone agit en se fixant sur les récepteurs  $\text{AT}_1$ . De plus, l'inhibition de la voie de la PKC empêche aussi l'effet de l'hormone dans le PT mais pas dans le DT. Finalement, la PTH, comme l'ANGII, stimule le transport de calcium, mais les effets des deux hormones ne sont pas additifs, suggérant que ces hormones agiraient sur le même canal calcique dans le même segment du DT.

Mots clés : rein, calcium, transport de calcium, angiotensine II, tube proximal, tube distal

## RÉSUMÉ EN ANGLAIS

Angiotensin II (ANGII) receptors have been shown to be present along the nephron and the kidney is also known as a site of local production of this hormone. This suggests a direct effect of ANGII on tubular reabsorption. The aim of the present study was to examine the effect of ANGII on  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by luminal membranes of the proximal and distal tubules (PT and DT) of the rabbit.

Incubation of the isolated PT and DT with ANGII increased the  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by the luminal membranes subsequently purified. Dose-response experiments revealed a biphasic action with a maximal effect at  $10^{-12}\text{M}$ . ANGII action increased the  $V_{\text{max}}$  in the PT and the  $V_{\text{max}}$  of the high-affinity  $\text{Ca}^{2+}$  channel in DT, leaving  $K_{\text{m}}$  unchanged. The effect of ANGII was abolished by losartan, suggesting that the hormone is acting through  $\text{AT}_1$  receptors. In the PT, inhibition of PKC completely abolished the action of ANGII on  $\text{Ca}^{2+}$  uptake. In the DT, however, inhibition of cAMP, PKC, or phospholipase A did not modify the response of ANGII. Finally, PTH, like ANGII, enhances  $\text{Ca}^{2+}$  transport, however, the effects of the two hormones were not additive, suggesting that they act on the same  $\text{Ca}^{2+}$  channel.

Keywords: kidney, calcium, calcium transport, angiotensin II, proximal tubule, distal tubule.

## TABLE DES MATIÈRES

|   |      |
|---|------|
| PAGE TITRE .....  | i    |
| IDENTIFICATION DU JURY .....                                      | ii   |
| RÉSUMÉ.....   | iii  |
| RÉSUMÉ EN ANGLAIS.....  | iv   |
| TABLE DES MATIÈRES.....   | v    |
| LISTE DES FIGURES.....  | viii |
| LISTE DES TABLEAUX.....   | ix   |
| LISTE DES ABRÉVIATIONS .....                                      | x    |
| REMERCIEMENTS .....   | xi   |
| <br>  |      |
| I. INTRODUCTION.....  | 1    |
| I.1 L'ANGIOTENSINE II.....  | 1    |
| I.1.1 Historique.....   | 1    |
| I.1.2 Système rénine-angiotensine-aldostérone .....               | 2    |
| I.1.2.1 Rénine.....   | 2    |
| I.1.2.1.1 Contrôle de la sécrétion de rénine.....                 | 2    |
| I.1.2.2 Angiotensinogène.....                                     | 3    |
| I.1.2.3 Enzyme de conversion de l'angiotensine I.....             | 4    |
| I.1.2.4 Système rénine-angiotensine local .....                   | 5    |
| I.1.3 Rôles de l'angiotensine II.....                             | 6    |
| I.1.3.1 Effets sur le transport tubulaire d'électrolytes .....    | 7    |
| I.1.4 Mécanisme d'action de l'angiotensine II .....               | 9    |
| I.1.4.1 Récepteurs .....  | 9    |
| I.1.4.1.1 Localisation des récepteurs dans le rein.....           | 11   |
| I.1.4.2 Messagers intracellulaires .....                          | 12   |
| I.2 LE TRANSPORT DU CALCIUM PAR LE REIN.....                      | 15   |
| I.2.1 Le transport selon les différents segments du néphron ..... | 15   |
| I.2.2 Les transporteurs calciques .....                           | 17   |
| I.2.2.1 Passage à travers la membrane apicale .....               | 17   |
| I.2.2.2 Passage à travers la membrane basolatérale.....           | 18   |
| I.2.3 La régulation hormonale .....                               | 20   |
| I.2.3.1 Tube proximal .....                                       | 10   |
| I.2.3.2 Tube distal.....  | 20   |
| I.3 LE BUT DU PROJET .....  | 22   |
| <br>  |      |
| II. MATÉRIEL ET MÉTHODE.....                                      | 23   |
| II.1 Matériel .....   | 23   |
| II.2 Isolation des suspensions tubulaires.....                    | 23   |

|   |        |
|---|--------|
| II.3 Incubation des tubules.....  | 24     |
| II.4 Préparation des membranes lumineales.....  | 24     |
| II.5 Mesure de l'activité des marqueurs enzymatiques.....   | 25     |
| II.6 Dosage des protéines.....  | 25     |
| II.7 Mesures du transport de $Ca^{2+}$ par les vésicules membranaires.....  | 25     |
| II.8 Analyse statistique.....   | 26     |
| <br>III. RÉSULTATS.....   | <br>27 |
| III.1 Pureté des suspensions tubulaires et des préparations membranaires.....   | 27     |
| III.2 Effet de l'ANGII sur le $TCa^{2+}$ par les membranes lumineales de PT.....  | 29     |
| III.3 Courbe dose-réponse de l'effet l'ANGII sur le $TCa^{2+}$ par les membranes lumineales de PT.....  | 29     |
| III.4 Effet de l'ANGII sur le $TCa^{2+}$ par les membranes lumineales de DT en présence et en absence de $Na^+$ .....                               | 29     |
| III.5 Courbe dose-réponse de l'effet de l'ANGII sur le $TCa^{2+}$ par les membranes lumineales de DT.....   | 32     |
| III.6 Effet du temps d'incubation avec l'ANGII sur le $TCa^{2+}$ par les membranes lumineales de PT et DT.....                                      | 32     |
| III.7 Effet de l'ANGII sur les paramètres cinétiques du $TCa^{2+}$ par les membranes lumineales de PT et DT.....                                    | 32     |
| III.8 Effet direct de l'ANGII sur le $TCa^{2+}$ par les membranes lumineales de PT et DT.....   | 38     |
| III.9 Effet de l'ANGII sur le $TCa^{2+}$ par les membranes lumineales de PT et DT en présence d'inhibiteurs spécifiques aux récepteurs d'ANGII..... | 42     |
| III.10 Effet de l'ANGII sur le $TCa^{2+}$ par les membranes lumineales de PT et DT en présence d'inhibiteurs des messagers intracellulaires.....    | 42     |
| III.11 Effet de l'ANGII et de la PTH sur le $TCa^{2+}$ par les membranes lumineales de DT.....  | 47     |
| <br>IV. DISCUSSION.....   | <br>51 |
| IV.1 La pureté des préparations membranaires.....   | 51     |
| IV.2 Le transport de calcium par les membranes lumineales.....  | 51     |
| IV.3 Effet tubulaire de l'angiotensine II sur le transport de calcium.....  | 52     |
| IV.4 Effet de l'angiotensine II sur la composante de forte affinité dans le DT.....   | 53     |
| IV.5 Mécanisme par lequel l'angiotensine II stimule le transport de calcium.....  | 54     |
| <br>V. CONCLUSION.....  | <br>58 |
| <br>VI. RÉFÉRENCES.....   | <br>59 |

## LISTE DES FIGURES

|  |    |
|--|----|
| <b>Figure 1.</b> Système rénine-angiotensine. Facteurs libérant la rénine et effets de l'ANGII.....  | 7  |
| <b>Figure 2.</b> Effet de l'ANGII sur le $\text{TCa}^{2+}$ par les membranes lumineales de PT en fonction du temps.....  | 30 |
| <b>Figure 3.</b> Courbe dose-réponse de l'effet de l'ANGII sur le $\text{TCa}^{2+}$ par les membranes lumineales de PT.....  | 31 |
| <b>Figure 4.</b> Effet de l'ANGII sur le $\text{TCa}^{2+}$ par les membranes lumineales de DT en absence de NaCl, en fonction du temps .....   | 33 |
| <b>Figure 5.</b> Effet de l'ANGII sur le $\text{TCa}^{2+}$ par les membranes lumineales de DT, en présence de NaCl, en fonction du temps .....   | 34 |
| <b>Figure 6.</b> Courbe dose-réponse de l'effet de l'ANGII sur le $\text{TCa}^{2+}$ par les membranes lumineales de DT .....   | 35 |
| <b>Figure 7.</b> Effet de différents temps d'incubation tubulaire de l'ANGII sur le $\text{TCa}^{2+}$ par les membranes lumineales de PT.....  | 36 |
| <b>Figure 8.</b> Effet de différents temps d'incubation tubulaire de l'ANGII sur le $\text{TCa}^{2+}$ par les membranes lumineales de DT.....  | 37 |
| <b>Figure 9.</b> Effet de l'ANGII sur la courbe d'Eadie-Hofstee du $\text{TCa}^{2+}$ par les membranes lumineales de PT.....   | 49 |
| <b>Figure 10.</b> Effet de l'ANGII sur la courbe d'Eadie-Hofstee du $\text{TCa}^{2+}$ par les membranes lumineales de DT.....  | 40 |
| <b>Figure 11.</b> Effet direct de l'ANGII extravésiculaire sur le $\text{TCa}^{2+}$ par les membranes lumineales de PT en fonction du temps .....  | 43 |
| <b>Figure 12.</b> Effet direct de l'ANGII extravésiculaire sur le $\text{TCa}^{2+}$ par les membranes lumineales de DT en fonction du temps .....  | 44 |
| <b>Figure 13.</b> Effet de l'ANGII sur le $\text{TCa}^{2+}$ par les membranes lumineales de PT en absence et en présence de bloqueurs de récepteurs $\text{AT}_1$ et $\text{AT}_2$ ..... | 45 |
| <b>Figure 14.</b> Effet de l'ANGII sur le $\text{TCa}^{2+}$ par les membranes lumineales de DT en absence et en présence de bloqueurs de récepteurs $\text{AT}_1$ et $\text{AT}_2$ ..... | 46 |
| <b>Figure 15.</b> Effet des bloqueurs de messagers Rp-AMPC, calphostin C et econazole en combinaison avec l'ANGII sur le $\text{TCa}^{2+}$ par les membranes lumineales de PT .....      | 48 |
| <b>Figure 16.</b> Effet des bloqueurs de messagers Rp-AMPC, calphostin C et econazole en combinaison avec l'ANGII sur le $\text{TCa}^{2+}$ par les membranes lumineales de DT .....      | 49 |

**Figure 17.** Effet de l'ANGII, de la PTH et de la combinaison des deux hormones sur le  $\text{TCa}^{2+}$  par les membranes lumineales de DT .....50

## LISTE DES TABLEAUX

|  |    |
|--|----|
| <b>Tableau I.</b> Activités enzymatiques des différentes préparations membranaires .....   | 28 |
| <b>Tableau II.</b> Effet de l'ANGII sur les paramètres cinétiques du $\text{TCa}^{2+}$ par la membrane lumineales des tubules proximaux et distaux ..... | 41 |

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

|                   |  |
|-------------------|--|
| ADH               | Hormone antidiurétique   |
| AMPc              | Adénosine 3':5'-cyclique monophosphate                                 |
| ANGI              | Angiotensine I   |
| ANGII             | Angiotensine II  |
| ANGIII            | Angiotensine III   |
| ARNm              | Acide ribonucléique messenger  |
| ATPase            | Adénosine triphosphatase   |
| BLM               | Membrane basolatérale  |
| BSA               | Albumine sérique de bœuf   |
| db AMPc           | N <sup>6</sup> , 2'-0-dibutyryladénosine 3',5' cyclic monophosphate    |
| ECA               | Enzyme de conversion de l'angiotensine I                               |
| K <sub>m</sub>    | Constante de Michaelis-Menten  |
| LUM               | Membrane luminale  |
| MAPK              | Mitogen activated protein kinase                                       |
| NO                | Oxyde nitrique   |
| PCR               | Réaction de polymérisation en chaîne                                   |
| PCT               | Tubule contourné proximal  |
| PKA               | Protéine kinase A  |
| PKC               | Protéine kinase C  |
| PLA <sub>2</sub>  | Phospholipase A <sub>2</sub>   |
| PLD               | Phospholipase D  |
| PT                | Tubule proximal  |
| RpAMPc            | Rp-Adénosine 3',5'-cyclique monophosphate                              |
| RT-PCR            | Réverse transcriptase suivi d'une réaction de polymérisation en chaîne |
| TCa <sup>2+</sup> | Transport de Ca <sup>2+</sup>  |
| TFG               | Taux de filtration glomérulaire  |
| TRIS              | 2-amino-2(hydroxyméthyl)-1,3-propanediol                               |
| V <sub>max</sub>  | Constante de vitesse maximale représentant l'activité maximale         |

## REMERCIEMENTS

C'est avec émotion que je remercie tous ceux qui m'ont encouragé, inspiré et motivé à un moment ou à un autre durant les deux dernières années, car malheureusement, il y a parfois des circonstances qui nous éloignent temporairement de ceux qu'on aime ou qui nous empêchent de les voir aussi souvent qu'on le voudrait. Mon frère Dany, Marie-Christine, Marie, Dominic, Mick Star, Mai, Stéphanie, Marc-André, Julie, Michaël, Mélanie et bien sûr Johanne, *Merci!*

Merci surtout à mes parents qui sont depuis toujours et encore, un modèle d'équilibre dans tout, une source d'encouragement inestimable, c'est grâce à eux que je peux aujourd'hui me vanter d'avoir franchi une autre étape de ma vie, *un merci infini!*

Merci à Marie, je ne le répéterai jamais assez. Ce fut vraiment un honneur pour moi de côtoyer et d'apprendre d'une personne attachante, intéressante, drôle, franche et par dessus tout d'une bonté rare et authentique. J'aimerais un jour lui ressembler. Je conserve des souvenirs inoubliables de cette relation particulière qui nous unit maintenant, *Merci!!*

Toute cette aventure ne se serait pas réalisée sans Dr Michèle Gagnan-Brunette avec qui j'ai beaucoup appris tant au point de vue scientifique que humain. Son dévouement, son acharnement, son intelligence, son sens de l'humour, sa gentillesse font d'elle la meilleure directrice qu'un étudiant peut espérer, *MERCI*

## **I. INTRODUCTION**

### **I.1 L'angiotensine II**

#### **I.1.1 Historique**

En 1898, Tigerstedt et Bergman obtenaient des extraits aqueux d'une substance provenant du cortex de reins de lapin ayant des effets hypertenseurs lorsqu'ils étaient injectés à d'autres lapins. Ils donnèrent le nom de «rénine» à cette substance. Beaucoup plus tard, en 1934, Goldblatt et son équipe ont montré qu'il était possible de provoquer une hypertension artérielle systémique en provoquant une ischémie rénale, et que cette hypertension se développait via un facteur humoral sécrété par le rein. Quelques années plus tard, cette substance fut reconnue comme étant la rénine déjà décrite et il fut montré que celle-ci était sécrétée par l'appareil juxtaglomérulaire (Pickering et al. 1938). D'autres études ont finalement établi que la rénine était une enzyme qui agissait sur l'angiotensinogène, un substrat de haut poids moléculaire produit en grande quantité par le foie, pour former une substance qui augmente la tension artérielle. (Braun-Menendez et al. 1939). Celle-ci fut alors nommé angiotonine, hypertensine puis, angiotensine. En fait, la rénine clive l'angiotensinogène pour former le décapeptide angiotensine I (ANGI). Ensuite, l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA), qui se situe principalement à la surface des cellules endothéliales des capillaires sanguins (Caldwell et al. 1976), clive les deux derniers acides aminés de l'ANGI pour former l'angiotensine II (ANGII), un produit physiologiquement actif (Ng et al. 1967). Des angiotensinases cliveront finalement l'ANGII en ANGIII puis en peptides inactifs. En 1958, Gross proposa une hypothèse, vérifiée plus tard par Genest et al. (1960) selon laquelle la rénine, via l'ANGII, régulerait la sécrétion d'aldostérone par les glandes surrénales en fonction de la charge en sel. Ainsi, la boucle de régulation du système rénine-angiotensine-aldostérone était complète.

## **I.1.2 Système rénine-angiotensine**

### **I.1.2.1 Rénine**

La rénine est une aspartyle protéase très spécifique qui clive l'angiotensinogène pour former l'ANGI. La séquence nucléotidique du gène de la rénine est bien connue (Hobart et al. 1984), ainsi que ses régions promotrices et régulatrices (Dzau et al. 1988). Le système rénine-angiotensine-aldostérone systémique dépend de l'expression de la rénine par les cellules de l'appareil juxtaglomérulaire dans le rein, tel que confirmé par des études d'immunocytochimie utilisant un anticorps contre la rénine (Taugner et al. 1982). Les facteurs influençant la libération de rénine sont résumés à la section suivante.

#### **I.1.2.1.1 Contrôle de la sécrétion de rénine**

Malgré l'existence de systèmes locaux de production d'ANGII dans certains tissus, la concentration de rénine active dans le plasma est déterminée par le taux de sécrétion de rénine par le rein et c'est cette rénine plasmatique qui est responsable de la production d'ANGII circulante. Aussi, comme le rôle du système rénine-angiotensine-aldostérone est complexe, il est normal que la sécrétion de rénine par les cellules de l'appareil juxtaglomérulaire se fasse sous de nombreux contrôles physiologiques. Une première série d'expériences ont d'abord montré que la sécrétion était stimulée par une sténose artérielle rénale tel que démontré par la réduction de la pression de perfusion par clampage partiel de l'artère rénale (Goldblatt et al. 1934, Tobian 1960). Ces résultats suggérèrent la présence de barorécepteurs sensibles à la chute de perfusion rénale. Plus tard, ces résultats ont été confirmés chez des chiens dénervés et en absence de filtration rénale, le phénomène des barorécepteurs était donc indépendant de l'apport de la macula densa et de l'influx nerveux (Blaine et al. 1971). D'autres études portant sur des reins entiers montraient que la faible concentration de NaCl au niveau de la macula densa pouvait également être reliée à la production et la sécrétion de rénine (Vander et al. 1964). Cette hypothèse fût ensuite vérifiée par microperfusion (Leyssac 1986). Les résultats

obtenus à partir de ces préparations ont montré qu'une faible concentration en sel au niveau de la macula densa stimulait la sécrétion de rénine et vice-versa. C'est le transport du NaCl par l'isoforme BSC1 du cotransporteur Na-K-2Cl qui est responsable de la sécrétion de rénine (Kaplan et al. 1996), mais le mécanisme par lequel le taux de transport de NaCl par la membrane apicale des cellules de la macula densa est transmis aux cellules de l'appareil juxtaglomérulaire est inconnu. Cependant, l'implication des prostaglandines est probable car un inhibiteur non spécifique de la cyclooxygénase (indométhacine) bloque la stimulation de la sécrétion de rénine par la macula densa (Greenberg et al. 1993, Traynor et al. 1999). Des travaux plus récents ont conclu que l'isoforme 2 de la cyclooxygénase (COX-2) était présent au niveau de la macula densa et était responsable de la sécrétion de rénine. Des inhibiteurs sélectifs à la COX-2 entraînent une baisse significative du niveau plasmatique de rénine, de l'activité rénale de la rénine et de l'expression de mRNA de rénine (Harris, 2001 [revue]). De la même façon, la production d'oxyde nitrique (NO) est critique car la présence d'inhibiteur de la NOS dans la lumière tubulaire empêche aussi la sécrétion de rénine (He et al. 1995, Beierwaltes et al. 1997). Finalement, les vaisseaux sanguins rénaux et le néphron, incluant l'appareil juxtaglomérulaire, sont innervés par des nerfs sympathiques libérant de la noradrénaline. Cette innervation est responsable de plusieurs effets comme la vasoconstriction, une réduction du taux de filtration glomérulaire (TFG), une stimulation du transport au niveau proximal et une augmentation de la sécrétion de rénine (DiBona et al. 1997). D'autres facteurs locaux comme l'ANGII et l'adénosine exercent une rétroaction négative sur la libération de rénine, mais cette influence semble minime (Kurtz et al. 1999, Schnermann 1998). Les trois facteurs majeurs de la relâche de rénine sont représentés dans la partie supérieure de la **figure 1** (p.7).

### **I.1.2.2 Angiotensinogène**

L'angiotensinogène est le seul précurseur d'angiotensine I et limite la réaction enzymatique par sa disponibilité. C'est un glycopeptide de 14 acides aminés et c'est la sécrétion par le foie qui constitue la source principale d'angiotensinogène du

système rénine-angiotensine systémique. Cette sécrétion est relativement constante malgré que certaines substances aient la capacité d'augmenter de plusieurs fois la production d'ARNm et les niveaux plasmatiques d'angiotensinogène (Okhubo 1986). En effet, le gène de l'angiotensinogène possède plusieurs sites de régulation qui répondent entre autres aux glucocorticoïdes, aux œstrogènes et aux cytokines.

De plus, l'ANGII est à l'origine d'une rétroaction positive, les niveaux d'ARNm d'angiotensinogène dans le foie augmentant de 2 à 5 fois suite à une infusion d'ANGII (Nakamura et al. 1990). Finalement, une déplétion en  $\text{Na}^+$  augmente aussi les niveaux d'ARNm d'angiotensinogène alors que la quantité d'ARNm diminue suite à un réplétion en  $\text{Na}^+$  (Iwao et al. 1980).

### **I.1.2.3 Enzyme de conversion de l'angiotensine I**

L'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) est une dipeptidyle carboxypeptidase peu spécifique jouant un rôle dans le système rénine-angiotensine et le système de kallikréine et kinines en clivant les deux derniers acides aminés de l'ANGI pour former l'ANGII et en inactivant la bradykinine (Ehler et al. 1989). L'ECA est lié aux membranes des cellules endothéliales par une protéine d'ancrage et le site actif est extracellulaire. Les cellules endothéliales hépatiques, rénales et vasculaires expriment toutes l'ECA mais, ce sont les cellules endothéliales pulmonaires qui produisent plus de 40% de l'angiotensine II circulante (Campbell 1987). Bien que l'activité de l'ECA soit nécessaire à l'activation du système rénine-angiotensine systémique, l'ECA n'est pas une étape limitante dans la formation d'ANGII. Cependant, des études ont montré que l'activité de l'ECA par les cellules endothéliales était augmentée par les corticostéroïdes (Freidland et al. 1977). L'hormone thyroïdienne semble aussi réguler l'ECA, comme montré par une augmentation de son activité chez les patients avec hyperthyroïdisme et une diminution chez les hypothyroïdiens (Smallridge et al. 1983). Cependant, cette régulation ne semble pas influencer les taux d'ANGII circulants. Il est probable que la régulation de l'ECA soit une étape importante dans la production locale d'ANGII

dans certains tissus (Lazarus et al. 1994). L'importance de l'activité kininasique de l'ECA n'est pas très bien déterminée. Le blocage pharmacologique de l'ECA dans le traitement de l'hypertension artérielle aurait des effets bénéfiques grâce à sa double action sur la voie des angiotensines et sur la voie des kinines. Cependant, le blocage de cette dernière conduit à l'augmentation de la concentration des kinines qui est à l'origine de certains effets secondaires des inhibiteurs de l'enzyme de conversion tels que la toux (Linz et al. 1992).

#### **I.1.2.4 Système rénine-angiotensine local**

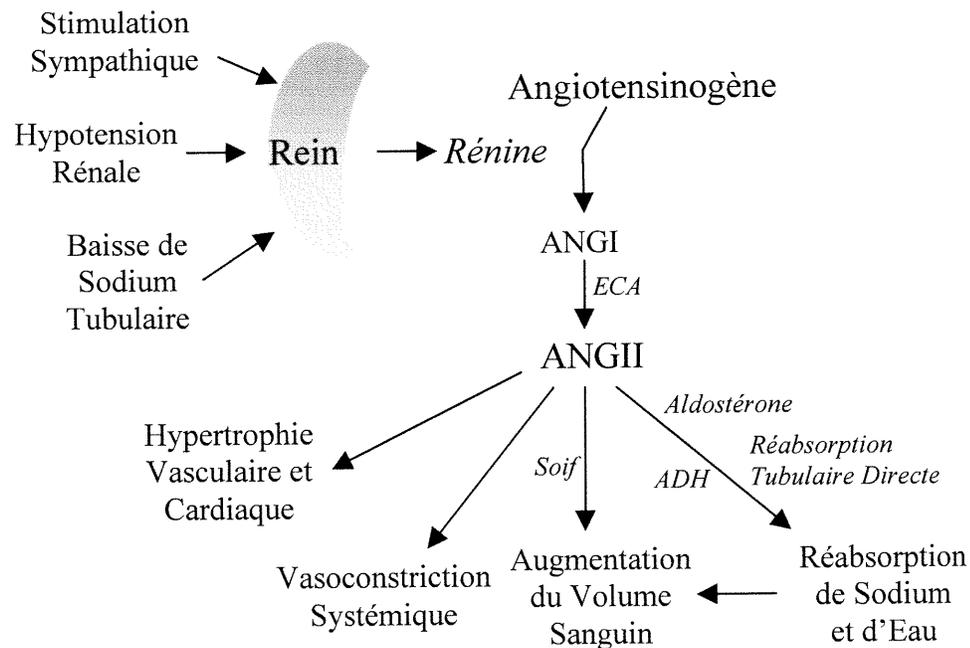
Parallèlement au système rénine-angiotensine décrit plus haut, un système tissulaire, dépendant ou partiellement indépendant du système circulant a été proposé (Campbell 1987). L'ANGII tissulaire ainsi formée serait vraisemblablement impliquée dans des activités paracrines et autocrines. Par exemple, dans le cœur, l'angiotensinogène, la rénine et l'ARNm de l'ECA ont été détectés (Dzau et al. 1987, Sawa et al. 1992, Sun et al. 1994). Dans le rein, l'ANGII passe la barrière de la filtration glomérulaire librement et se retrouve dans la lumière tubulaire. Mais, avec la présence d'angiotensinogène (Dzau et al. 1987), d'ECA (Erdo 1977) et de rénine (Rajaraman et al. 1988) au niveau du glomérule et du tube proximal (PT), l'ANGII circulante n'est sûrement pas la seule source d'ANGII disponible dans la lumière tubulaire.

Reams et al. (1994) ont démontré que l'ANGII urinaire ne provenait pas de l'ANGII plasmatique car, l'ANGII tritié injectée par voie intraveineuse n'était pas décelable dans l'urine. Finalement, des études de microponction *in vivo* chez le rat ont montré des concentrations de l'ordre de 1000 fois supérieures dans la lumière proximale (autour de 10 pmol/ml) que dans la circulation (Braam et al. 1993). La concentration d'ANGII dans le fluide distal est actuellement inconnue. En effet, le faible flot à ce niveau rend impossible la collection d'un volume suffisant pour la mesure de la concentration d'ANGII. Cependant, la concentration d'ANGII dans l'urine peut servir d'indice de la concentration présente dans le liquide tubulaire distal même si,

les résultats divergent considérablement d'une étude à l'autre (Reams et al. 1994, Vos et al. 1994). Une étude récente indique que la concentration d'ANGII dans l'urine de rats est d'environ 0.8 pmol/ml (Navar et al. 1997).

### **I.1.3 Rôles de l'angiotensine II**

Le système rénine-angiotensine joue un rôle important dans le maintien de la pression sanguine et de l'homéostasie du fluide extracellulaire par ses effets sur la résistance vasculaire et la réabsorption rénale de sodium. En effet, la vasoconstriction et la facilitation de la transmission sympathique entraîne une augmentation directe de la résistance vasculaire totale. De plus, l'ANGII diminue l'excrétion de sodium par quatre mécanismes principaux. D'abord, il y a moins de sodium filtré parce que la vasoconstriction rénale produite par l'angiotensine II diminue le débit sanguin rénal et la filtration glomérulaire. De plus, la redistribution du débit sanguin rénal résultant de la vasoconstriction rénale accélère la réabsorption de sodium par les néphrons profonds. L'ANGII stimule aussi directement la réabsorption proximale de sodium, cet effet sera discuté plus en détail à la prochaine section. Enfin, la réabsorption distale de sodium est accélérée par l'aldostérone dont la synthèse et la sécrétion par les cellules de la zone glomérulée des glandes surrénales sont stimulées par l'ANGII (Brenner 5<sup>th</sup> edition, 1996). L'ANGII joue aussi un rôle important dans l'autorégulation de la filtration glomérulaire, c'est-à-dire que la rétroaction tubuloglomérulaire permet l'ajustement rapide de la résistance artériolaire du glomérule afin de maintenir une certaine constance dans le TFG malgré des variations normales de la pression artérielle (Thurau 1975). L'ANGII exerce aussi un effet sur le système nerveux central en stimulant le centre de la soif et la sécrétion d'hormone antidiurétique (ADH) (Phillips et al. 1998). De plus, récemment, on a suggéré que l'ANGII et les autres facteurs du système rénine-angiotensine pouvaient agir comme des facteurs de croissance locaux et être impliqués dans la pathogénèse de l'hypertrophie cardiaque (Wollert et al. 1999). Ces effets de l'ANGII se retrouvent schématisés dans la partie inférieure de la **figure 1**.



**Figure 1.** Système rénine-angiotensine. Facteurs libérant la rénine et effets de l'ANGII

### **I.1.3.1 Effets sur le transport tubulaire d'électrolytes**

En plus de ses effets vasoconstricteurs, l'ANGII est un important facteur antinatriurétique. Cette baisse d'excrétion de  $\text{Na}^+$  s'effectue entre autres par des effets indirects déjà décrits plus haut. Des études de clairance et la caractérisation des récepteurs de l'ANGII le long du néphron suggèrent également un effet tubulaire direct. Les récepteurs et les différents messagers impliqués dans l'effet tubulaire direct de l'ANGII seront décrits plus loin.

Afin d'étudier l'effet tubulaire direct de l'ANGII et de minimiser ses effets vasomoteurs et de sécrétion d'aldostérone, Gertz (1962) injecta  $10^{-4}\text{M}$  d'ANGII directement dans la lumière tubulaire proximale de rat et les résultats montrèrent une inhibition de 30% du flux de sodium. Ces données de microperfusion furent

confirmées par la technique de «goutte d'huile partagée» (Leyssac 1964). De plus, d'autres études montraient que l'ANGII n'avait pas d'effet direct sur le  $\text{TNa}^+$  (Burg 1968, Lowitz 1969) alors qu'une autre de clairance montrait que l'ANGII stimulait le  $\text{TNa}^+$  chez le chien (Johnson et al. 1977). On remarque que les résultats de tous ces travaux divergent selon la technique employée, l'espèce animale et la concentration d'ANGII tubulaire. Finalement, c'est à partir d'une étude de microponction *in vivo* que Harris et Young (1977) ont clairement démontré que l'ANGII affectait la réabsorption de sodium par le PT. Ces travaux rapportèrent que l'effet de l'ANGII était biphasique et dépendant de la dose, c'est-à-dire que de faibles concentrations d'ANGII ( $10^{-13}$  à  $10^{-10}$ M) stimulait le  $\text{TNa}^+$  alors que de fortes concentrations ( $10^{-9}$ M) l'inhibait. Depuis, l'effet direct biphasique de l'ANGII sur le  $\text{TNa}^+$  a été confirmé par microperfusion *in vitro* (Schuster et al. 1984) et réabsorption de  $^{22}\text{Na}^+$  par des PT isolés (Gesek et al. 1990). Schuster et al. avait aussi remarqué que la stimulation du  $\text{TNa}^+$  n'était pas accompagnée par un changement dans la différence de potentiel électrique transtubulaire, suggérant que la réabsorption passait par une voie électroneutre. Les études qui suivirent conclurent effectivement que le  $\text{TNa}^+$  augmentait suite à l'activation de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , l'effet étant complètement aboli par l'amiloride (Liu et al. 1987, Saccomani et al. 1990). L'activation de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  dans le PT entraîne une acidification de la lumière tubulaire et par conséquent, une stimulation de l'échangeur  $\text{H}^+/\text{HCO}_3^-$ . Le bicarbonate est donc réabsorbé indirectement suite à l'activation par l'ANGII, un effet qui a été vérifié par microcalorimétrie (mesure de  $\text{CO}_2$ ) par Wang et al. (1990). L'ANGII active aussi directement le cotransporteur basolatéral  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  tel que démontré par Geibel et Geibisch (1990). En résumé, l'ANGII augmente la réabsorption proximale de  $\text{Na}^+$  en stimulant l'échangeur luminal  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  apical ainsi que le cotransporteur basolatéral  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  (Harris 1992, Coppola et al. 1994). Il est à noter que l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  a un rôle crucial à jouer dans la réabsorption puisque son inhibition complète entraîne une chute de 50% dans le transport proximal de  $\text{Na}^+$  (Baum 1987).

Dans le DT, les premières expériences de flot arrêté et de clairance chez le chien (Vander 1963) et de microponction chez le rat (Lowitz et al. 1969) avait montré une diminution de la réabsorption de  $\text{Na}^+$ . Cependant, l'ANGII dans ces expériences était

administré par l'artère rénale ce qui empêche de tirer des conclusions sur l'effet direct de l'hormone. D'ailleurs, une étude récente de microperfusion *in vivo* chez le rat a fourni des résultats opposés. En effet, l'ajout de  $10^{-11}$ M d'ANGII au perfusat luminal stimulait le  $\text{TNa}^+$  et le  $\text{THCO}_3^-$  par le DT (Wang et Giebisch 1996). Dans cette étude, l'effet de fortes concentrations d'ANGII sur le transport d'électrolytes n'est pas documenté dans le DT. Comme dans le PT, l'amiloride inhibait la stimulation du  $\text{TNa}^+$ , suggérant que le transporteur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  serait aussi impliqué dans la réabsorption dépendante de l'ANGII dans cette portion, d'autant plus que le transport est neutre et couplé indirectement au transport de bicarbonate. Les auteurs ont également mesuré le  $\text{TNa}^+$  et le  $\text{THCO}_3^-$  sous l'effet de l'ANGII dans le tubule collecteur initial (late DT). Ils ont rapporté une augmentation du  $\text{TNa}^+$  mais aucun effet sur le  $\text{THCO}_3^-$ . On pourrait attribuer ces résultats à une stimulation des canaux sodiques sensibles à l'amiloride, cependant notre laboratoire a montré que de faibles concentrations d'ANGII inhibaient le  $\text{TNa}^+$  par les membranes lumineales de DT (Charbonneau et al. 2001). Finalement, Cappasso et al. (1994) ont rapporté une augmentation du  $\text{TNa}^+$  et du  $\text{THCO}_3^-$  par l'anse ascendante large.

#### **I.1.4 Mécanisme d'action de l'angiotensine II**

##### **I.1.4.1 Récepteurs**

L'activité de l'ANGII dépend de la présence de récepteurs à la surface des cellules cibles. Les progrès pharmacologiques ont mené à la synthèse d'antagonistes non peptidiques qui ont permis la distinction de deux types de récepteurs : les  $\text{AT}_1$  et les  $\text{AT}_2$  (Whitebread et al. 1989, Chiu et al. 1989). La liste d'antagonistes de l'ANGII est aujourd'hui impressionnante (de Gasparo et al. 2000 [revue]) en voici quelques uns : la saralasin est une molécule capable de déplacer l'ANGII de tous ses récepteurs, le losartan (DuP753) déplace l'ANGII seulement des  $\text{AT}_1$  alors que le PD123177, le PD123319 ou le CGP42112A des  $\text{AT}_2$ . Ces agents ont aussi contribué à découpler les connaissances de la physiologie relié à l'ANGII, mais surtout, ils contribuent comme agents pharmacologiques, particulièrement dans le traitement de

l'hypertension artérielle (Gavras 1999 [revue]) et plus récemment dans l'insuffisance rénale chronique (Mackenzie et al. 1999 [revue]). Le récepteur  $AT_1$  est une protéine de 359 acides aminés à 7 domaines transmembranaires qui est responsable de tous les effets qui ont déjà été décrits jusqu'à maintenant. Les voies de signalisation empruntées par ces récepteurs seront décrites en détail à la prochaine section. Deux sous-types de récepteurs  $AT_1$  ont été identifiés chez les rongeurs,  $AT_{1A}$  et  $AT_{1B}$ , (Iwai et al. 1992, Elton et al. 1992). Les récepteurs  $AT_{1A}$  prédomine dans le rein, cœur, foie et cerveau, alors que  $AT_{1B}$  se retrouvent principalement dans le cortex de la glande surrénale et l'hypophyse (Burson et al. 1994).

En ce qui concerne le récepteur  $AT_2$ , il n'est pas couplé aux protéines G ni à la voie des phosphoinositols. On le rencontre dans le cerveau, la médullosurrénale et dans les tissus fœtaux où il semble jouer un rôle dans les processus d'apoptose et de régénération tissulaire. Malgré qu'on connaît mieux ce récepteur, plusieurs énigmes demeurent quant à son rôle et sa régulation (Gallinat et al. 2000 [revue]).

Le nombre de récepteurs est régulé de plusieurs façons. L'agoniste lui-même en est un exemple : un excès d'ANGII diminue le nombre de récepteurs  $AT_1$  et un défaut l'augmente (Bellucci et al. 1984). Beaufile et al. (1976) avaient remarqué que le binding de l'ANGII augmentait dans le glomérule chez les rats ayant une diète riche en sodium alors que le binding était faible lorsque les rats en étaient privés. Ces résultats ont été confirmés récemment par des techniques moléculaires (Ruan et al. 1997). Cependant, une autre étude a montré que, contrairement à ce qui avait été démontré dans le glomérule, une charge élevée en sodium diminue le nombre de récepteurs d'ANGII au niveau tubulaire alors qu'une déplétion en sel augmente les récepteurs tubulaires (Douglas 1987a). Ces résultats ont aussi été vérifiés par une approche moléculaire spécifiquement dans le PT (Cheng et al. 1995). En plus de l'action homologue de l'ANGII, l'expression des récepteurs est modulée par d'autres hormones qui sont indépendants du système rénine-angiotensine. En effet, le nombre de récepteurs  $AT_1$  est diminué par les corticostéroïdes et les œstrogènes et augmenté par la prolactine (Douglas 1987b, Douglas 1987c). Aujourd'hui, le mécanisme

moléculaire d'internalisation du récepteur AT<sub>1</sub> en présence d'ANGII est bien documenté (Hunyady et al. 1999 [revue]).

#### **I.1.4.1.1 Localisation des récepteurs dans le rein**

Des études d'autoradiographies ont montré que les récepteurs d'ANGII étaient exprimés dans plusieurs tissus incluant les reins, le système nerveux central, les vaisseaux sanguins, le foie et les glandes surrénales (Mendelsohn et al. 1987). Dans le rein, les récepteurs d'ANGII sont localisés au niveau des vaisseaux, du glomérule (Osborne et al. 1975), des cellules mésangiales (Sraer et al. 1974) et au niveau tubulaire. La recherche sur les récepteurs tubulaires d'ANGII a débuté en 1982 alors que Brown et Douglas rapportaient que l'ANGII avait des sites de liaison sur les membranes luminales provenant de cortex total de rat. Le même groupe a obtenu des résultats similaires sur les membranes basolatérales (Brown et al. 1983). Par la suite, des études de microdissection ont révélé plus clairement des sites de liaison au niveau du tubule proximal, de l'anse ascendante large, du tubule distal et du tubule collecteur cortical et médullaire (Mujais et al. 1986). Depuis, Terada et al. (1993) ont confirmé, par des études de RT-PCR, la présence d'ARNm de récepteur AT<sub>1</sub> tout le long du néphron. Ces résultats ont depuis été confirmés par transfection et culture cellulaire (Burns et al. 1996), hybridation *in situ* (Kakinuma et al. 1993), immunohistochimie avec des anticorps polyclonaux (Paxton et al. 1993), immunohistochimie avec anticorps monoclonaux (Harrison-Bernard 1997) et autoradiographie par microscopie électronique (Zhao et al. 1997).

La distribution rénale de récepteurs AT<sub>2</sub> ou de son ARNm démontre des différences importantes selon l'espèce, le stade de développement et les conditions de stress. Dans la majorité des mammifères adultes étudiés, la densité de récepteurs AT<sub>2</sub> est très faible ou indétectable tant au niveau cortical que médullaire, dans des conditions normales. Ozono et al. (1997) ont montré qu'une déplétion en sodium chez le rat augmentait l'expression de récepteurs AT<sub>2</sub> dans le rein. De plus, Lo et al. (1995) ont rapporté une natriurèse suite à l'administration de PD123319 suggérant que dans ce

cas, l'activation des récepteurs  $AT_2$  entraînerait une rétention de sodium. Chez les adultes, une densité importante de récepteur  $AT_2$  a été rapportée dans certaines artères rénales. De plus, on retrouve chez tous les mammifères fœtus ou nouveau-nés, des évidences d'expression de récepteur  $AT_2$  et d'ARNm, particulièrement par les cellules mésenchymateuses dans la région du cortex superficiel (Aguilera et al. 1994, Kakuchi et al. 1995, Wang et al. 1998).

Un nouveau site de liaison de l'angiotensine différent de  $AT_1$  et  $AT_2$  a été décrit pharmacologiquement. Ce nouveau site de liaison désigné comme  $AT_4$  présente une forte distribution dans une grande variété de tissus incluant le rein, les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales (Swanson et al. 1992). L'hexapeptide ANGIV qui est formé suite à l'hydrolyse de l'ANGII ou de l'ANGIII par des aminopeptidases (Abhold et al. 1988) possède une haute affinité et une bonne spécificité pour ce récepteur  $AT_4$ . Chez le rat, des études d'autoradiographie dans le rein ont montré la présence de récepteurs  $AT_4$  sur la membrane apicale, uniquement dans le PT (Handa et al. 1998). Depuis quelques années, les connaissances sur la localisation des récepteurs  $AT_4$  dans le rein ainsi que ses effets se sont grandement enrichies. Cependant, l'importance de ce système sur la physiologie rénale n'a pas encore été démontrée.

#### **I.1.4.2 Messagers intracellulaire**

Depuis maintenant plus de quinze ans, nous assistons à une explosion des connaissances dans le domaine des voies de signalisation couplées aux récepteurs. Dans la majorité des tissus, incluant les cellules musculaires lisses vasculaires, les hépatocytes et les cellules du cortex surrénalien, le récepteur  $AT_1$  est couplé aux protéines Gq/11 et son activation par l'ANGII est couplée à la phospholipase C, à la production d'inositol triphosphate ( $IP_3$ ), de DAG et la translocation de la protéine kinase C (PKC) (Capponi 1996 [revue]). Ceci entraîne la libération des pools intracellulaires de calcium et l'activation des canaux calciques voltage-dépendants. L'augmentation du  $[Ca^{2+}]_i$  résultant est responsable de la contraction de la cellule, de

la libération d'aldostérone ou l'inhibition de la relâche de rénine par exemple. Contrairement à cette voie classique, les récepteurs d'ANGII dans le rein sont couplés à une combinaison complexe des voies de signalisation.

L'adénylcyclase est un important médiateur des effets sur le transport tubulaire et sur la contraction des cellules mésangiales induits par l'ANGII. Les autres messagers impliqués dans l'activation des cellules mésangiales par l'ANGII ont récemment fait l'objet d'une revue fort complète par Ardaillou et al. (1999). Dans ce mémoire, seulement les voies empruntées par les cellules épithéliales tubulaires seront présentées. Dès 1978, Torres et al. avaient rapporté une inhibition de l'AC sous l'effet de l'ANGII dans des glomérules et des PT isolés. Woodcock et Johnston (1982) ont confirmé ces résultats à partir de cortex total de rat. Dans ces expériences, des concentrations d'ANGII de l'ordre du  $\mu\text{M}$  étaient nécessaires pour observer une diminution d'AMPc. Cependant, depuis ce temps, des expériences utilisant soit des PT en culture à court terme (Douglas 1987a), un modèle de microperfusion *in vitro* (Liu et al. 1989) ou des tubules microdisséqués (Dominguez et al. 1987) ont montré que des concentrations de pM à nM d'ANGII suffisaient à inhiber la production d'AMPc. L'ANGII inhibe l'adénylate cyclase en activant une protéine  $G_i$  probablement l'isoforme  $\alpha_i2$  (Douglas et al. 1990). Cependant, il a déjà été démontré que l'adénylate cyclase était uniquement localisée à la face basolatérale des cellules épithéliales (Zhou et al. 1987). Pour résumer, voyons le modèle de Romero et al. (1991) qui tient compte de toutes ces découvertes. Dans ce modèle hypothétique, les récepteurs  $AT_1$  de la membrane basolatérale seraient de haute affinité et répondraient à de faibles concentrations d'ANGII en inhibant l'adénylate cyclase. En effet, l'activation de  $G_i$  entraîne une baisse d'AMPc qui activerait l'échangeur apical  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  et stimulerait l'échangeur  $\text{Na}^+-\text{HCO}_3^-$ , expliquant les effets déjà décrits de faibles concentrations d'ANGII sur le transport d'ions dans le segment proximal. À ce modèle, il faut aujourd'hui ajouter la contribution de l'activation des isoformes  $\epsilon$  et  $\kappa$  de la PKC car, suite à une stimulation par l'ANGII, sa translocation à la membrane a été associée à une stimulation de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (Karim et al. 1995).

À de fortes concentration, l'ANGII inhibe l'activité de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ . C'est l'effet biphasique déjà discuté. Cet effet est probablement médié par la voie de la phospholipase  $\text{A}_2$  ( $\text{PLA}_2$ ) et particulièrement des métabolites de l'acide arachidonique dépendant du cytochrome P450 et de l'époxygénase (principalement le 5,6 EET) car il a été démontré que l'econazole réduisait l'inhibition du  $\text{TNa}^+$  (Houillier et al. 1996).

Dans le DT, les mécanismes de signalisation intracellulaire ne sont pas clairement établis. En effet, les différents travaux ne s'entendent pas sur la nature de l'effet de l'hormone sur le  $\text{TNa}^+$  dans ce segment. Bien que non prouvé, la stimulation de  $\text{TNa}^+$  et du  $\text{THCO}_3^-$  dans le DT pourrait dépendre de mécanismes similaires à ceux stimulant l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  dans le PT.

En plus de ces mécanismes bien connus, il a été démontré dans les cellules musculaires lisses que l'ANGII activait successivement une protéine Gq/11 puis de nombreuses voies de tyrosines kinases comme p21 Ras, c-src, MAPK et JAK (Berck 1999). La phosphorylation des tyrosines joue un rôle primordial dans l'activation de facteurs de transcription précoce dans le noyau entraînant une hypertrophie et une prolifération cellulaire (Marrero et al. 1995).

D'un autre côté, la liaison de l'ANGII à  $\text{AT}_2$  semble réduire le potentiel de croissance de la cellule. En effet, l'activation des phosphotyrosines phosphatases suite à la stimulation de  $\text{AT}_2$  compromet l'activation des tyrosines kinases. Par exemple Yamada et al. (1996) ont montré que  $\text{AT}_2$  menait à l'activation d'une MAPK-phosphatase-1 et finalement à l'apoptose.  $\text{AT}_2$  serait couplé à  $\text{Gi}\alpha 2$  et  $\text{Gi}\alpha 3$  plutôt que Gq/11 (Zhang et al. 1996).

## **I.2 Le transport du calcium par le rein**

Le concentration total de calcium dans le plasma est d'environ 2.5mM et présent sous deux formes. Le calcium ultrafiltrable (60%) est capable de diffuser dans le secteur extracellulaire et à travers le glomérule (Lassiter et al. 1963). Il comprend le calcium ionisé physiologiquement actif (55%) et le calcium présent sous forme de sels (5%) (Walser 1973) Le calcium non ultrafiltrable (40%) est lié aux protéines plasmatiques (3/4 à l'albumine, 1/4 aux globulines). Seul le calcium ionisé est filtré par le glomérule ce qui représente environ 14g par 24h et seulement 1 à 1.5% est excrété ce qui correspond à l'absorption intestinale de 150 à 200mg (Bleich et al. 1979). Donc, près de 99% du calcium doit être réabsorbé le long du néphron pour maintenir la balance calcique neutre.

### **I.2.1 Le transport selon les différents segments du néphron**

La majorité du calcium est réabsorbée au niveau du tubule contourné proximal. Des études de microdissection ont montré que 60% du calcium filtré était réabsorbé par la portion superficielle du PCT (Lassiter et al. 1963, Sutton et al. 1976). Cette réabsorption se fait principalement de façon passive et paracellulaire selon le gradient électrique engendré par le mouvement de  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$  (Ng et al. 1982, Suki 1979). Ces résultats sont logiques car d'autres études avaient déjà montrés que la concentration de calcium dans le liquide tubulaire proximal n'augmentait que très légèrement (1 à 1.05 mM) par rapport au filtrat glomérulaire (Lassiter et al. 1963, Le Grimellec et al., 1973). De plus, des PCT isolés de lapins ont été perfusés et aucun  $\text{TCa}^{2+}$  n'a été détecté lorsque les gradients étaient absents (Ng et al. 1984). Mais il semble que le transport actif pourrait contribuer davantage chez certaines espèces. En effet, des études chez le rat ont montré que 25% de la réabsorption au niveau du PCT était dû au transport actif dépendant de la ouabaine et du  $\text{Na}^+$  suggérant l'implication d'un échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (Ullrich et al. 1976). La pars recta contribue à 10% de la réabsorption de calcium tel que démontré par la différence de concentration de calcium entre le liquide tubulaire à la fin du PCT et au début de l'anse (Lassiter et al.

1963, Jamison et al. 1974) et confirmé par microperfusion *in vitro* (Rouse et al. 1980).

Approximativement 20% du calcium filtré par le glomérule est réabsorbé par l'anse de Henle (Lassiter et al. 1963), cette réabsorption est inhibée par le furosémide (Bourdeau et al. 1979). La perméabilité des branches descendantes et ascendantes minces au calcium est particulièrement basse (Quamme et al. 1980) contrairement à la branche ascendante large qui est donc responsable de la totalité de la réabsorption (Friedmann 1988). Dans la portion médullaire, le potentiel positif de la lumière est généré par le transport actif de  $\text{Cl}^-$  et la réabsorption est exclusivement paracellulaire (Suki et al. 1981). Cependant, il n'y a pas de consensus dans la littérature en ce qui concerne la nature de la réabsorption de calcium au niveau cortical. Encore une fois, le transport passif est suggéré par la présence d'un potentiel transépithélial et la sensibilité au furosémide (Bourdeau et al. 1979). D'autres études ont observé un transport de calcium supérieur à celui pouvant être expliqué par la diffusion passive, suggérant une composante active (Rocha et al. 1977, Imai 1978).

Le tubule distal est responsable de moins de 10% de la réabsorption du calcium filtré (Costanzo et al. 1978). Toutefois, ce sont les ajustements physiologiques qui ont lieu au niveau du néphron distal qui déterminent l'amplitude de l'excrétion définitive de calcium dans l'urine. Contrairement aux autres segments, le transport à ce niveau est exclusivement actif et transcellulaire. En effet, les jonctions serrées entre les cellules de l'épithélium distal empêche la réabsorption paracellulaire (Tisher et al. 1973) et le gradient électrochimique ne favorise pas le transport dans cette portion. La perméabilité du calcium au niveau distal se fait sous un contrôle hormonal complexe qui sera décrit plus loin et varie afin de s'adapter aux besoins de l'organisme et à l'absorption intestinale.

Des études de microponction ont suggéré la possibilité que le tubule collecteur soit responsable de 1 à 3% du calcium filtré par le glomérule (Sutton et al. 1976). Cependant, le peu d'études qui ont été réalisées dans ce segment n'ont pas pu mettre en évidence un transport actif de  $\text{Ca}^{2+}$ , la PTH, l'amiloride et les thiazides n'ayant aucun effet (Bourdeau et al. 1982, Shimizu et al. 1991).

## **I.2.2 Les transporteurs calciques**

Chez les mammifères, la concentration de calcium dans le milieu extracellulaire (1mM) est largement supérieure à celle du calcium libre intracellulaire (0.1µM) et le milieu intracellulaire est chargé négativement par rapport au milieu interstitiel. Cependant, la membrane lipidique empêche le mouvement engendré par le gradient de concentration et le gradient électrique. Donc le mouvement de calcium à travers la membrane est régulé par des protéines de transport. Dans le cas du transport transcellulaire au niveau du néphron, c'est un mécanisme complexe qui intervient pour permettre l'entrée du calcium du côté apical et la sortie du côté basolatéral permettant ainsi des ajustements fins de la réabsorption du calcium.

### **I.2.2.1 Passage à travers la membrane apicale**

Bien que la réabsorption de calcium au niveau proximal soit majoritairement paracellulaire et secondaire à l'activité de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase, des canaux perméables au calcium ont été décrits dans ce segment (McCarty et al. 1991). Cependant, il a été démontré que ces canaux étaient activés par l'étirement de la membrane et étaient par conséquent probablement impliqués dans la régulation du volume cellulaire (Fillipovic et al. 1991). Des études d'électrophysiologie ont également mis en évidence la présence d'un canal calcique de 12pS dans ce segment (Saunders et al. 1990) alors que d'autres ont montré un canal sensible à la vérapamil et non aux dihydropyridines (Rose et al. 1993). Bien qu'il y ait de plus en plus de preuves sur l'existence d'un transport transcellulaire dans le PT, la nature des transporteurs impliqués à ce niveau n'est pas bien déterminée et les nouvelles connaissances dans ce domaine reposent entre autres sur des techniques moléculaires, de culture cellulaire et d'électrophysiologie.

Au niveau distal, le transport est exclusivement transcellulaire ce qui implique nécessairement la présence de protéines de transport de calcium. Bacskai et Friedman (1990) ont rapporté la présence d'un canal calcique non-dépendant du voltage et stimulé par la PTH dans des cultures de cellules provenant de DT de souris.

Poncet et al. (1992) ont également identifié un canal perméable au  $\text{Ca}^{2+}$  par la technique de «patch-clamp» au niveau de la membrane apicale de cellules en culture primaire de DT de lapins. Ce canal possédait une conductance de 8pS et était bloqué par du  $\text{La}^{3+}$  et par de fortes concentrations de vérapamil ou de nifedipine.

Notre laboratoire a déjà démontré trois types de transport de  $\text{Ca}^{2+}$  par les membranes luminales de PT et DT. Le type I se retrouve dans le PT, il est de faible affinité et n'est influencé ni par le  $\text{Na}^+$ , le  $\text{K}^+$  ou le pH. Le type II est présent dans le DT, il est de faible affinité et dépend fortement du pH et des thiazides (Lajeunesse et al. 1991). Finalement le type III est également localisé dans le DT mais possède une haute affinité pour le  $\text{Ca}^{2+}$  et est inhibé par le  $\text{Na}^+$  et stimulé par le  $\text{K}^+$  (position cis) et par un pH alcalin. Ce dernier type de transport luminal de  $\text{Ca}^{2+}$  n'est pas affecté par le potentiel électrique ni par le nitrendipine et le diltiazem, des inhibiteurs de canaux calciques. (Brunette et al. 1992a, Brunette et al. 1992b). Récemment, Hoenderop et al. (1999) ont identifié, par des techniques de biologie moléculaire, un canal calcique EcaC de forte affinité au niveau de la membrane apicale au niveau distal.

Au niveau du tubule collecteur, une étude portant sur l'acidification de la lumière tubulaire a servi de base à l'hypothèse selon laquelle un échangeur  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$  serait présent à ce niveau (Lau et al. 1991). Cette hypothèse est supportée par le fait que le  $\text{TCa}^{2+}$  n'est pas sensible aux inhibiteurs des canaux calciques dans ce segment (Rochelle et al. 1991). Bien que ce mécanisme original de transport dans le tubule collecteur de lapin reste à caractériser, il pourrait expliquer l'hypercalciurie induite par l'acidose (Lemann et al. 1967).

### **I.2.2.2 Passage à travers la membrane basolatérale**

Comme déjà mentionné précédemment, le transport de  $\text{Ca}^{2+}$  au niveau de la membrane basolatérale est défavorisé par le gradient électrochimique. Les protéines de transport impliquées nécessitent donc un apport énergétique. Effectivement, il a été démontré que le  $\text{TCa}^{2+}$  par les membranes basolatérales (BLM) dépendait de l'ATP aussi bien lorsque les membranes provenaient de cortex de rat (Gmaj et al.

1979) que de lapin (Vieyra et al. 1986). De plus, une pompe  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase de type-P dépendante du  $\text{Mg}^{2+}$  et possédant une haute affinité pour le  $\text{Ca}^{2+}$  a été caractérisée dans tous les segments du néphron chez le lapin, mais l'activité de la pompe s'est révélée plus forte dans les segments distaux (Doucet et al. 1982). Chez l'humain, l'activité de la  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase a été caractérisée seulement au niveau du DT (Borke et al. 1987). Depuis, des études de RT-PCR *in situ* sur des segments corticaux microdisséqués de rat ont suggéré que l'isoforme rPMCA2 (rat plasma calcium ATPase isoform 2) était la forme active dans la réabsorption du  $\text{Ca}^{2+}$  (Magocsi et al. 1992).

L'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  permet aussi de sortir la calcium de la cellule malgré le gradient électrochimique car c'est un échangeur électrogénique ( $3\text{Na}^+$  pour  $1\text{Ca}^{2+}$ ). Ce transporteur est présent dans plusieurs types cellulaires et intervient dans la régulation du  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . L'échangeur a depuis longtemps été invoqué comme participant au  $\text{TCa}^{2+}$  dans le rein. Ramachandran et Brunette (1989) ont montré, à l'aide de préparations de vésicules membranaires, que l'activité de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  était restreint à la membrane basolatérale du DT. Depuis, des études de RT-PCR ont permis d'isoler le cDNA de la forme rénale et les analyses de Northern qui suivirent démontrèrent la présence de l'échangeur exclusivement au niveau cortical (Reilly et al. 1992). Des travaux d'immunofluorescence utilisant un anticorps monoclonal spécifique à l'échangeur ont permis d'établir que l'expression de l'échangeur dans le rein était restreint aux membranes basolatérales du tubule connecteur (Reilly et al. 1993).

### **I.2.3 La régulation hormonale**

#### **I.2.3.1 Tube proximal**

Comme il a été décrit plus haut, le calcium est réabsorbé dans le PT et l'anse de Henle majoritairement de façon passive en suivant la réabsorption de  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$ . Ainsi, très peu d'études ont montré une influence hormonal sur le  $\text{TCa}^{2+}$  par le PT et l'anse de Henle. Parmi celles-ci, mentionnons celle de Khalifa et al. (1983) qui avait rapporté une augmentation de la réabsorption de calcium par la PTH mais, les membranes provenaient de cortex total de rat. De plus, bien que Morel et Doucet (1986) aient décrit une adénylate cyclase sensible à la PTH au niveau du tube proximal chez le lapin, selon eux l'effet de l'hormone dans ce segment serait de réduire la réabsorption de fluide sans effet sur le transport de  $\text{Ca}^{2+}$ . D'ailleurs, Lajeunesse et Brunette (1994) ont montré que la PTH, la nitrendipine (bloqueur de canaux calciques) et le Bay K8644 (agoniste des canaux calciques) n'influençaient pas le  $\text{TCa}^{2+}$  par des vésicules de membranes lumineales (BBM) provenant de PT de lapins isolés par gradient de Percoll. En résumé, les résultats concernant la régulation hormonale du  $\text{TCa}^{2+}$  dans les segments pré-distaux divergent et semblent dépendre de l'espèce étudiée et des méthodes de purification employées. Il est à souhaiter que la caractérisation moléculaire et électrophysiologique des canaux calciques permettra de mieux comprendre la régulation du  $\text{TCa}^{2+}$  par ces segments. Le reste de la discussion de la régulation hormonale portera sur le segment distal qui est sans aucun doute le site le plus important dans la régulation homéostatique de l'excrétion de calcium.

#### **I.2.3.2 Tube distal**

La présence de récepteurs à la PTH et à la calcitonine couplés à l'adénylate cyclase ont été mis en évidence dans les différents segments corticaux à la fin des années 70 dans le laboratoire du professeur Morel (Brunette et al. 1979). À la même époque, Costanzo et al. (1980) montrait par microponction que l'AMPc augmentait le  $\text{TCa}^{2+}$  dans le tube distal du rat. Ensuite, des travaux de microperfusion *in vitro* ont

confirmé l'hypothèse déjà en vogue selon laquelle la PTH stimulait le transport du calcium au niveau du néphron distal. Depuis, des études de patch-clamp ont confirmé ces résultats et il est maintenant reconnu que la PTH stimule la réabsorption de calcium par le rein et que cet effet est dû à l'augmentation du  $\text{TCa}^{2+}$  par la membrane luminale du DT (Matsunaga et al. 1991). D'autres travaux d'électrophysiologie ont ajouté que la PTH augmentait la conductance de  $\text{Cl}^-$  par les cellules provenant de DT, menant à une hyperpolarisation de la membrane et une augmentation de la perméabilité des canaux calciques sensibles à la dihydropyridine (Gesek et al. 1992). Finalement, la PTH influence également la perméabilité de la membrane basolatérale au calcium en stimulant l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (Bouhtiauy et al. 1991).

La calcitonine, dont la sécrétion par la glande thyroïde est stimulée par l'hypercalcémie et le glucagon, diminue la calcémie en prévenant la résorption osseuse. Cependant, comme mentionné plus haut, la découverte de récepteurs au niveau des membranes des segments distaux du néphron a ouvert la voie à de nombreuses études. Des expériences de microperfusion *in vivo* et *in vitro* ont montré que la calcitonine avait le même effet que la PTH soit une augmentation de la réabsorption de  $\text{Ca}^{2+}$  par le tube distal (Elalouf et al. 1983, Shimizu et al. 1990). Ces études ont également montré que la calcitonine stimulait elle aussi l'activité de adénylate cyclase. Ces résultats ont également été démontrés dans notre laboratoire par Zuo et Brunette (1997) qui ont aussi mis en évidence la stimulation de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  de la membrane basolatérale.

La PTH stimule aussi la production de  $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$  qui augmente, comme la PTH, la résorption osseuse et qui a un effet important sur la stimulation de l'absorption intestinale de  $\text{Ca}^{2+}$ . De plus, même si la synthèse de la  $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$  est réalisée par la  $1\alpha$ -hydroxylase dans le PCT, la vitamine  $\text{D}_3$  exerce un effet potentialisant l'effet de la PTH sur la réabsorption rénale de  $\text{Ca}^{2+}$  spécifiquement au niveau du tubule connecteur (Kawashima et al. 1986). Cependant, Bindels et al. (1991) ont démontré un effet de stimulation du  $\text{TCa}^{2+}$  par la vitamine  $\text{D}_3$  sur des cellules de tubule connecteur de lapin en culture primaire, indépendamment de la présence de PTH.

Contrairement à ces résultats, le  $\text{TCa}^{2+}$  par des cellules de DT de souris en culture ne semble pas, directement ou indirectement via la potentialisation de l'effet de la PTH, influencé par la  $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$  (Sneddon et al. 1992). Cette différence d'effet au niveau de la portion distale pourrait s'expliquer par le rôle de la vitamine  $\text{D}_3$  sur les protéines de liaison du calcium, les calbindins  $\text{D}_{28\text{k}}$  et  $9\text{k}$ . En effet, il est connu depuis longtemps que ces deux protéines de liaison du calcium sont présentes dans les cellules du DT et du tubule connecteur des mammifères (Taylor et al. 1982). De plus, des travaux ont montré que la calbindin  $\text{D}_{28\text{k}}$  stimulait le  $\text{TCa}^{2+}$  seulement par les vésicules de membranes lumineales (Bouhtiauy et al. 1994a) alors que la calbindin  $\text{D}_{9\text{k}}$  stimulait le  $\text{TCa}^{2+}$  dépendant de l'ATP par les vésicules de membranes basolatérales (Bouhtiauy et al. 1994b).

### **I.3 Le but du projet**

À partir de l'origine de l'angiotensine et de ses rôles dans les différents tissus, j'ai voulu souligner, dans cette introduction, l'implication de cette hormone dans l'homéostasie rénale et particulièrement au niveau de la régulation de l'excrétion du sodium. Dans un deuxième volet, j'ai présenté quelques uns des éléments qui interviennent lors du passage de calcium à travers les cellules épithéliales du néphron. À la lumière de ces connaissances, il est intéressant de supposer que l'ANGII pourrait exercer un effet tubulaire direct sur la réabsorption de calcium par les membranes lumineales des tubules proximaux et/ou distaux. C'est ce que nous avons étudié en utilisant la technique, mise au point dans notre laboratoire, qui consiste à mesurer le  $\text{TCa}^{2+}$  par des vésicules de membranes lumineales purifiées à partir de tubules ayant été soumis à différentes conditions. De plus, nous avons voulu vérifier laquelle des deux cinétiques était affectée par l'ANGII, car notre laboratoire a déjà démontré l'existence d'une double cinétique du  $\text{TCa}^{2+}$  par la membrane lumineale du tubule distal (Brunette et al. 1994). Ensuite, afin de poursuivre la caractérisation de l'effet de l'ANGII, nous avons étudié le type de récepteur ainsi que les messagers intracellulaire impliqués et finalement, l'additivité de cet effet avec celui de la PTH.

## **II. MATÉRIEL ET MÉTHODE**

### **II.1 Matériel**

Le  $^{45}\text{CaCl}_2$ , ayant une radioactivité de 5 mCi/ml, a été obtenu de la compagnie Mandel (NEN Life Sciences Products, Boston, MA). Les filtres millipores proviennent de la compagnie Millipore (Bedford, Cal). L'ANGII, la collagénase de type V, le RpAMPc, l'econazole proviennent de Sigma (St-Louis, MO) et le Calphostin C de Calbiochem. Le losartan et le PD123319 ont été gracieusement fournis par Merck, Sharp and Dohme et Dr John S.D. Chan respectivement. Les reins proviennent de lapins âgés majoritairement de 2 mois et ont été acheté frais à chaque semaine à l'abattoir Zinmann.

### **II.2 Isolation des suspensions tubulaires**

Les suspensions enrichies de tubules proximaux et distaux de lapin ont été préparées selon la méthode décrite par Vinay et al. (1981) et modifiée par Brunette et al. (1992a). Les reins de lapins New Zealand sont d'abord décapsulés. Ensuite, le cortex est prélevé car, c'est dans cette portion que l'on retrouve les tubules contournés proximaux et distaux. Le cortex est haché et suspendus dans un milieu de culture équilibré pour une première digestion à 37°C pendant 5 minutes. Ce milieu contient de la collagénase de type V (1 mg/ml), 0.5% d'albumine sérique de bœuf (BSA) préalablement oxygéné avec 95% O<sub>2</sub> et 5%CO<sub>2</sub> et est enrichi de glutamine (10mM), d'acide glutamique (1mM), et d'acide lactique (10mM). Après un lavage avec une solution Krebs-Henseleit modifié et oxygéné (NaCl 138mM, mannitol 58mM, NaHCO<sub>3</sub> 1.38mM, KCl 3.8mM, MgSO<sub>4</sub> 1.39mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.38 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.17mM et BSA 0.5%), 10 unités/ml de DNase sont ajoutées au milieu de culture qui est agité pendant 20 minutes à 37°C pour la deuxième étape de la digestion. Ensuite, le digestat est filtré à travers un filtre de 250µm. Le filtrat est centrifugé deux fois avec la même solution Krebs-Henseleit déjà décrite pendant 20 secondes à 200g avec

une centrifugeuse de table. Les tubules sont ensuite resuspendus dans une solution Krebs-Henseleit modifié, sans BSA mais avec 40% (v/v) de Percoll oxygéné (95% O<sub>2</sub> et 5%CO<sub>2</sub>). Cette suspension est alors centrifugée pendant 30 minutes à 28000g, à 4°C. Cette centrifugation sur gradient de Percoll donne 3 bandes:

1. La bande supérieure du tube est enrichie en DT
2. La bande sous-jacente est constituée de glomérules
3. La bande inférieure se compose de tubules proximaux

### **II.3 Incubation des tubules**

Les tubules proximaux ou distaux sont incubés à 37°C selon les conditions de l'expérience, c'est-à-dire en présence d'hormones (ANGII ou PTH) avec s'il y a lieu un antagoniste (losartan, PD123319) ou un inhibiteur (RpAMPc, Calphostin C, Econazole) dans un milieu de culture contenant 2% de sérum bovin foetal et 0.1mM de PMSF. L'incubation tubulaire est arrêtée par des lavages rapides avec une solution de Krebs-Henseleit glacée. Ensuite les tubules sont resuspendus dans une solution hypotonique de mannitol 10mM et TRIS-Hepes 20mM à pH7,4 et congelés à -80°C jusqu'au jour de l'expérience.

### **II.4 Préparation des membranes luminales**

Les membranes luminales ont été préparées selon la technique de précipitation au MgCl<sub>2</sub> déjà publiée (Lajeunesse et Brunette 1991) et modifiée à partir de la méthode de Booth et Kenny (1974). Les tubules congelés dans le mannitol 10mM et TRIS-Hepes à pH 7,4 sont dégelés rapidement dans l'eau chaude et homogénéisés avec un homogénéisateur Dounce pour que les cellules éclatent. Ensuite, on précipite pendant 10 minutes pour les membranes provenant de DT et 20 minutes pour celles de PT sur glace avec 12mM de MgCl<sub>2</sub> suivi d'une centrifugation à 3000 g pendant 20 minutes à 4°C afin de se débarrasser des membranes basolatérales, des glomérules et des organelles intracellulaires. Le surnageant est ensuite recueilli et centrifugé à 28000g

pendant 20 minutes afin de précipiter les membranes lumineales. Les culots obtenus, enrichi en membranes lumineales, sont alors resuspendus dans une solution de mannitol 280mM TRIS-Hepes 20mM à pH 7,4 et seringués trois fois avec une seringue de 1 ml de jauge 26 x 0,5. La suspension de membranes lumineales est alors laissée sur glace pendant une heure pour laisser vésiculiser.

### **II.5 Mesure de l'activité des marqueurs enzymatiques**

La pureté des préparations de membranes lumineales de PT et DT a été déterminée en mesurant l'activité de la phosphatase alcaline, un marqueur des membranes lumineales du tubule proximal et de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase, un marqueur des membranes basolatérales. L'activité de la phosphatase alcaline a été mesurée selon la méthode de Kelly et Hamilton (1970), alors que l'activité de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase a été quantifiée en mesurant l'activité ATPasique sensible à la ouabaine comme décrit par Post et Sen (1967). Les valeurs d'activités enzymatiques des membranes lumineales purifiées sont comparées avec les valeurs obtenues de l'homogénat de cortex correspondant prélevé avant l'isolation des tubules.

### **II.6 Dosage des protéines**

Les protéines ont été dosées selon la méthode de Lowry et al. (1951)

### **II.7 Mesures du transport de $\text{Ca}^{2+}$ par les vésicules membranaires**

Le transport de calcium a été mesuré par la technique de filtration rapide. Le transport est initié par l'ajout 5 $\mu\text{l}$  de suspension de membranes lumineales à 25  $\mu\text{l}$  de milieu d'incubation. Le milieu d'incubation renferme soit 120mM de NaCl et 40mM de choline chloride ou 140mM de choline chloride en plus de 0,5mM de  $\text{CaCl}_2$  et  $^{45}\text{CaCl}_2$  (concentration finale). Après avoir incubé à 35°C, la suspension est déposée sur un filtre Millipore et rincée avec 5ml de tampon d'arrêt refroidi contenant 140mM

de KCl, 2mM d'EGTA et 20mM de TRIS-Hepes pH à 7,4. L'incorporation de calcium marqué radioactivement dans les vésicules et sur le filtre est alors mesuré dans un compteur Bêta et le  $\text{TCa}^{2+}$  est exprimé en pmol de  $\text{Ca}^{2+}$  /  $\mu\text{g}$  de protéines / temps d'incubation. Dans les expériences de cinétique, les concentrations de  $\text{Ca}^{2+}$  utilisées variaient de 0,025 à 4,00 mM et l'osmolarité du milieu était conservée constante à 300 mOsm en ajustant la concentration de choline chloride.

## **II.8 Analyse statistique**

Les données présentées dans ce mémoire sont exprimées en moyenne  $\pm$  l'écart type. Le test *t de Student* non pairé a été utilisé pour comparer les résultats et les tables statistiques proviennent du volume de Dixon et Massez (1969). Le  $\text{TCa}^{2+}$  par les membranes issues de tubules traités était considéré statistiquement différent du  $\text{TCa}^{2+}$  provenant des membranes contrôles lorsque la probabilité était inférieure à 0,05.

### **III. RÉSULTATS**

#### **III.1 Pureté des suspensions tubulaires et des préparations membranaires**

Le **tableau I** montre les activités enzymatiques des suspensions tubulaires et des membranes lumineales purifiées des tubules proximaux et distaux. Les enzymes dosées sont la phosphatase alcaline et la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase. L'activité de la phosphatase alcaline est normalement exclusive à la membrane lumineale du PT. Il est donc normal que le résultat du dosage de la phosphatase alcaline du cortex total de rein qui est de  $2.51 \pm 0.42$  nmole/ $\mu\text{g}/15\text{min}$  soit semblable à celui obtenu à partir de l'homogénat provenant du PT qui est de  $3.24 \pm 0.32$  nmole/ $\mu\text{g}/15\text{min}$ . Les membranes lumineales proximales ont une activité en phosphatase alcaline de  $15.53 \pm 2.49$  nmole/ $\mu\text{g}/15\text{min}$ , ce qui correspond à un facteur d'enrichissement de 6.19 comparativement à l'homogénat. En principe, l'homogénat du DT ainsi que les membranes lumineales correspondantes ne devraient pas présenter d'activité de la phosphatase alcaline. Toutefois on détecte une très faible activité dans ces préparations, soit de  $0.57 \pm 0.10$  et  $2.10 \pm 0.16$  nmole/ $\mu\text{g}/15\text{min}$  respectivement, ce qui représente un appauvrissement par rapport au cortex total.

La  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase est une enzyme qui, dans le cortex rénal, ne se retrouve qu'au niveau des membranes basolatérales. L'activité de cette enzyme dans nos préparations de suspensions de tubules proximaux est de  $3.56 \pm 0.43$  nmole/ $\mu\text{g}/20\text{min}$ , une valeur semblable à celle du cortex total qui est de  $4.51 \pm 0.33$  nmole/ $\mu\text{g}/20\text{min}$ . Les membranes lumineales issues du PT montrent une activité plus faible soit de  $2.28 \pm 0.27$  nmole/ $\mu\text{g}/20\text{min}$ . La suspension tubulaire de DT ainsi que les membranes lumineales correspondantes présentent une faible activité de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase, soit  $0.87 \pm 0.12$  et  $0.70 \pm 0.08$  nmole/ $\mu\text{g}/20\text{min}$  respectivement.

|                      | Phosphatase alcaline<br>(nmoles/ $\mu$ g/15min) | Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPase<br>(nmoles/ $\mu$ g/20min) |
|----------------------|---|---|
| Cortex               | 2.51 $\pm$ 0.42                                 | 4.51 $\pm$ 0.33   |
| Homogénat PT         | 3.23 $\pm$ 0.32                                 | 3.56 $\pm$ 0.43   |
| Membrane luminale PT | 15.53 $\pm$ 2.49 (x6.19)                        | 2.28 $\pm$ 0.27   |
| Homogénat DT         | 0.57 $\pm$ 0.10                                 | 0.87 $\pm$ 0.12   |
| Membrane luminale DT | 2.10 $\pm$ 0.16 (x0.84)                         | 0.70 $\pm$ 0.08   |

**Tableau I. Activité enzymatique des différentes préparations membranaires.**  
 Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  ES ( $n=15$ ) ; X, enrichissement ou appauvrissement par rapport au cortex

### **III.2 Effet de l'ANGII sur le $\text{TCa}^{2+}$ par les membranes luminales de PT**

Cette expérience avait pour but de déterminer si l'incubation des tubules proximaux avec l'ANGII durant 10 minutes avait un effet sur le transport de 0.5mM de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le temps par les membranes luminales isolées à partir de ces tubules. Comme démontré à la **figure 2**, le  $\text{TCa}^{2+}$  par les vésicules de membranes provenant des tubules ayant été traités avec  $10^{-12}\text{M}$  d'ANGII est significativement augmenté par rapport au contrôle, celui-ci passant de  $0.49 \pm 0.03$  à  $0.66 \pm 0.04$  pmol/ $\mu\text{g}/10$  s. Cet effet initial linéaire diminue dans le temps et disparaît complètement à 180 s.

### **III.3 Courbe dose-réponse de l'effet l'ANGII sur le $\text{TCa}^{2+}$ par les membranes luminales de PT**

Avec des concentrations croissantes d'ANGII, le transport de 0.5mM de  $\text{Ca}^{2+}$  par les membranes luminales de PT augmente graduellement jusqu'à  $10^{-12}\text{M}$  puis diminue pour retrouver le niveau contrôle à  $10^{-10}\text{M}$  et plus d'ANGII. L'aspect de la courbe est donc en forme de cloche, c'est-à-dire que l'effet se perd graduellement avec des concentrations supérieures et inférieures à  $10^{-12}\text{M}$  (**Figure 3**).

### **III.4 Effet de l'ANGII sur le $\text{TCa}^{2+}$ par les membranes luminales de DT en présence et en absence de $\text{Na}^+$**

Il a déjà été démontré que la présence de  $\text{Na}^+$  dans le milieu d'incubation des membranes luminales de DT diminuait le  $\text{TCa}^{2+}$ , alors que cet effet ne se retrouvait pas dans le PT (Brunette et al. 1992a). Nous étions donc intéressés dans un premier temps, à savoir si l'ANGII exerçait un effet dans le DT et, dans un deuxième temps, à vérifier si cet effet était influencé par la présence de  $\text{Na}^+$ . Nous avons donc réalisé des expériences de  $\text{TCa}^{2+}$  par les membranes luminales de DT en variant le milieu d'incubation, le premier avec 140 mM de choline chloride et le second avec 120mM de NaCl et 40 mM de choline chloride.

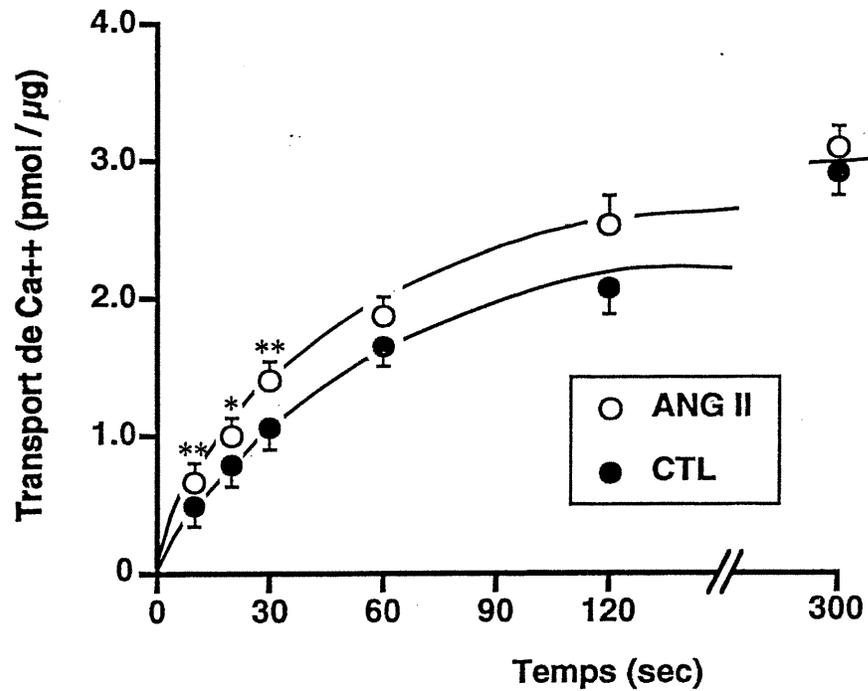


Figure 2. Effet de l'ANGII sur le  $\text{TCa}^{2+}$  par les membranes luminales de PT en fonction du temps. Les tubules ont été préincubés en absence et en présence de  $10^{-12}\text{M}$  d'ANGII pendant 10 min à  $37^\circ\text{C}$ . Le milieu d'incubation vésiculaire contenait  $0\text{mM}$  de  $\text{NaCl}$  et  $0.5\text{mM}$  de  $\text{CaCl}_2$ . Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  ES ( $n=4$ ) ; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.02$ , par rapport au contrôle.

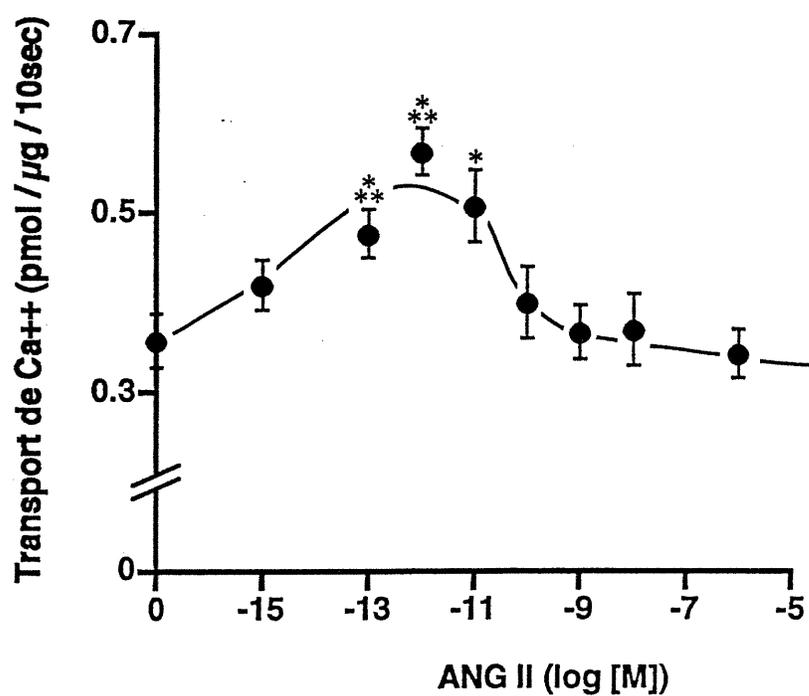


Figure 3. Courbe dose-réponse de l'effet de l'ANGII sur le  $\text{TCa}^{2+}$  par les membranes lumineales de PT. Les tubules ont été préincubés avec des concentrations croissantes d'ANGII pendant 10 min à 37°C. Le milieu d'incubation vésiculaire contenait 0mM de NaCl et 0.5mM de  $\text{CaCl}_2$ . Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  ES ( $n=4$ ); \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , par rapport au contrôle.

En absence de  $\text{Na}^+$ ,  $10^{-12}\text{M}$  d'ANGII a augmenté significativement le  $\text{TCa}^{2+}$  de  $0.52 \pm 0.02$  à  $0.96 \pm 0.04$  pmol/ $\mu\text{g}/10\text{s}$  (**Figure 4**). La présence de  $\text{Na}^+$  a diminué le  $\text{TCa}^{2+}$ , mais l'hormone exerce toujours un effet significatif sur le  $\text{TCa}^{2+}$  celui-ci passant de  $0.38 \pm 0.02$  à  $0.63 \pm 0.04$  pmol/ $\mu\text{g}/10\text{s}$  (**Figure 5**).

### **III.5 Courbe dose-réponse de l'effet de l'ANGII sur le $\text{TCa}^{2+}$ par les membranes lumineales de DT**

De la même façon que pour l'étude dans le PT, la concentration d'ANGII lors de l'incubation tubulaire des DT fut variée afin d'établir la courbe dose-réponse du  $\text{TCa}^{2+}$ . Les résultats nous indiquent une allure similaire en forme de cloche avec un effet maximal également à  $10^{-12}\text{M}$  d'ANGII (**Figure 6**).

### **III.6 Effet du temps d'incubation avec l'ANGII sur le $\text{TCa}^{2+}$ par les membranes lumineales de PT et DT**

Une incubation de 10 minutes des tubules avec l'ANGII suffit à provoquer un effet significatif sur le  $\text{TCa}^{2+}$  par les membranes lumineales issues de PT (**Figure 7**) et de DT (**Figure 8**).

### **III.7 Effet de l'ANGII sur les paramètres cinétiques du $\text{TCa}^{2+}$ par les membranes lumineales de PT et DT**

L'étude de la cinétique du transport de  $\text{Ca}^{2+}$  par les membranes lumineales distales traitées et non traitées pourrait nous fournir des indices sur le mécanisme par lequel agit l'hormone. Les paramètres cinétiques étudiés sont la constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) et la vitesse maximale ( $V_{\text{max}}$ ). Le  $K_m$  représente l'affinité du transporteur pour son substrat et correspond à la concentration nécessaire pour atteindre la moitié de la vitesse maximale. Il est obtenu en calculant la pente de la

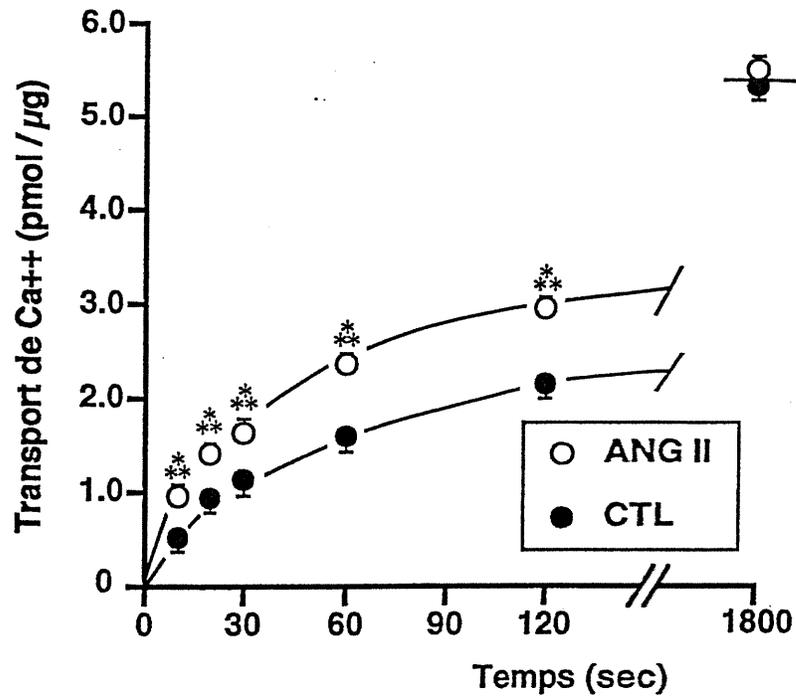


Figure 4. Effet de l'ANGII sur le  $\text{TCa}^{2+}$  par les membranes lumineales de DT en absence de NaCl, en fonction du temps. Les tubules ont été préincubés en absence et en présence de  $10^{-12}\text{M}$  d'ANGII pendant 10 min à  $37^\circ\text{C}$ . Le milieu d'incubation vésiculaire contenait  $0\text{mM}$  de NaCl et  $0.5\text{mM}$  de  $\text{CaCl}_2$ . Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  ES ( $n=4$ ) ; \*\*  $P < 0.01$ , par rapport au contrôle.

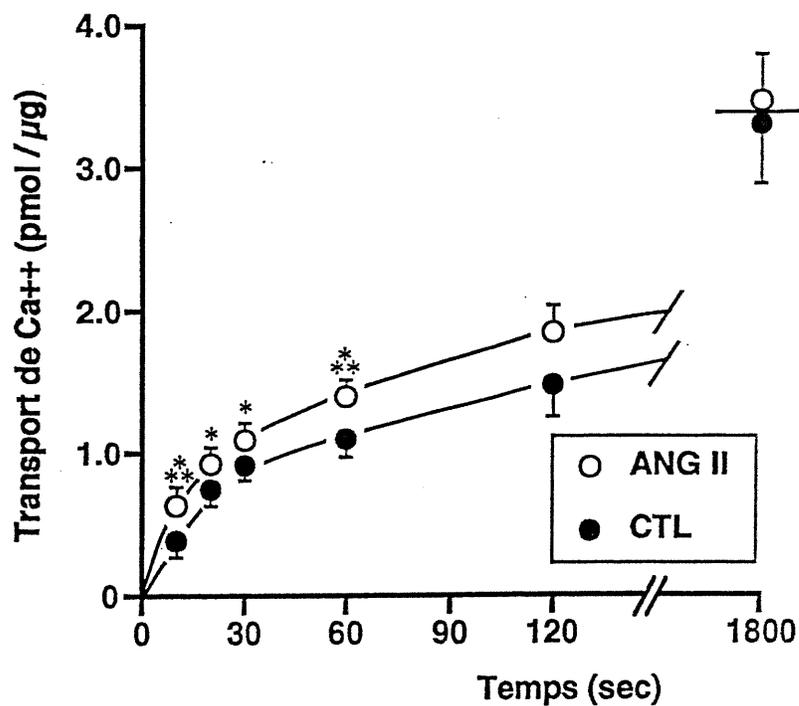


Figure 5. Effet de l'ANGII sur le  $\text{TCa}^{2+}$  par les membranes lumineales de DT, en présence de NaCl, en fonction du temps. Les tubules ont été préincubés en absence et en présence de  $10^{-12}\text{M}$  d'ANGII pendant 10 min à  $37^\circ\text{C}$ . Le milieu d'incubation vésiculaire contenait 120mM de NaCl et 0.5mM de  $\text{CaCl}_2$ . Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  ES ( $n=4$ ); \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , par rapport au contrôle.

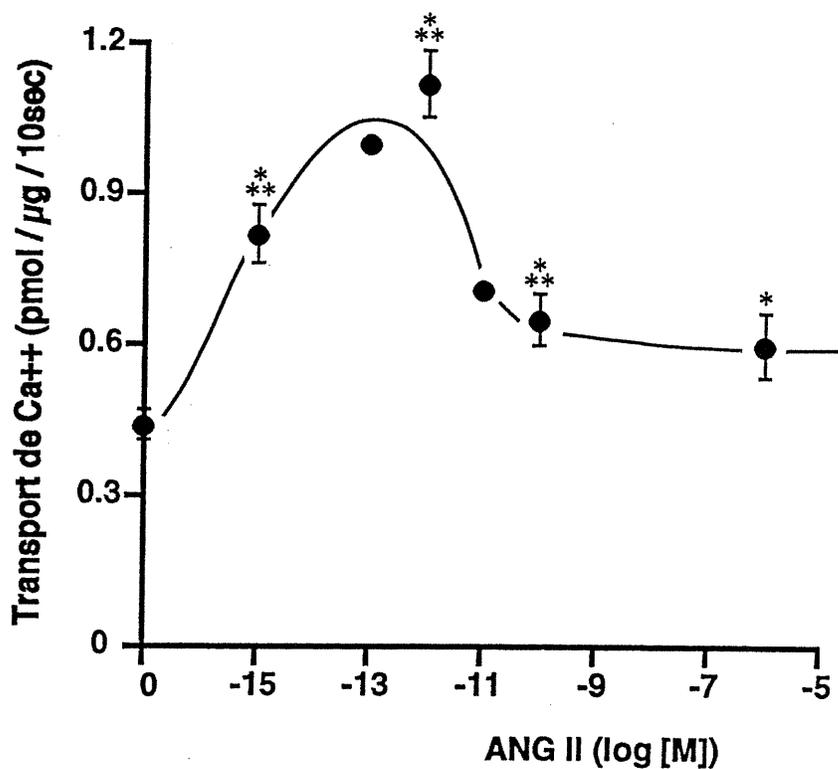


Figure 6. Courbe dose-réponse de l'effet de l'ANGII sur le  $\text{TCa}^{2+}$  par les membranes lumineales de DT. Les tubules ont été préincubés avec des concentrations croissantes d'ANGII pendant 10 min à 37°C. Le milieu d'incubation vésiculaire contenait 0mM de NaCl et 0.5mM de  $\text{CaCl}_2$ . Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  ES ( $n=4-6$ ) ; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , par rapport au contrôle.

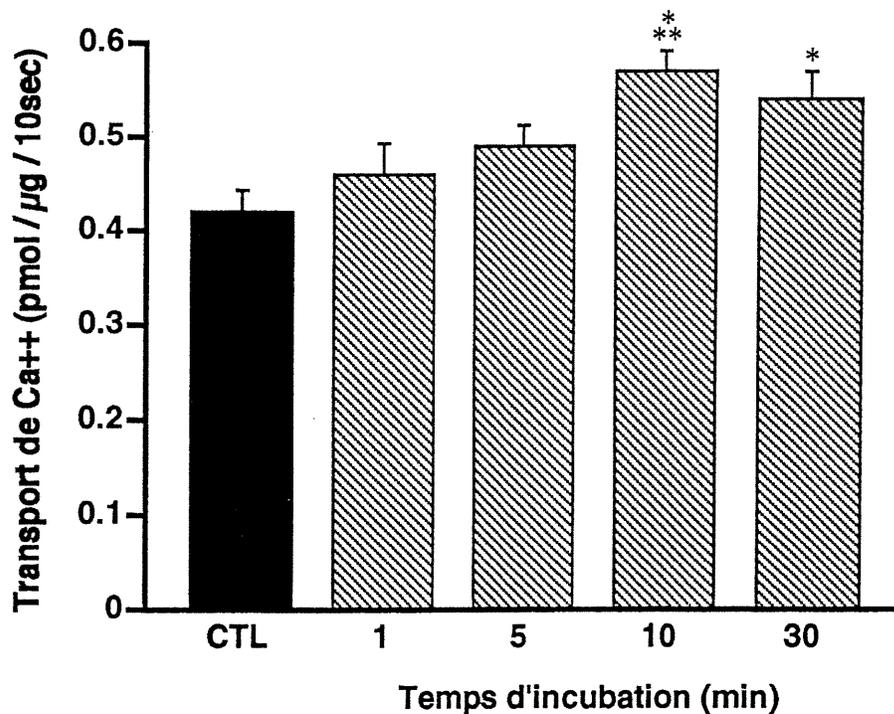


Figure 7. Effet de différents temps d'incubation tubulaire de l'ANGII sur le  $\text{TCa}^{2+}$  par les membranes lumineuses de PT. Les tubules ont été préincubés à de temps variables avec  $10^{-12}\text{M}$  d'ANGII à  $37^\circ\text{C}$ . Le milieu d'incubation vésiculaire contenait  $0\text{mM}$  de  $\text{NaCl}$  et  $0.5\text{mM}$  de  $\text{CaCl}_2$ . Chaque colonne représente la moyenne  $\pm$  ES ( $n=3$ ) ; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , par rapport au contrôle.

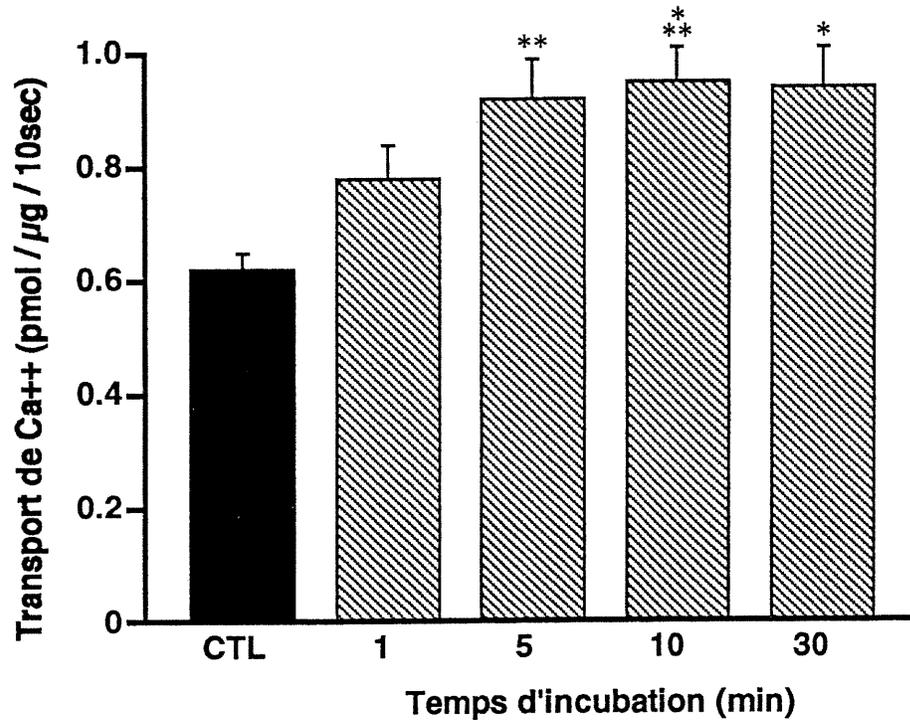


Figure 8. Effet de différents temps d'incubation tubulaire de l'ANGII sur le  $\text{TCa}^{2+}$  par les membranes lumineales de DT. Les tubules ont été préincubés à des temps variables avec  $10^{-12}\text{M}$  d'ANGII à  $37^\circ\text{C}$ . Le milieu d'incubation vésiculaire contenait  $0\text{mM}$  de  $\text{NaCl}$  et  $0.5\text{mM}$  de  $\text{CaCl}_2$ . Chaque colonne représente la moyenne  $\pm$  ES ( $n=3$ ) ; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.02$ , \*\*\*  $P < 0.01$ , par rapport au contrôle.

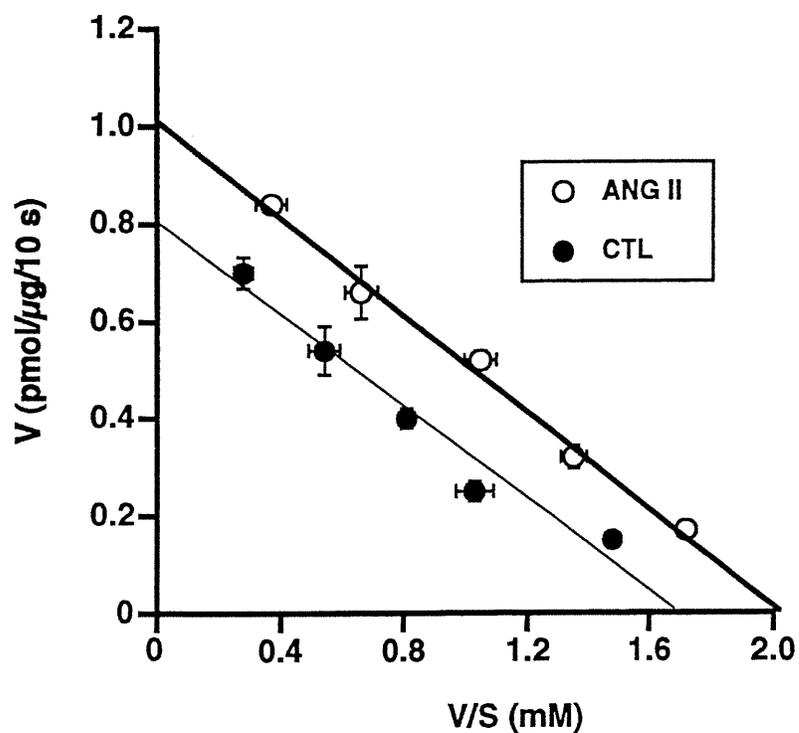
droite obtenue sur le graphique d'Eadie-Hofstee. Le  $V_{max}$  correspond à la vitesse maximale atteinte par le système. C'est donc en mesurant le  $\text{TCa}^{2+}$  avec différentes concentrations de  $\text{Ca}^{2+}$  que nous avons pu obtenir les courbes d'Eadie-Hofstee et ainsi déduire les paramètres cinétiques.

Les données du  $\text{TCa}^{2+}$ , avec une  $[\text{Ca}^{2+}]$  variant de 0.10 à 4.00 mM, par les membranes lumineales de PT non traitées et traitées avec  $10^{-12}\text{M}$  d'ANGII sont représentées à la **figure 9**. Nous avons ensuite répété l'expérience avec des membranes lumineales de DT avec une  $[\text{Ca}^{2+}]$  variant de 0.025 à 4.00 mM et les données transformées en courbe d'Eadie-Hofstee sont présentées à la **figure 10**. Les paramètres cinétiques qui ont été tirés de ces courbes d'Eadie-Hofstee sont représentés dans le **tableau II**. Dans le PT, l'ANGII augmente significativement le  $V_{max}$ , celui-ci passant de  $0.82 \pm 0.03$  à  $0.98 \pm 0.035$  pmol/ $\mu\text{g}/10\text{s}$ , alors que la valeur du  $K_m$  reste inchangée. Ensuite, dans le DT, notre laboratoire a déjà rapporté une double cinétique du  $\text{TCa}^{2+}$  (Brunette et al. 1992). Une première de faible affinité sensible à la calcitonine (Zuo et al. 1997) et une seconde de haute affinité sensible à la PTH (Lajeunesse et al. 1992) et à la calbindin  $\text{D}_{28\text{k}}$  (Bouthiauy et al. 1994). Cette double cinétique a encore été observée avec nos préparations de membranes lumineales de DT. De plus, les résultats montrent que l'ANGII augmente le  $V_{max}$  de la composante à haute affinité par rapport au contrôle, celui-ci passant de  $0.72 \pm 0.03$  à  $0.90 \pm 0.05$  pmol/ $\mu\text{g}/10\text{s}$ .

### **III.8 Effet direct de l'ANGII sur le $\text{TCa}^{2+}$ par les membranes lumineales de PT et**

#### **DT**

Jusqu'à maintenant, les effets de l'ANGII sur le  $\text{TCa}^{2+}$  qui ont été décrits ont été obtenus suite à une incubation des tubules avec l'hormone. Cependant, la présence d'une forte concentration tubulaire d'ANGII et de récepteurs au niveau de la membrane lumineale suggèrent la possibilité que l'hormone puisse exercer un effet



**Figure 9.** Effet de l'ANGII sur la courbe d'Eadie-Hofstee du  $\text{TCa}^{2+}$  par les membranes lumineales de PT. Les tubules ont été préincubés en absence et en présence de  $10^{-12}\text{M}$  d'ANGII pendant 10 min à  $37^\circ\text{C}$ . Le milieu d'incubation vésiculaire contenait  $0\text{mM}$  de  $\text{NaCl}$  et une concentration croissante de  $\text{CaCl}_2$  de  $0.1\text{mM}$  à  $4\text{mM}$ . Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  ES ( $n=3$ ).

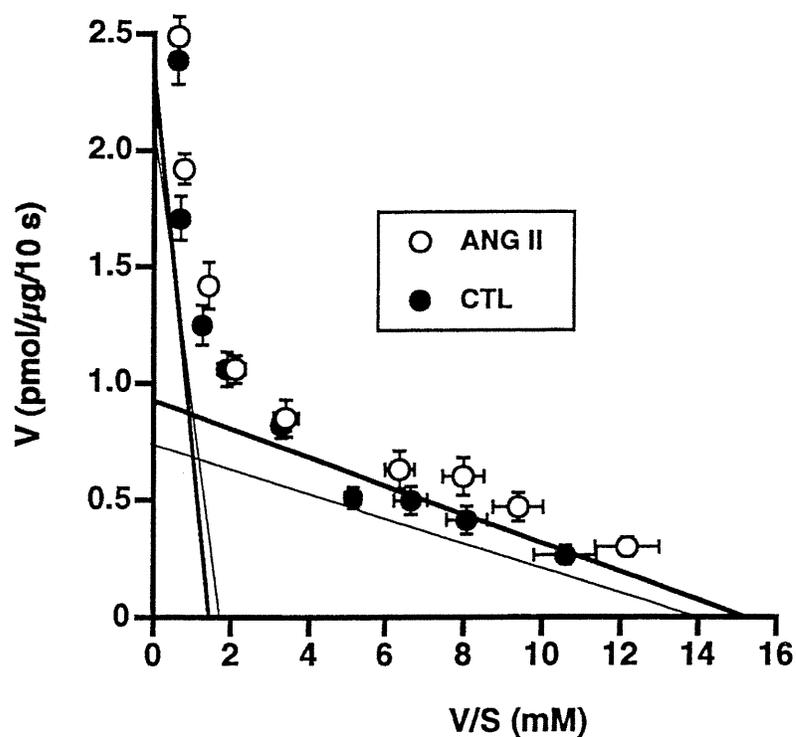


Figure 10. Effet de l'ANGII sur la courbe d'Eadie-Hofstee du  $\text{TCa}^{2+}$  par les membranes lumineales de DT. Les tubules ont été préincubés en absence et en présence de  $10^{-12}\text{M}$  d'ANGII pendant 10 min à  $37^\circ\text{C}$ . Le milieu d'incubation vésiculaire contenait 0mM de NaCl et une concentration croissante de  $\text{CaCl}_2$  de 0.025mM à 4mM. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  ES ( $n=3$ ).

|                       | Km<br>(mM)   | Vmax<br>(pmol/μg/10 s) |
|-----------------------|--------------|------------------------|
| PT                    |              |                        |
| Contrôle              | 0.41 ± 0.02  | 0.82 ± 0.03            |
| ANGII                 | 0.40 ± 0.027 | 0.98 ± 0.035*          |
| DT                    |              |                        |
| <u>Basse affinité</u> |              |                        |
| Contrôle              | 1.54 ± 0.39  | 2.34 ± 0.25            |
| ANGII                 | 1.34 ± 0.39  | 2.26 ± 0.25            |
| <u>Haute affinité</u> |              |                        |
| Contrôle              | 0.05 ± 0.01  | 0.72 ± 0.03            |
| ANGII                 | 0.06 ± 0.003 | 0.90 ± 0.05*           |

**Tableau II. Effet de l'ANGII sur les paramètres cinétiques du transport du  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  par la membrane lumineuse des tubules proximaux et distaux.** Les valeurs représentent la moyenne ± ES ( $n=3$ ) ; \*  $P < 0.05$  par rapport au contrôle.

direct sur le  $\text{TCa}^{2+}$ , indépendamment de la machinerie intracellulaire. Pour vérifier la possibilité d'un tel effet direct sans la machinerie intracellulaire, des expériences furent réalisées en ajoutant  $10^{-12}\text{M}$  d'ANGII dans le milieu de vésiculation (intravésiculaire) et d'autres expériences en ajoutant l'hormone après l'étape de vésiculation (extravésiculaire). Le transport de  $0.5\text{mM}$  de  $\text{Ca}^{2+}$  par les membranes luminales provenant de PT et de DT n'est pas influencé par l'ANGII intravésiculaire (**Figures 11 et 12**) ni par l'ANGII extravésiculaire (données non montrées).

### **III.9 Effet de l'ANGII sur le $\text{TCa}^{2+}$ par les membranes luminales de PT et DT en présence d'inhibiteurs spécifiques aux récepteurs d'ANGII**

Afin de caractériser le type de récepteur impliqué dans l'effet de l'ANGII, des expériences ont été réalisées avec des inhibiteurs spécifiques  $\text{AT}_1$  et  $\text{AT}_2$ , soit le losartan et le PD123319 respectivement. Lorsque seul l'ANGII est incubé avec les tubules proximaux ou distaux, on retrouve la stimulation significative du  $\text{TCa}^{2+}$  déjà décrite soit de  $0.39 \pm 0.020$  à  $0.55 \pm 0.015$  pour les membranes de PT et de  $0.46 \pm 0.027$  à  $0.75 \pm 0.041$  pmol/ $\mu\text{g}/10\text{s}$  pour le DT. Cependant, l'ajout de  $10^{-6}\text{M}$  de losartan abolissait complètement l'effet de l'ANGII en ramenant le  $\text{TCa}^{2+}$  à  $0.39 \pm 0.023$  dans le PT et à  $0.50 \pm 0.037$  pmol/ $\mu\text{g}/10\text{s}$  dans le DT. L'ajout de l'inhibiteur  $\text{AT}_2$ , le PD123319 n'a aucune influence sur l'effet de l'ANGII. (**Figures 13 et 14**)

### **III.10 Effet de l'ANGII sur le $\text{TCa}^{2+}$ par les membranes luminales de PT et DT en présence d'inhibiteurs des messagers intracellulaire**

Après la détermination du type de récepteur impliqué, la suite logique de la caractérisation du mécanisme d'action de l'ANGII consiste à explorer le mécanisme intracellulaire responsable de l'augmentation du  $\text{TCa}^{2+}$ . Une autre série d'expérience a donc été réalisée en incubant les suspensions de PT et DT avec l'ANGII et une variété d'inhibiteurs spécifiques pour les différentes voies de signalisation : RpAMPC, calphostin C et econazole. Le transport de  $0.5\text{mM}$  de  $\text{Ca}^{2+}$  par les

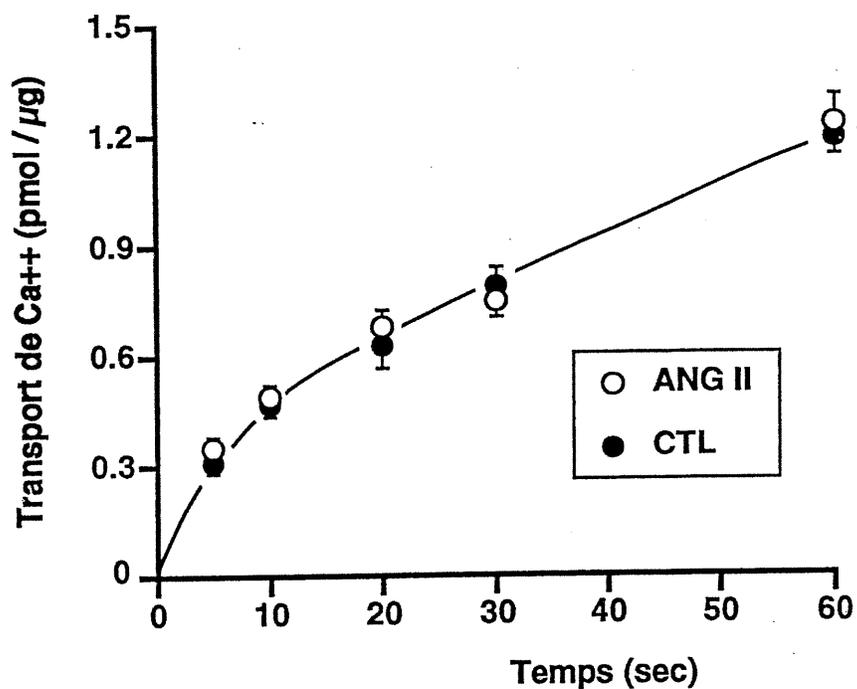


Figure 11. Effet direct de l'ANGII intravésiculaire sur le  $\text{TCa}^{2+}$  par les membranes lumineuses de PT en fonction du temps. Les vésicules membranaires ont été incubés avec 0mM de NaCl, 0.5 mM de  $\text{CaCl}_2$  et  $10^{-12}\text{M}$  d'ANGII. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  ES ( $n=3$ ).

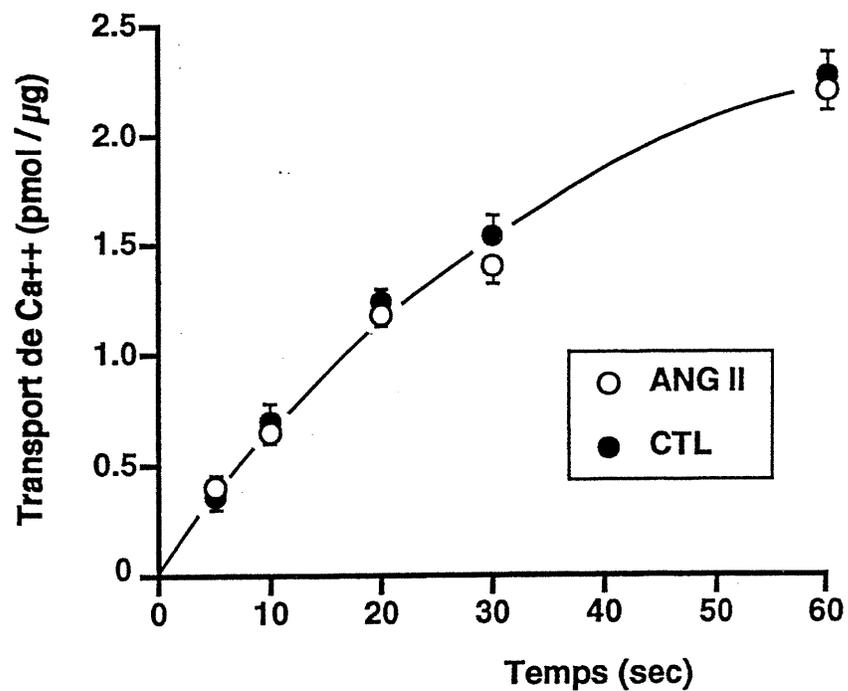


Figure 12. Effet direct de l'ANGII extravésiculaire sur le  $\text{TCa}^{2+}$  par les membranes lumineales de DT en fonction du temps. Les vésicules membranaires ont été incubés avec 0mM de NaCl, 0.5 mM de  $\text{CaCl}_2$  et  $10^{-12}\text{M}$  d'ANGII. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  ES ( $n=3$ ).

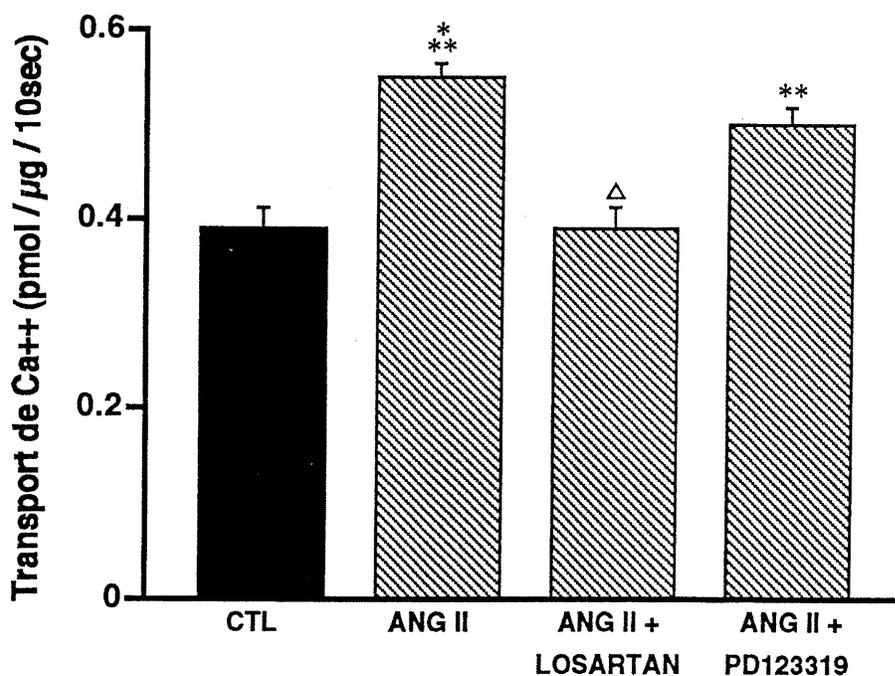


Figure 13. Effet de l'ANGII sur le  $\text{TCa}^{2+}$  par les membranes lumineales de PT en absence et en présence de bloqueurs de récepteurs  $\text{AT}_1$  et  $\text{AT}_2$ . Les tubules ont été préincubés 10 min à  $37^\circ\text{C}$  en absence et en présence de  $10^{-12}\text{M}$  d'ANGII, puis en combinaison avec  $10^{-6}\text{M}$  de losartan et  $10^{-6}\text{M}$  de PD123319, des inhibiteurs des récepteurs  $\text{AT}_1$  et  $\text{AT}_2$  respectivement. Le milieu d'incubation vésiculaire contenait 0mM de NaCl et 0.5mM de  $\text{CaCl}_2$ . Chaque colonne représente la moyenne  $\pm$  ES ( $n=3$ ) ; \*\*  $P < 0.02$ , \*\*  $P < 0.01$ , par rapport au contrôle,  $\Delta$   $P < 0.05$  par rapport à l'ANGII seul, pas de signifiacnce entre ANGII+PD123319 et ANGII seul.

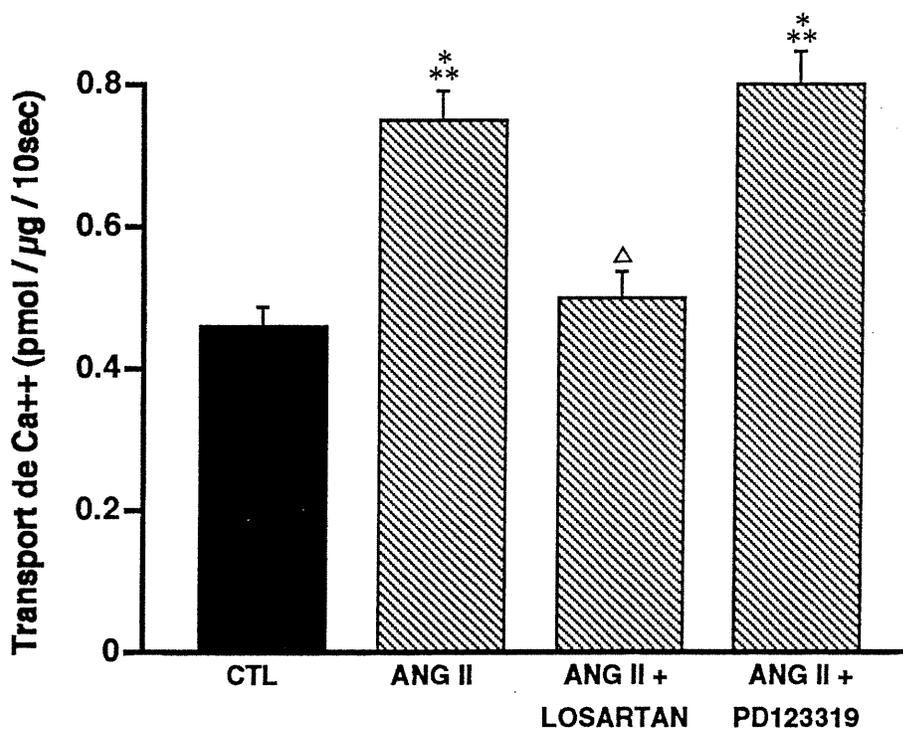


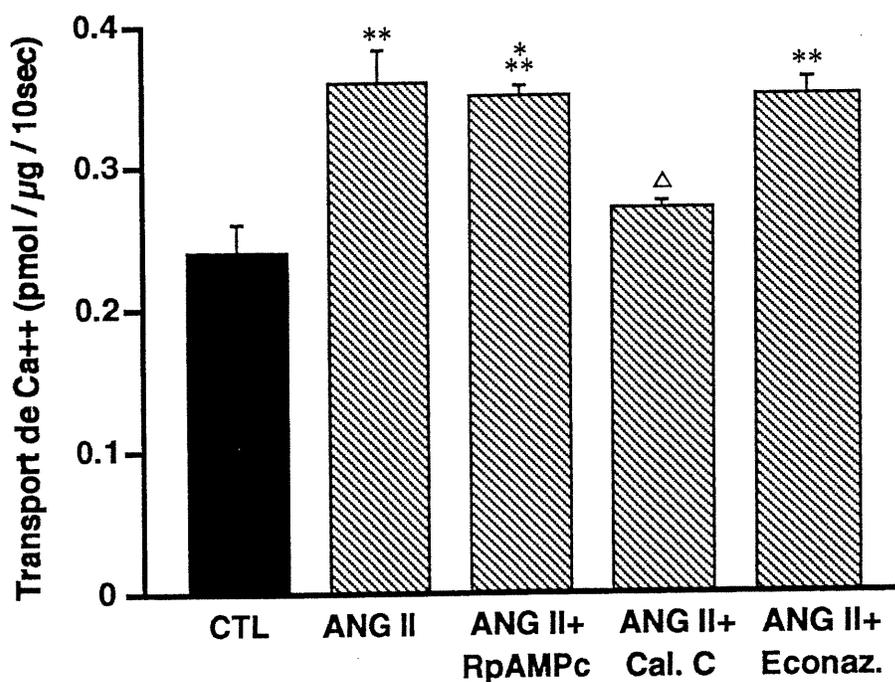
Figure 14. Effet de l'ANGII sur le  $\text{TCa}^{2+}$  par les membranes lumineales de DT en absence et en présence de bloqueurs de récepteurs  $\text{AT}_1$  et  $\text{AT}_2$ . Les tubules ont été préincubés 10 min à  $37^\circ\text{C}$  en absence et en présence de  $10^{-12}\text{M}$  d'ANGII, puis en combinaison avec  $10^{-6}\text{M}$  de losartan et  $10^{-6}\text{M}$  de PD123319, des inhibiteurs des récepteurs  $\text{AT}_1$  et  $\text{AT}_2$  respectivement. Le milieu d'incubation vésiculaire contenait  $0\text{mM}$  de  $\text{NaCl}$  et  $0.5\text{mM}$  de  $\text{CaCl}_2$ . Chaque colonne représente la moyenne  $\pm$  ES ( $n=3$ ) ; \*\*  $P < 0.01$ , par rapport au contrôle,  $\Delta$   $P < 0.05$  par rapport à l'ANGII seul, pas de signifiante entre ANGII+PD123319 et ANGII seul.

vésicules de membranes lumineales a ensuite été mesuré et les résultats sont présentés à la **figure 15** pour les membranes issues du PT et à la **figure 16** pour le DT.

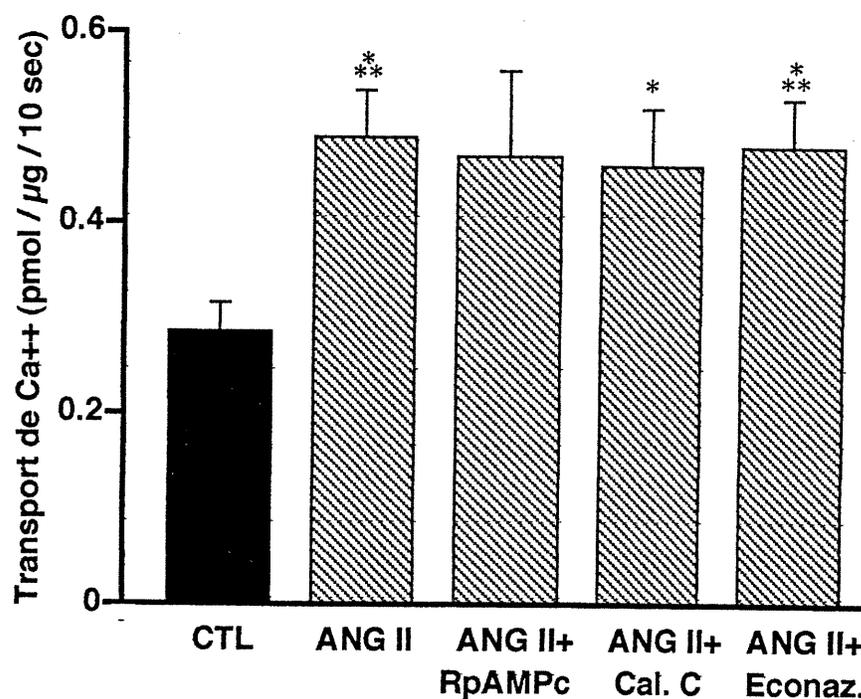
Dans le PT, comme la valeur du  $\text{TCa}^{2+}$  contrôle était de  $0.24 \pm 0.02$  et celle avec ANGII de  $0.35 \pm 0.02$ , on remarque qu'une inhibition de la PKC par  $10^{-7}\text{M}$  de calphostin C abolie complètement l'effet de l'ANGII car la valeur du  $\text{TCa}^{2+}$  avec calphostin C est au niveau du contrôle, soit  $0.27 \pm 0.00$  pmol/ $\mu\text{g}/10\text{s}$ . Cependant, l'inhibition de l'AMPc par  $10^{-4}\text{M}$  de RpAMPc et l'inhibition de la phospholipase A par  $10^{-5}\text{M}$  d'econazole ne prévenaient pas l'effet de l'ANGII. La stimulation du  $\text{TCa}^{2+}$  était en effet toujours significatif à  $0.35 \pm 0.02$  et  $0.35 \pm 0.012$  pmol/ $\mu\text{g}/10\text{s}$  respectivement. Dans le DT, des résultats différents furent observés. En effet, dans les mêmes conditions que dans le PT, le calphostin C et l'éconazole ne préviennent pas l'effet de l'ANGII. Ensuite, bien qu'il n'y ait pas d'effet significatif de l'ANGII vis-à-vis le contrôle lorsque les tubules ont été prétraités avec RpAMP, on ne peut pas conclure définitivement que cet agent bloque l'effet de l'ANGII, l'écart type de cette valeur étant passablement élevée. Le  $\text{TCa}^{2+}$  par les membranes non traitées était de  $0.29 \pm 0.03$ , alors que les membranes traitées avec l'ANGII seule et en combinaison avec le RpAMPc, le calphostin C et l'econazole étaient respectivement de  $0.49 \pm 0.05$ ,  $0.47 \pm 0.09$ ,  $0.46 \pm 0.06$  et  $0.48 \pm 0.05$  pmol/ $\mu\text{g}/10\text{s}$ .

### **III.11 Effet de l'ANGII et de la PTH sur le $\text{TCa}^{2+}$ par les membranes lumineales de DT**

La PTH est une hormone importante dans la régulation de la réabsorption de calcium par la membrane luminale du DT. Il a été démontré que la PTH stimulait, comme l'ANGII, les canaux calciques à haute affinité. Afin de résoudre si l'ANGII et la PTH agissent sur un site commun, nous avons donc conduit une série d'expériences dans lesquelles la suspension de DT était incubée avec l'ANGII seul, la PTH seul et une combinaison des deux hormones. Comme prévu, chacune des hormones,  $10^{-12}\text{M}$  d'ANGII et  $10^{-7}\text{M}$  de PTH, stimulait significativement le  $\text{TCa}^{2+}$  par rapport au contrôle celui-ci passant de  $0.49 \pm 0.018$  à  $0.61 \pm 0.01$  et  $0.71 \pm 0.034$  pmol/ $\mu\text{g}/10\text{s}$  respectivement. Cependant, lorsque les tubules étaient incubés en présence des deux hormones, l'effet ne correspondait pas à la somme des deux effets, la valeur du  $\text{TCa}^{2+}$  étant de  $0.71 \pm 0.032$  pmol/ $\mu\text{g}/10\text{s}$  (**Figure 17**).



**Figure 15. Effet des bloqueurs de messagers RpAMPc, calphostin C et econazole en combinaison avec l'ANGII sur le  $TCa^{2+}$  par les membranes lumineales de PT.** Les tubules ont été préincubés en absence et en présence de  $10^{-12}M$  d'ANGII 10 min à  $37^{\circ}C$ , ainsi qu'en combinaison avec  $10^{-4}M$  de RpAMPc,  $10^{-7}M$  de calphostin C (Cal. C) puis,  $10^{-5}M$  d'econazole (Econaz.) qui ont été incubés 30 secondes, 10 min et 2 min respectivement. Le milieu d'incubation vésiculaire contenait  $0mM$  de NaCl et  $0.5mM$  de  $CaCl_2$ . Chaque colonne représente la moyenne  $\pm$  ES ( $n=3$ ) ; \*\*  $P < 0.02$ , \*  $P < 0.01$ , par rapport au contrôle,  $\Delta$   $P < 0.05$  par rapport à l'ANGII seul.



**Figure 16. Effet des bloqueurs de messagers RpAMPc, calphostin C et econazole en combinaison avec l'ANGII sur le  $TCa^{2+}$  par les membranes lumineales de DT.** Les tubules ont été préincubés en absence et en présence de  $10^{-12}M$  d'ANGII 10 min à  $37^{\circ}C$ , ainsi qu'en combinaison avec  $10^{-4}M$  de RpAMPc,  $10^{-7}M$  de calphostin C (Cal. C), puis  $10^{-5}M$  d'econazole (Econaz.) qui ont été incubés 30 secondes, 10 min et 2 min respectivement. Le milieu d'incubation vésiculaire contenait  $0mM$  de NaCl et  $0.5mM$  de  $CaCl_2$ . Chaque colonne représente la moyenne  $\pm$  ES ( $n=3$ ) ; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , par rapport au contrôle.

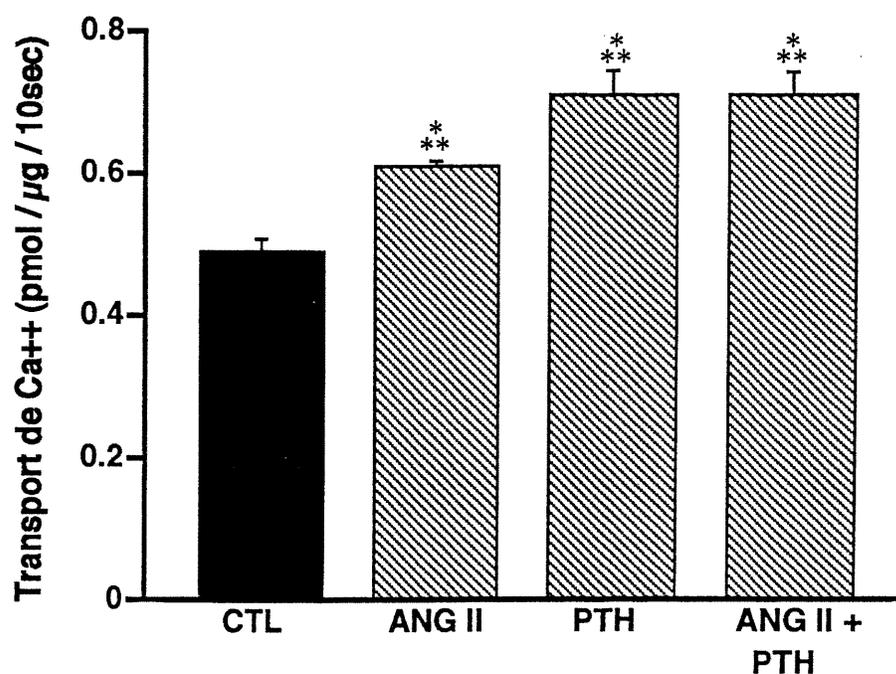


Figure 17. Effet de l'ANGII, de la PTH et de la combinaison des deux hormones sur le  $\text{TCa}^{2+}$  par les membranes lumineales de DT. Les tubules ont été préincubés en absence et en présence de :  $10^{-12}\text{M}$  d'ANGII,  $10^{-7}\text{M}$  de PTH ou une combinaison des deux hormones pendant 10 min à  $37^{\circ}\text{C}$ . Le milieu d'incubation vésiculaire contenait  $0\text{mM}$  de NaCl et  $0.5\text{mM}$  de  $\text{CaCl}_2$ . Chaque colonne représente la moyenne  $\pm$  ES ( $n=3$ ) ; \*\*  $P < 0.01$ , par rapport au contrôle.

## **IV. DISCUSSION**

### **IV.1 La pureté des préparations membranaires**

La validité des expériences qui ont été réalisées afin d'atteindre le but du projet dépend en grande partie de la pureté de nos membranes lumineales. Les suspensions tubulaires et les suspensions de vésicules membranaires ont donc été soumises à des dosages enzymatiques afin de vérifier leur pureté. La forte activité enzymatique en phosphatase alcaline des vésicules de membranes lumineales proximales, par rapport à l'activité mesurée sur les tubules complets, montre que nos préparations sont effectivement enrichies en membranes lumineales proximales. De même, la faible activité en  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase de ces mêmes préparations, nous indique que la contamination en membranes basolatérales est très faible. Dans le DT, malgré qu'on ne devrait pas retrouver d'activité de phosphatase alcaline et de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase dans nos préparations membrane lumineales, les résultats nous indiquent qu'il y a une légère contamination. Cependant, bien que nos préparations membranaires ne soient pas complètement pures, notre laboratoire a toujours trouvé des actions différentes et cohérentes pour un même traitement sur des membranes lumineales de PT et DT ayant été isolées selon la technique utilisée ici. Finalement, bien qu'aucune expérience n'ait été réalisée afin de vérifier si les préparations membranaires étaient contaminées par des membranes d'organelles intracellulaires, notre laboratoire a déjà montré, à l'aide de marqueurs enzymatiques spécifiques, que les membranes isolées par les mêmes techniques en étaient à peu près dépourvues.

### **IV.2 La technique de transport de calcium par les membranes lumineales**

Le  $\text{TCa}^{2+}$  par les vésicules de membranes lumineales durant les 10 premières secondes est linéaire et par conséquent idéal pour comparer l'état de perméabilité au calcium des vésicules de membranes selon leur traitement. Avec le temps, le transport de calcium devient saturé et les courbes de  $\text{TCa}^{2+}$  par les membranes traitées et non

traitées se rejoignent car la distribution de la taille des vésicules est similaire entre les deux préparations. Cette observation est importante car elle permet de vérifier que les vésicules ont des tailles relativement uniformes d'une expérience à l'autre et que la différence de  $\text{TCa}^{2+}$  observée entre les membranes contrôles et traitées n'est pas due à une différence de taille des vésicules ou de liaison non spécifique. Par ailleurs, malgré un rinçage des vésicules avec un tampon d'arrêt froid contenant un chélateur de calcium (EGTA), une certaine quantité de calcium peut se lier de façon non spécifique sur les vésicules. Afin de minimiser cet effet, la valeur obtenue après un transport à temps zéro est toujours soustraite de la valeur du transport.

### **IV.3 Effet tubulaire de l'angiotensine II sur le transport de calcium**

Les résultats nous montrent une stimulation significative du  $\text{TCa}^{2+}$  par les membranes lumineuses de PT et DT lorsque les tubules ont été traités pendant 10 min avec  $10^{-12}\text{M}$  d'ANGII. Des travaux, portant sur le système rénine-angiotensine local dans le rein et sur la concentration physiologique d'ANGII au niveau de la lumière tubulaire et qui ont été résumés dans l'introduction, estiment la concentration d'ANGII dans la lumière proximale à environ  $10^{-11}\text{M}$  (Braam et al. 1993) et probablement un peu moins ( $10^{-12}\text{M}$  à  $10^{-13}\text{M}$ ) (Navar et al. 1997) dans la lumière distale. La concentration à laquelle l'effet maximal de l'ANGII sur le  $\text{TCa}^{2+}$  a été mesurée correspond donc environ à la concentration d'ANGII physiologique.

Cependant, une importante question demeure. Pourquoi lorsque la concentration d'ANGII augmente, l'effet sur le  $\text{TCa}^{2+}$  par les membranes lumineuses de PT s'estompe? Les données concernant le  $\text{TNa}^+$  avaient mené à la même réflexion et maintenant, il est connu que l'ANGII active différentes voies dans le proximal selon sa concentration entraînant ainsi une stimulation de  $\text{TNa}^+$  à de faibles concentrations d'ANGII (Douglas et al. 1990, Woodcock et al. 1991) et une inhibition du  $\text{TNa}^+$  à de fortes concentrations (Karim et al. 1995). Donc, l'ANGII stimule à la fois le transport de calcium et de sodium dans le PT à de faibles concentrations (de l'ordre de  $10^{-12}\text{M}$ ) par contre, à des concentrations supérieures (de l'ordre de  $10^{-9}\text{M}$ ), l'effet

de l'ANGII est différent pour le calcium et le sodium car nos résultats montrent une perte de l'effet sur le  $\text{TCa}^{2+}$  alors que Harris et Young (1977) et d'autres, avaient rapporté une inhibition du  $\text{TNa}^{2+}$ . L'activation de différents messagers selon la concentration d'ANGII pourrait expliquer les résultats sur le transport de calcium. De plus, le mécanisme d'internalisation rapide des récepteurs AT1 suite à la liaison d'agoniste d'ANGII tel que décrit par Hunyady (1999) pourrait également expliquer la perte d'effet suite à la stimulation par de fortes concentrations d'ANGII.

Ensuite, une autre question nous vient spontanément à l'esprit. Pourquoi l'ANGII, qui agit principalement sur la régulation de la tension artérielle et sur la régulation de l'excrétion du sodium aurait un effet sur la réabsorption de calcium par le rein? Romero et al. (1991) avait suggéré une hypothèse selon laquelle de fortes concentrations d'ANGII stimulerait l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans les cellules tubulaires ayant comme conséquence une diminution du  $\text{TNa}^+$ . Cette hypothèse voulait expliquer l'effet négatif de l'ANGII sur le transport de  $\text{Na}^+$  à de fortes concentrations. Cependant, non seulement cette hypothèse n'a jamais été vérifiée, mais selon nos résultats, le  $\text{TCa}^{2+}$  est plutôt influencé par de faibles concentrations d'ANGII, les fortes concentrations n'ayant aucun effet.

#### **IV.4 Effet de l'angiotensine II sur la composante de forte affinité dans le DT**

Notre laboratoire a déjà rapporté une double cinétique du  $\text{TCa}^{2+}$  dans le DT (Brunette et al. 1992). Une première de faible affinité avec un  $K_m$  sensible à la calcitonine (Zuo et al. 1997), aux thiazides (Lajeunesse et al. 1991) et au pH (Brunette et al. 1991) et une seconde de forte affinité avec un  $V_{max}$  sensible à la PTH (Bouthiauy et al. 1991) et à la calbindin  $D_{28k}$  (Bouthiauy et al. 1994). Nos résultats montrent que l'ANGII stimule les canaux calciques de forte affinité, c'est-à-dire, les canaux sensibles à la PTH et à la calbindin  $D_{28k}$ . L'absence d'additivité de la PTH et de l'ANGII sur le  $\text{TCa}^{2+}$  (figure 17) supporte cette hypothèse. Depuis la réalisation des travaux présentés ici, notre laboratoire a confirmé une fois de plus ces résultats. En effet, il a été montré que  $10\mu\text{M}$  de nitrendipine, un bloqueur de canaux calciques de

type L qui inhibe la composante de faible affinité, n'empêchait pas l'ANGII d'exercer son effet sur le  $\text{TCa}^{2+}$  (Charbonneau et al. 2001).

#### **IV.5 Mécanisme par lequel l'angiotensine II stimule le transport de calcium par les membranes lumineales de PT et DT**

En plus de considérer l'effet de l'ANGII sur le  $\text{TCa}^{2+}$  par les membranes lumineales, nos expériences avaient aussi pour but de clarifier le mécanisme par lequel se produisait cet effet. Le premier aspect à la base de l'initiation de la réponse hormonal, concerne la fixation de l'hormone sur son récepteur. Nos résultats montrent que le losartan empêche l'effet de l'ANGII dans le PT et DT (figures 13 et 14). Il est alors évident que c'est la fixation de l'ANGII sur le récepteur  $\text{AT}_1$  qui est responsable de l'effet dans les deux segments à l'étude, d'autant plus que le PD123319 n'a aucun effet. Ce résultat n'a rien d'étonnant étant donné la présence du récepteur  $\text{AT}_1$  tout le long du néphron et particulièrement au niveau de la membrane lumineale et que la majorité des effets biologiques chez les adultes passent par  $\text{AT}_1$ . Aussi, ce résultat à lui seul confirme que le  $\text{TCa}^{2+}$  est bel et bien affecté par la réponse hormonale et n'est pas seulement dû à des erreurs techniques ou au hasard.

Ensuite, un aspect surprenant est la rapidité à laquelle l'ANGII exerce son effet. Une incubation de 10 minutes de l'hormone avec les PT et 5 minutes avec les DT suffit à atteindre une stimulation significative. Il est clair que l'effet observé ne fait pas intervenir la synthèse de nouveaux canaux. De plus, comme le  $K_m$  est inchangé et que le  $V_{\max}$  est stimulé, une hypothèse possible est une insertion de canaux déjà synthétisés à la membrane lumineale.

Ensuite, la présence de récepteurs à la face apicale nous a fait réfléchir sur la possibilité d'un effet direct de l'ANGII dont la concentration tubulaire est élevée, un effet qui serait indépendant de la réponse cellulaire. Comme nous venons de discuter, l'ANGII, en influençant le  $V_{\max}$  d'un tel transport, supporte l'hypothèse d'une influence sur la densité de récepteurs fonctionnels, probablement par un mécanisme d'endo/exocytose ou encore par un mécanisme de phosphorylation. D'ailleurs

l'absence d'effet direct de l'ANGII a été confirmée par les expériences portant sur l'effet direct de l'ANGII soit intra ou extravésiculaire (figures 11 et 12 et données non montrées).

Il a été montré qu'à des concentrations de l'ordre de  $10^{-12}$ M à  $10^{-9}$ M, l'ANGII inhibe la production d'AMPC par les cellules épithéliales proximales (Liu et al. 1989, Woodcock et al. 1991) et stimule la PKC (Karim et al. 1995) alors qu'à des concentrations supérieures à  $10^{-9}$ M, l'hormone active plutôt la phospholipase A (Douglas et al. 1990). L'activation de ces messagers selon la concentration est reliée à la stimulation et à l'inhibition de  $\text{TNa}^+$  respectivement. D'un autre côté, en ce qui concerne l'effet sur le  $\text{TCa}^{2+}$ , l'inhibition de l'AMPC par l'ANGII dans le proximal ne peut expliquer l'effet de stimulation que nous avons observé. En effet, notre laboratoire a déjà démontré que l'AMPC n'influçait pas le  $\text{TCa}^{2+}$  par les membranes lumineales de PT (Hilal et al. 1997). D'ailleurs, l'inhibition de la voie de l'AMPC par le RpAMPC n'a pas empêché l'effet de l'ANGII, confirmant que l'AMPC ne serait pas impliqué. De plus, la phospholipase A, qui semble par ailleurs activée par de plus fortes concentrations que celles utilisées dans nos expériences, ne serait pas non plus responsable de l'effet de  $10^{-12}$ M d'ANGII, car l'econazole n'a pas empêché cet effet. Nos résultats supportent par contre l'implication de la PKC dans l'effet de l'ANGII sur le  $\text{TCa}^{2+}$  par le PT, car le calphostin C inhibe totalement la stimulation du  $\text{TCa}^{2+}$ . Le rôle de la PKC par l'ANGII avait d'ailleurs déjà été reliée à la stimulation de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  dans le PT (Karim et al. 1995).

Le mécanisme d'action intracellulaire de l'ANGII sur le  $\text{TCa}^{2+}$  dans le DT est plus obscur. En effet, les résultats préliminaires présentés à la figure 16 (n=3) ne permettent pas de clairement établir le mécanisme d'action responsable de l'effet de l'ANGII. On remarque que la signifiante de l'effet de l'ANGII est perdue lorsque les tubules sont traités avec RpAMPC et malgré que l'effet soit minime, ce résultat pourrait signifier que l'ANGII agit via la voie AMPC dépendante. D'ailleurs, des travaux antérieurs de notre laboratoire ont montré qu'une concentration de 1mM de dbcAMP stimulait le  $\text{TCa}^{2+}$  par les membranes lumineales de DT (Hilal et al. 1997). Pour déterminer si la voie de la PKA est déterminante dans l'effet de l'ANGII dans

ce segment, il faudrait répéter l'expérience avec le RpAMPC afin de diminuer l'écart-type et ainsi obtenir un effet plus franc ou encore doser l'AMPC produite suite à la liaison de l'ANGII. Toutefois, serait surprenant car l'ANGII dans le rein est couplé à la protéine  $G_i$ , entraînant une baisse de la concentration intracellulaire d'AMPC (Ardaillou 1999 [revue]).

Donc, nos résultats montrent que l'ANGII stimule le  $TCa^{2+}$  aussi bien dans le DT que dans le PT à des concentrations similaires. Cependant, il semble que le mécanisme intracellulaire soit différent car, l'inhibiteur de la PKC empêche l'effet dans le PT mais pas dans le DT. Il est possible que des isoformes différents de la PKC soient exprimés dans le PT et le DT et que l'isoforme du PT, activé par l'ANGII soit responsable de la stimulation du  $TCa^{2+}$ . Par exemple, il a été montré dans le PT que l'ANGII stimulait la translocation des isoformes  $\epsilon$  et  $\kappa$  de la PKC à la membrane, ce qui était associée à une stimulation de l'échangeur  $Na^+/H^+$  (Karim et al. 1995). Dans le muscle lisse, c'est l'isoforme  $\alpha$  de la PKC qui est transloqué suite à la stimulation par l'ANGII et l'effet produit est une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium (Assender et al. 1997). Dans le DT, contrairement à la PTH, l'effet de l'ANGII sur la PKC n'a pas été établi. Dans le cas de la PTH, Friedman et al. (1996) ont montré que la stimulation du  $TCa^{2+}$  médiée par la PTH nécessitait l'activation simultanée de la PKA et de la PKC. Ce résultat concorde d'ailleurs avec les observations de Hilal et al. (1995) utilisant des vésicules de membranes de DT. Lajeunesse et al. (1994) avaient d'ailleurs montré avec la même technique, que le  $TCa^{2+}$  par les vésicules de membranes lumineales de tubules distaux de reins de lapins traitées avec la PTH était supérieur au  $TCa^{2+}$  contrôle. Étant donné l'interaction fine de ces deux voies dans le  $TCa^{2+}$  par le DT et toujours dans le but de déterminer le mécanisme d'action intracellulaire de l'ANGII dans le DT, notre laboratoire a conduit une série d'expériences en associant les inhibiteurs de la PKA et de la PKC, le RpAMPC et le calphostin C respectivement. Cette combinaison d'inhibiteurs n'a pas empêché l'effet de l'ANGII (Charbonneau et al. 2001). Récemment, Friedman et al. (1999) ont précisé que l'effet de la stimulation du  $TCa^{2+}$  par la PTH dans le DT était médié par la PKC indépendante de la  $PLC\beta$ . La PKC étant probablement activé par

la phospholipase D (PLD), une voie alternative de la stimulation de la PKC démontré par Nishizuka (1995).

De tels résultats nous montrent que les messagers recrutés par les hormones qui agissent sur le transport d'électrolytes dans les tubules rénaux sont variés et qu'ils interagissent de façon complexe. De plus, nous avons vu qu'ils peuvent varier d'un segment de néphron à l'autre et selon la concentration d'hormone. Finalement, la caractérisation des voies de signalisation impliquées dans la stimulation de  $\text{TCa}^{2+}$  par l'ANGII nécessitera d'autres expériences. Dans le DT, parmi les messagers et enzymes possibles, mentionnons les différents isoformes de phospholipase et de protéine kinases, les tyrosines kinases, le cytochrome p450 et l'époxygénase. Aussi, le dosage de seconds messagers comme l'AMPC et le DAG dans les PT et DT suite à la stimulation à l'ANGII pourrait mettre en évidence les messagers impliqués dans chacun de ces segments.

## V. CONCLUSION

L'étude présentée ici voulait investiguer l'effet de l'ANGII sur le transport de calcium par les membranes lumineales des tubules proximaux et distaux. Dans les deux sites, l'ANGII entraîne un effet stimulant sur le transport de calcium après seulement 10 minutes d'incubation des tubules et la courbe dose-réponse montre une allure en forme de cloche avec un effet maximal à une concentration de  $10^{-12}$ M. Dans le tube distal, la présence de 100mM de NaCl dans le milieu d'incubation diminue le transport de  $\text{Ca}^{2+}$  mais n'empêche pas l'effet de l'ANGII.

L'hormone augmente le  $V_{\text{max}}$  dans le PT et le  $V_{\text{max}}$  de la composante à haute affinité dans le DT, sans changer le  $K_m$  dans les deux cas. L'ajout de  $10^{-6}$ M de losartan dans le milieu d'incubation tubulaire de PT et DT empêche l'effet de l'hormone. L'inhibition de la voie de la PKC empêche aussi l'effet de l'hormone dans le PT mais pas dans le DT.

Finalement, la PTH, comme l'ANGII, stimule le transport de calcium, mais les effets des deux hormones ne sont pas additifs, suggérant qu'elles agiraient sur la même molécule de transport, c'est-à-dire le canal calcique de haute affinité.

## VI. RÉFÉRENCES

Abhold RH, Harding JW (1988) Metabolism of angiotensin II and III by membrane bound peptides from rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* ; 245, 171-179.

Aguilera G, Kapur S, Feuillean P, Sunar Akbasak B, Bathia AJ (1994) Developmental changes in angiotensin II receptor subtypes and AT1 receptor mRNA in rat kidney. *Kidney Int* ; 46, 973-979.

Ardailou R, Chansel D, Chatziantoniou C, Dussaule JC (1999) Mesangial AT<sub>1</sub> receptors: expression, signaling, and regulation. *J Am Soc Nephrol* ; 10, S40-S46.

Assender JW, Irenius E, Fredholm BB (1997) 5-Hydroxytryptamine, angiotensin and bradykinin transiently increase intracellular calcium concentrations and PKC- $\alpha$  activity, but do not induce mitogenesis in human vascular smooth muscle cells. *Acta Physiol Scand* ; 160, 207-217.

Beaufils M, Sraer J, Lepreux C (1976) Angiotensin II binding to renal glomeruli from sodium-loaded and sodium-depleted rats. *Am J Physiol* ; 230, 1187-1193.

Beierwaltes WH (1997) Macula densa stimulation of renin is reversed by selective inhibition of neuronal nitric oxide synthase. *Am J Physiol* ; 272, R1359-R1364.

Bellucci A, Wilkes BM (1984) Mechanism of sodium modulation of glomerular angiotensin receptors in the rat. *J Clin Invest* ; 74, 1593-1600.

Berk BC (1999) Angiotensin II signal transduction in vascular smooth muscle: pathways activated by specific tyrosine kinases. *J Am Soc Nephrol* ; 10, S62-S68.

Blaine EH, Davis JO, Prewitt RL (1971) Evidence for a renal vascular receptor in control of renin secretion. *Am J Physiol* ; 220, 1593-1597.

Bleich HL, Moore MJ, Lemann J Jr, Adams ND, Gray RW (1979) Urinary calcium excretion in human beings. *N Engl J Med* ; 301, 535-541.

Borke JL, Minami J, Verma A, Penniston JT, Kumar R. Monoclonal antibodies to human erythrocyte membrane CA<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup> adenosine triphosphatase pump recognize an epitope in the basolateral membrane of human kidney distal tubule cells. *J Clin Invest* ; 80, 1225-1231.

Bouhtiauy I, Lajeunesse D, Brunette MG (1991) The mechanism of parathyroid hormone action on calcium reabsorption by the distal tubule. *Endocrinology* ; 128, 251-258.

Bouhtiauy I, Lajeunesse D, Christakos S, Brunette MG (1994) Two vitamin D<sub>3</sub>-dependent calcium binding proteins increase calcium reabsorption by different mechanisms. I. Effect of CaBP 28K. *Kidney Int* ; 45, 461-468.

- Bouhtiauy I, Lajeunesse D, Christakos S, Brunette MG (1994) Two vitamin D3-dependent calcium binding proteins increase calcium reabsorption by different mechanisms. II. Effect of CaBP 9K. *Kidney Int* ; 45, 469-474.
- Bourdeau JE, Burg MB (1979) Voltage dependence of calcium transport in the thick ascending limb of Henle's loop. *Am J Physiol* ; 236, F357-F364.
- Bourdeau JE, Hellstrom-Stein RJ (1982) Voltage-dependent calcium movement across the cortical collecting duct. *Am J Physiol* ; 242, F285-F292.
- Braam B, Mitchell KD, Fox J, Navar LG (1993) Proximal tubular secretion of angiotensin II in rats. *Am J Physiol* ; 264, F891-F898.
- Brenner BM, King AJ, Ingelfinger JR, Gunning ME (1996) Vasoactive peptides and the kidney. *Brenner BM, The Kidney, 5<sup>th</sup> edition* ; Chapter 16.
- Brown GP, Douglas JG (1982) Angiotensin II binding sites on isolated rat renal brush border membranes. *Endocrinology* ; 111, 1830-1838.
- Brown GP, Douglas JG (1983) Angiotensin II-binding sites in rat and primate isolated renal tubular basolateral membranes. *Endocrinology* ; 112, 2007-2014.
- Brunette MG, Chabardes D, Imbert-Teboul M, Clique A, Montegut M, Morel F (1979) Hormone-sensitive adenylate cyclase along the nephron of genetically hypophosphatemic mice. *Kidney Int* ; 15, 357-369.
- Brunette MG, Mailloux J, Lajeunesse D (1992a) Calcium transport through the luminal membrane of the distal tubule. I. Interrelationship with sodium. *Kidney Int* ; 41, 281-288.
- Brunette MG, Mailloux J, Lajeunesse D (1992b) Calcium transport by the luminal membrane of distal tubule: II. Effect of pH, electrical potential and calcium channel inhibitors. *Kidney International* ; 41, 289-296.
- Burg MB, Orloff J (1968) Control of fluid absorption in the renal proximal tubule. *J Clin Invest* ; 47, 2016-2024.
- Burson JM, Aguilera G, Gross KW, Sigmund CD (1994) Differential expression of angiotensin receptor 1<sub>A</sub> and 1<sub>B</sub> in mouse. *Am J Physiol* ; 276, E260-E267.
- Caldwell PTN, Seegal BC, Hsu KC, Das M, Soffer RL (1976) Angiotensin-converting enzyme: vascular endothelial localization. *Science Wash DC* ; 191, 1050-1051.
- Campbell DJ (1987) Circulating and tissue angiotensin systems. *J Clin Invest* ; 79(1), 1-6.
- Capponi AM (1996) Distribution and signal transduction of angiotensin II AT1 and AT2. *Blood Pressure* ; 2, 41-46.

Charbonneau A, Leclerc M, Brunette MG (2001) Effect of angiotensin II on calcium reabsorption by the luminal membranes of the nephron. *Am J Physiol Endocrinol Metab* ; 280, E928-E936.

Cheng HF, Becker BN, Burns KD, Harris RC (1995) Angiotensin II upregulates type-1 angiotensin II receptor in renal proximal tubule. *J Clin Invest* ; 95, 2012-2019.

Chiu AT, Herblin WF, McCall DE, Ardecky RJ, Carini DJ, Duncia JV, Pease LJ, Wong PC, Wexler RR, Johnson AL (1989) Identification of angiotensin II receptor subtypes. *Biochem Biophys Res Commun* ; 165, 196-203.

Coppola S, Fromter E (1994) An electrophysiological study of angiotensin II regulation of Na-HCO<sub>3</sub> cotransport and K conductance in renal proximal tubule. I. Effect of picomolar concentrations. *Pflügers Archiv* ; 427, 143-150.

Costanzo LS, Windhager EE (1978) Calcium and sodium transport by the distal convoluted tubule of the rat. *Am J Physiol* ; 235, F492-506.

Costanzo LS, Windhager EE (1980) Effects of PTH, ADH, and cyclic AMP on distal tubular Ca and Na reabsorption. *Am J Physiol* ; 239, F478-F485.

de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T (2000) International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* ; 52, 415-472.

Dominguez JH, Snowdowne KW, Freudenrich CC, Brown T, Borle AB (1987) Intracellular messenger for action of angiotensin II on fluid transport in rabbit proximal tubule. *Am J Physiol* ; 252, F423-F428.

Doucet A, Katz AI (1982) High affinity Ca-Mg-ATPase along the rabbit nephron. *Am J Physiol* ; 242, F346-F352.

Douglas JG (1987a) Angiotensin receptor subtypes of the kidney cortex. *Am J Physiol* ; 253, F1-F7.

Douglas JG (1987b) Corticosteroids decrease glomerular angiotensin receptors. *Am J Physiol* ; 252, F453-F457.

Douglas JG (1987c) Estrogen effects on angiotensin receptors are modulated by the pituitary in female rats. *Am J Physiol* ; 252, E57-E62.

Douglas JG, Romero M, Hopfer U (1990) Signaling mechanisms coupled to the angiotensin receptors of proximal tubule epithelium. *Kidney Int* 38, S43-S47.

Dzau VJ, Ellison KE, Brody T, Ingelfinger J, Pratt RE (1987) A comparative study of the distribution of renin and angiotensinogen messenger ribonucleic acids in rat and mouse tissues. *Endocrinology* ; 120, 2334-2338.

Dzau VJ, Re RN (1987) Evidence for the existence of renin in the heart. *Circulation* ; 75, I134-I136.

Dzau VJ, Burt D, Pratt RE (1988) Molecular biology of the renin-angiotensin system. *Am J Physiol* ; 255, F563-F569.

Ehler MRW, Riordan JF (1989) Angiotensin-converting enzyme: New concepts concerning its biological role. *Biochemistry* ; 28, 5311-5318.

Elalouf JM, Roinel N, de Rouffignac C (1983) Stimulation by human calcitonin of electrolyte transport in distal tubules of rat kidney. *Pflügers Arch* ; 399, 111-118.

Elton TS, Stephan CC, Taylor GR, Kimball MG, Martin MM, Durand JN, Oparil S (1992) Isolation of 2 distinct type-I angiotensin-II receptor genes. *Biochem Biophys Res Commun* ; 184, 1067-1073.

Erdos EG (1977) The angiotensin I converting enzyme. *Fed Proc* 36, 1760-1765.

Filipovic D, Sackin H (1991) A calcium-permeable stretch-activated cation channel in renal proximal tubule. *Am J Physiol* ; 260, F119-F129.

Friedland J, Setton C, Silverstein E (1977) Angiotensin converting enzyme: Induction by steroids in rabbit alveolar macrophages in culture. *Science* ; 197, 64-72.

Friedman PA (1988) Basal and hormone-activated calcium absorption in mouse renal thick ascending limbs. *Am J Physiol* ; 254, F62-F70.

Friedman PA, Coutermarsh BA, Kennedy SM, Gesek FA (1996) Parathyroid hormone stimulation of calcium transport is mediated by dual signaling mechanisms involving protein kinase A and protein kinase C. *Endocrinology* ; 137, 13-20.

Gallinat S, Busche S, Raizada MK, Summers C (2000) The angiotensin II type 2 receptor: an enigma with multiple variations. *Am J Physiol Endocrinol Metab* ; 278, E357-E374.

Gavras H (1999) Historical evolution of angiotensin II receptor blockers: therapeutic advantages. *J Am Soc Nephrol* ; 10, S255-S257.

Geibel J, Giebisch G, Boron WF (1990) Angiotensin II stimulates both  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange and  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  cotransport in the rabbit proximal tubule. *Proc Natl Acad Sci USA* ; 87, 7917-7920.

Genest J, Nowaczynski W, Koiw E, Sando T, Biro P (1960) Adrenocortical function in essential hypertension. *Essential Hypertension* ; 126-146.

Gertz KH (1962) Direct measurement of the transtubular flux of electrolytes and non-electrolytes in the intact rat kidney. *Proc Int Union Physiol* ; 1, 370-371.

Gesek FA, Friedman PA (1992) On the mechanism of parathyroid hormone stimulation of calcium uptake by mouse distal convoluted tubule cells. *J Clin Invest* ; 90, 749-758.

Gesek FA, Schoolwerth AC (1990) Hormonal interactions with the proximal  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger. *Am J Physiol* ; 258, F514-F521.

Gmaj P, Murer H, Kinne R (1979) Calcium ion transport across plasma membranes isolated from rat kidney cortex. *Biochem J* ; 178, 549-557.

Goldblatt M, Lynch J, Hanzal RF, Summerville WW (1934) Studies on experimental hypertension : I. The production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. *J Exp Med* ; 59, 347-379.

Gross F (1958) Renin und hypertensin : physiologische oder pathologische. *Klin Wochenschr* ; 36, 693-706.

Harris PJ (1992) Regulation of proximal tubule function by angiotensin. *Clin & Exp Pharm & Physiol* ; 19, 213-222.

Harris PJ, Young JA (1977) Dose-dependent stimulation and inhibition of proximal tubular sodium reabsorption by angiotensin II in the rat kidney. *Pflügers Arch* ; 367, 295-297

Harrison-Bernard LM, Navar LG, Ho MM, Vinson GP, El-Dahr SS (1997) Immunohistochemical localization of AngII AT<sub>1</sub> receptor in adult rat kidney using a monoclonal antibody. *Am J Physiol* ; 273, F170-F177.

He XR, Greenberg SG, Briggs JP, Schnermann JB (1995) Effect of nitric oxide on renin secretion. II. Studies in the perfused juxtaglomerular apparatus. *Am J Physiol* ; 268, F953-F959.

Hilal G, Claveau D, Zuo Q, Brunette MG (1995) Interaction of second messengers on Ca<sup>2+</sup> uptake by the renal distal luminal membranes (Abstract). *J. Am. Soc. Nephrol.* 6 ; 950.

Hilal G, Claveau D, Leclerc M, Brunette MG (1997) Ca<sup>2+</sup> transport by the luminal membrane of the distal nephron : action and interaction of protein kinases A and C. *Biochem J* ; 328, 371-375.

Hobart PM, Fogliano M, O'Connor BA, Schaefer IM, Chirgwin JM (1984) Human renin gene: structure and sequence and sequences analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* ; 81, 5026-5033.

Hoenderop JG, Vanderkemp AW, Hartog A, van de Graaf SF, van Os CH, Willems PH, Bindels RJ (1999) Molecular identification of the apical Ca<sup>2+</sup> channel in 1-25-dihydroxy vitamin D<sub>3</sub> responsive epithelia. *J Biol Chem* ; 274, 8375-8378.

Hollenberg NK (2000) Implications of species difference for clinical investigation: studies on the renin-angiotensin system. *Hypertension* ; 35, 150-154.

Houillier P, Chambrey R, Achard JM, Froissart M, Poggioli J, Paillard M (1996) Signaling pathways in the biphasic effect of angiotensin II on apical Na/H antiport activity in proximal tubule. *Kidney Int* ; 50, 1496-1505.

Hunyady L (1999) Molecular mechanisms of angiotensin II receptor internalization. *J Am Soc Nephrol* ; 10, S47-S56.

Imai M (1978) Calcium transport across the rabbit thick ascending limb of Henle's loop perfused in vitro. *Pflügers Arch* ; 374, 255-263.

Iwai N, Inagami T (1992) Identification of two subtypes in the rat type I angiotensin II receptor. *FEBS* ; 298(2-3), 257-260.

Iwao K, Fukui K, Kim S, Nkayama K, Okhubo S, Nakansishis S, Abe Y (1988) Sodium balance effects on renin angiotensinogen ant atrial natriuretiv peptide mRNA levels. *Am J Physiol* ; 255, E219-E225.

Handa RK, Krebs LT, Harding JW, Handa SE (1997) Angiotensin IV AT<sub>4</sub>-receptor system in the rat kidney. *Am J Physiol* ;264, F290-F299.

Harris RC, Breyer MD (2001) Physiological regulation of cyclooxygenase-2 in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* ; 281, F1-F11.

Jamison RL, Frey NR, Lacy FB (1974) Calcium reabsorption in the thin loop on Henle. *Am J Physiol* ; 227, 745-751.

Johnson MD, Malvin RL. (1977) Stimulation of renal sodium reabsorption by angiotensin II. *Am J Physiol* ; 232, F298-F306.

Kakinuma Y, Fogo A, Inagami T, Ichikawa I (1993) Intrarenal localization of angiotensin II type 1 receptor mRNA in the rat. *Kidney Int* ; 43, 1229-1235.

Kakuchi J, Ichiki T, Kiyama S, Hogan BL, Fogo A, Inagami T, Ichikawa I (1995) Developmental expression of renal angiotensin II receptor genes in the mouse. *Kidney Int* ; 47, 140-147.

Kaplan MR, Plotkin MD, Brown D, Hebert SC, Delpire E (1996) Expression of the mouse Na-K-2Cl cotransporter, mBSC2, in the terminal inner medullary collecting duct, the glomerular and extraglomerular mesangium, and the glomerular afferent arteriole. *J. Clin Invest* ; 98, 723-730.

Karim Z, Defontaine N, Paillard M, Poggioli J (1995) Protein kinase C isoforms in rat kidney proxiaml tubule: Acute effet of angiotensin II. *Am J Physiol* ; 269, C134-C140.

Kawashima H, Kurokawa K (1986) Metabolism and sites of action of vitamin D in the kidney. *Kidney Int* ; 29, 98-107.

Kelly MH, Hamilton JR (1970) A microtechnique for the assay of intestinal alkaline phosphatase. *Clin Biochem* ; 3, 33-43.

Khalifa S, Mills S, Hruska KA (1983) Stimulation of calcium uptake by parathyroid hormone in renal brush-border membrane vesicles. Relationship to membrane phosphorylation. *J Biol Chem* ; 258, 14400-14406.

Kumar R (1995) Calcium transport in epithelial cells of the intestine and kidney. *J Cell Biochem* ; 57, 392-398.

- Kurokawa K (1996) How is plasma calcium held constant? Milieu interieur of calcium. *Kidney Int* ;49, 1760-1764.
- Kurtz A, Wagner C (1999) Regulation of renine secretion by angiotensin II-AT1 receptors. *J Am Soc Nephrol* ; 10, S162-S168.
- Lajeunesse D, Brunette MG (1991) The hypocalciuruc effect of thiazides. Subcellular localization of the action. *Plügers Arch* ; 417, 454-462.
- Lajeunesse D, Bouhtiauy I, Brunette MG (1994) Parathyroid hormone and hydrochlorothiazide increase calcium transport by the luminal membrane of rabbit distal nephron segments through different pathways. *Endocrinology* ; 134, 35-41.
- Lassiter WE, Gottschalk CW, Mylle M (1963) Micropuncture study of renal tubular reabsorption of calcium in normal rodents. *Am J Physiol* ; 204, 771-775.
- Lau K, Quamme G, Tan S (1991) Patch-clamp evidence for a Ca channel in apical membrane of cortical thick ascending limb (cTAL) and distal tubule (DT) cells. *J Am Soc Nephrol* ; 2, 775.
- Lazarus DS, Aschoff J, Fanburg BL, Lanzillo JJ (1994) Angiotensin-converting enzyme (kininase II) mRNA production and enzymatic activity in human peripheral blood monocytes are induced by GM-CSF but not by other cytokines. *Biochem Biophys Acta* ; 1226, 1218-1226.
- Le Grimellec C, Roinel N, Morel F (1973) Simultaneous Mg, Ca, P,K,Na and Cl analysis in rat tubular fluid. I. During perfusion of either inulin or ferrocyanide. *Pflügers Arch* ; 340, 181-196.
- Lemann J, Litzow JR, Lennon EJ (1967) Studies of the mechanism by wich chronic metabolic acidosis augments urinary calcium excretion in man. *J Clin Invest* ; 46, 1318-1328.
- Leyssac PP (1986) Changes in single nephron renin release are mediated by tubular fluid flow rate. *Kidney Int* ; 30, 332-339.
- Leyssac PP (1964) The in vivo effect of angiotensin on proximal tubular reabsorption of salt in rat kidneys. *Acta Physiol Scand* ; 62, 436-448.
- Linz W, Schaper J, Wiemer G, Albus U, Scholkens BA (1992) Ramipril prevents left ventricular hypertrophy with myocardial fibrosis without blood pressure reduction. A one year study in rats. *Br J Pharmacol* ;107, 970-975.
- Liu FY, Cogan MG (1987) Angiotensin II: a potent regulator of acidification in the rat early proximal convoluted tubule. *J Clin Invest* ; 80, 272-275.
- Liu FY, Cogan MG (1989) Angiotensin II stimulates early proximal bicarbonate absorption in the rat by decreasing cyclic adenosine monophosphate. *J Clin Invest* ; 84, 83-92.

- Lo M, Liu KL, Lantelme P, Sassard J (1995) Subtype 2 of angiotensin receptors controls pressure natriuresis in rats. *J Clin Invest* ; 95, 1394-1397.
- Lowitz HD, Stumpe KO, Ochwaldt B (1969) Effect of angiotensin II on tubular sodium and water reabsorption in the rat. *Pflügers Arch* ; 307, R63-64.
- Lowry OH, Rosebrough AL, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* ; 193, 265-275.
- Mackenzie HS, Ziai F, Omer SA, Nadim MK, Taal MW (1999) Angiotensin receptor blockers in chronic renal disease: the promise of a bright clinical future. *J Am Soc Nephrol* ; 10, S283-S286.
- Magocsi M, Yamaki M, Penniston JT, Dousa TP (1992) Localization of mRNAs coding for isozymes of plasma membrane  $Ca^{2+}$ -ATPase pump in rat kidney. *Am J Physiol* ; 263, F7-F14.
- Marrero MB, Schieffer B, Paxton WG, Heerdt L, Berk BC, Delafontaine P, Bernstein KE (1995) Direct stimulation of Jak/STAT pathway by the angiotensin II AT1 receptor. *Nature* ; 375, 247-250.
- Matsunaga H, Friedman PA, Kizer N, Stanton BA (1991) Calcium channels in apical membranes of distal convoluted tubule cells. *J Am Soc Nephrol* ; 2, 627.
- McCarty NA, O'Neil RG (1990) Diglycopyridine-sensitive cell volume regulation in proximal tubule: the calcium window. *Am J Physiol* ; 259, F950-F960.
- Mendelsohn FA, Allen AM, Chai SY (1987) Overlapping distribution of receptors for atrial natriuretic peptide and angiotensin II visualized by in vitro autoradiography: Morphological basis of physiological antagonism. *Can J Physiol Pharmacol* ; 65, 1517-1521.
- Morel F, Doucet A (1986) Hormonal control of kidney functions at the cell level. *Physiol Rev* ; 66, 377-468.
- Mujais SK, Kauffman S, Katz AI (1986) Angiotensin II binding sites in individual segments of the rat nephron. *J Clin Invest* ; 77, 315-318.
- Nakamura A, Iwao H, Fukui K, Kimura S, Tamaki T, Nakanshishis S, Abe Y (1990) Regulation of liver angiotensinogen and kidney renin mRNA levels by angiotensin II. *Am J Physiol* ; 258, E1-E11.
- Navar LG, Imig JD, Zou L, Wang CT (1997) Intrarenal production of angiotensin II. *Semin Nephrol* ; 17, 412-422.
- Nishizuka Y (1995) Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J* ; 9, 484-496.
- Ng KK, Vane JR (1967) Conversion of angiotensin I to angiotensin II. *Nature* ; 216, 762-766.

Ng RCK, Peraino RA, Suki WN (1982) Divalent cation transport in isolated tubules. *Kidney Int* ; 22, 492-497.

Ng RCK, Rouse D, Suki WN (1984) Calcium transport in the rabbit superficial proximal convoluted tubule. *J Clin Invest* ; 74, 834-842.

Okhubo SO (1986) Tissue distribution of rat angiotensinogen mRNA and structural analysis of its heterogeneity. *J Biol Chem* ; 261, 319-326.

Osborne M, Droz B, Meyer P, Morel F (1975) Angiotensin II: Renal localization in glomerular mesangial cells. An autoradiographic analysis. *Kidney Int* ; 8, 245-254.

Ozono R, Wang ZQ, Moore AF, Inagami T, Siragy HM, Carey RM (1997) Expression of the subtype 2 angiotensin (AT<sub>2</sub>) receptor protein in rat kidney. *Hypertension* ; 30, 1238-1246.

Paxton WG, Runge M, Horaist C, Cohen C, Alexander RW, Bernstein KE (1993) Immunohistochemical localization of rat angiotensin II AT<sub>1</sub> receptor. *Am J Physiol* ; 264, F989-F995.

Phillips MI, Sumners C (1998) Angiotensin II in central nervous system physiology. *Regul Pept* ; 78, 1-11.

Pickering GW, Printmetal M (1938) Some observations on renin, a pressor substance contained in normal kidney, together with a method for its biological assay. *Clin Sci* ; 3, 211-227.

Poncet V, Merot J, Poujeol P (1992) cDNA cloning of a renal Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger. *Am J Physiol* ; 262, F1105-F1109.

Post Rs, Sen AK (1967) Sodium and potassium stimulated ATPase. *Methods Enzymol* ; 10, 762-768.

Rajaraman S, Graves K, Kunapuli S (1988) Identification of the sites of synthesis of angiotensinogen and renin in the kidney. *Kidney Int* ; 22, 169A.

Ramachandran C, Brunette MG (1989) The renal Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange system is located exclusively in the distal tubule. *Biochem J* ; 257, 259-264.

Reams G, Villarreal D, Wu Z, Bauer JH (1994) Urinary angiotensin II : a marker of renal tissue activity? *Nephron* ; 67, 450-458.

Reilly RF, Shugrue CA (1992) cDNA cloning of a renal Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger. *Am J Physiol* ; 262, F1105-F1109.

Reilly RF, Shugrue CA, Lattanzi D, Biemesderfer D (1993) Immunolocalization of the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger in rabbit kidney. *Am J Physiol* ; 265, F327-F332.

Rocha AS, Magaldi JB, Kokko JP (1977) Calcium and phosphate transport in isolated segments of rabbit Henle's loop. *J Clin Invest* ; 59, 975-983.

Rochelle LG, Fejes-Toth G (1991) Mechanisms of active calcium absorption in cultured rabbit cortical collecting duct (CCD) cells. *J Am Physiol* ; 2, 269.

Romero MF, Hopfer U, Madhun ZT, Zhou J, Douglas JG (1991) Angiotensin II actions in the rabbit proximal tubule. Angiotensin II mediated signaling mechanisms and electrolyte transport in the rabbit proximal tubule. *Renal Physiol Biochem* ; 14, 199-207.

Rose UM, Bindels RJ, Vis A, Jansen JW, Van Os CH (1993) The effect of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel blockers on anoxia-induced increases in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in rabbit proximal tubule cells in primary culture. *Pflügers Arch* ; 423, 378-386.

Rouse D, Ng RC, Suki WN (1980) Calcium transport in the pars recta and thin descending limb of Henle of the rabbit, perfused in vitro. *J Clin Invest* ; 65, 37-42.

Ruan X, Wagner C, Chatziantoniou C, Kurtz A, Arendshorst WJ (1997) Regulation of angiotensin II receptor  $\text{AT}_1$  subtypes in renal afferent arterioles during chronic changes in sodium diet. *J Clin Invest* ; 99, 1072-1081.

Saccomani G, Mitchell KD, Navar LG (1990) Angiotensin II stimulation of  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange in proximal tubule cells. *Am J Physiol* ; 258, F1188-1195.

Sadoshima J, Xu Y, Slayter HS, Izumo S (1993) Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro. *Cell* ; 75, 977-984.

Saunders JCJ, Isaacson LC (1990) Patch-clamp study of Ca channels in isolated renal tubule segments. In: Calcium transport and intracellular homeostasis, Springer-Verlag edition, p.27-34.

Sawa H, Tokuchi F, Mochizuki N, Endo Y, Furuta Y, Shinohara T, Takada A, Kawaguchi H, Yasuda H, Nagashima K (1992) Expression of the angiotensinogen gene and localization of its protein in the human heart. *Circulation* ; 86, 138-146.

Schuster VL, Kokko JP, Jacobson HRJ (1984) Angiotensin II directly stimulates sodium transport in rabbit proximal convoluted tubules. *Clin Invest* ; 73, 507-515.

Seldin DW, Giebisch G (1992) The kidney. Physiology and pathophysiology. Second edition. New York, Raven Press.

Shimizu T, Nakamura M, Yoshitomi K, Imai M (1991) Interaction of trichlormethiazide or amiloride with PTH in stimulating  $\text{Ca}^{2+}$  absorption in the rabbit CNT. *Am J Physiol* ; 261, F36-F43.

Shimizu T, Yoshitomi K, Nakamura M, Imai M (1990) Effects of PTH, calcitonin and cAMP on calcium transport in rabbit distal nephron segments. *Am J Physiol* ; 259, F408-F414.

Skøtt O, Briggs JP (1987) Direct demonstration of macula densa-mediated renin secretion. *Science* ; 237, 1618-1620.

Smallridge RC, Rogers J, Verma PS (1983) Serum angiotensin-converting enzyme. Alterations in hyperthyroidism, hypothyroidism, and subacute thyroiditis. *JAMA* ; 250 ; 2489-2494.

Sneddon WB, Gesek FA, Friedman PA (1992) Acceleration of PTH-dependent calcium entry by 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub> in distal convoluted tubule cells. *J Am Soc Nephrol* ; 3, 701.

Sraer JD, Sraer J, Ardaillou R, Mimoune O (1974) Evidence for renal glomerular receptors of angiotensin II. *Kidney Int* ; 6, 241-246.

Suki WN (1979) Calcium transport in the nephron. *Am J Physiol* ; 237, F1-6.

Suki WN, Rouse D (1981) Hormonal regulation of calcium transport in thick ascending limb renal tubules. *Am J Physiol* ; 241, F171-F174.

Sun Y, Cleutjens JPM, Diaz-Arias AA, Weber KT (1994) Cardiac angiotensin converting enzyme and myocardial fibrosis in the rat. *Cardiovasc Res* ; 28, 1423-1432.

Sutton RAL, Dirks JH (1975) The renal excretion of calcium: a review of micropuncture data. *Can J Physiol Pharmacol* ; 52, 979-988.

Sutton RAL, Wong NLM, Dirks JH (1976) Effects of parathyroid hormone on sodium and calcium transport in the dog nephron. *Clin Sci Mol Med* ; 51, 345-351.

Swanson GN, Hanesworth JM, Sardinia MF, Coleman JKM, Wright JW, Hall KL, Miller-Wing AV, Stobb JW, Cook VI, Harding EC, Harding JW (1992) Discovery of a distinct binding site for angiotensin II (3-8), a putative angiotensin IV receptor. *Regul Pept* ; 40(3), 409-418.

Taugner R, Hackenthal E, Rix R, Nobiling R, Poulsen K (1982) Immunocytochemistry of the renin-angiotensin system. *Kidney Int* ; Suppl. 12, 533-540.

Terada Y, Tomita K, Nonoguchi H, Marumo F (1993) PCR localization of angiotensin II receptor and angiotensinogen mRNAs in rat kidney. *Kidney Int* ; 43, 1251-1259.

Thurau K, Modification of angiotensin-mediated tubulo-glomerular feedback by extracellular volume. *Kidney Int* ; 8(Supp 5), S202-S207.

Tisher CC, Yarger WE (1973) Lanthanum permeability of the tight junction (zonula occludens) in the renal tubule of the rat. *Kidney Int* 3, 238-250.

- Traynor TR, Smart A, Briggs JP, Schnermann J. (1999) Inhibition of macula densa-stimulated renin secretion by pharmacological blockade of cyclooxygenase-2. *Am J Physiol* ; 277, F706-F710.
- Tigerstedt R, Bergman PG (1898) Niere und Kreislauf. *Skandinavisches Archiv für Physiologie* ; 8, 223-271.
- Tobian L (1960) Interrelationship of electrolytes, juxtaglomerular cells, and hypertension. *Physiol Rev* ; 40, 280-312.
- Torres VE, Northrup TE, Edwards RM, Shah SV, Dousa TP (1978) Modulation of cyclic nucleotides in isolated rat glomeruli. *J Clin Invest* ; 62, 1334-1343.
- Ullrich KJG, Rumrich G, Kloss S (1976) Active reabsorption in the proximal tubule of the rat kidney. *Pflügers Arch* ; 228, 223-228.
- Vander AJ (1963) Inhibition of distal tubule sodium reabsorption by angiotensin II. *Am J Physiol* ; 204, 133-138.
- Vander AJ, Miller R (1964) Control of renin secretion in the dog. *Am J Physiol* ; 207, 537-545.
- Vieyra A, Nachbin L, de Dios-Abad E, Goldfeld M, Meyer-Fernandes JR, de Moraes L (1986) Comparison between calcium transport and adenosine triphosphatase activity in membrane vesicles derived from rabbit kidney proximal tubules. *J Biol Chem* ; 261, 4247-4255.
- Vinay P, Gougoux A, Lemieux G (1981) Isolation of pure suspension of rat proximal tubules. *Am J Physiol* ; 241, F403-F411.
- Vos PF, Boer P, Braam B, Koomans HA (1994) The origin of urinary angiotensins in humans. *J Am Soc Nephrol* ; 5, 215-223.
- Walser M (1973) Divalent cations: physicochemical state in glomerular filtrate and urine and renal excretion. *Am Physiol Soc* ; 8, 555-586.
- Wang T, Chan YL (1990) Mechanism of angiotensin II action on proximal tubular transport. *J Pharmacol Exp Ther* ; 252, 689-695.
- Wang T, Giebisch G (1996) Effects of angiotensin II on electrolyte transport in the early and late distal tubule in rat kidney. *Am J Physiol* ; 271, F143-F149.
- Wang ZQ, Moore AF, Ozono R, Siragy HM, Carey RM (1998) Immunolocalization of subtypes 2 angiotensin II (AT<sub>2</sub>) receptor protein in rat heart. *Hypertension* ; 32, 78-83.
- Welsh C, Dubyak G, Douglas JG (1988) Relationship between phospholipase C activation and prostaglandin E<sub>2</sub> and cyclic adenosine monophosphate production in rabbit tubular epithelial cells. Effects of angiotensin, bradykinin, and arginine vasopressin. *J Clin Invest* ; 81, 710-719.

Wittner M, di Stefano A, Wangemann P, Nitschke R, Greger R, Bailly C, Amiel C, Roinel N, de Rouffignac C. (1988) Differential effects of ADH on sodium, chloride, potassium, calcium and magnesium transport in cortical and medullary thick ascending limbs of mouse nephron. *Pflügers Arch* ; 412, 516-523.

Wollert KC, Drexler H (1999) The renin-angiotensin system and experimental heart failure. *Cardiovasc Res* ; 43, 838-849.

Woodcock EA, Johnston CI (1982) Inhibition of adenylate cyclase by angiotensin II in rat renal cortex. *Endocrinology* ; 111, 1687-1691.

Yamada T, Horiuchi M, Dzau VJ (1996) Angiotensin II type 2 receptor mediates programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* ; 9, 93-100.

Zhang J, Pratt RE (1996) The AT<sub>2</sub> receptor selectively associates with G $\alpha$ 2 and G $\alpha$ 3 in the rat fetus. *J Biol Chem* ; 271, 15026-15033.

Zhou J, Sims C, Chang C-H, Berti-Mattera L, Hopfer U, Douglas JG (1990) Proximal tubular epithelial cells possess a novel 42 kd guanine nucleotide-binding regulatory protein. *Proc Natl Acad Sci USA* ; 87, 7532-7535.

Zhuo J, Alcorn D, Harris PJ, McCausland J, Aldred GP, Mendelsohn FAO (1997) Angiotensin II receptor subtypes in the kidney: Distribution and function. *Nephrology* ; 1, 511-525.

Zuo Q, Claveau D, Hilal G, Leclerc M, Brunette MG (1997) Effect of calcitonin on calcium transport by the luminal and basolateral membranes of the rabbit nephron. *Kidney Int* ; 51, 1991-1999.