

Université de Montréal

**Caractérisation biochimique et fonctionnelle
du mutant T179N de l'aquaporine-2 humaine**

Par

Jessica Matar

Département de Physiologie

Faculté de Médecine

Université de Montréal

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures

En vue de l'obtention du grade de

M.Sc. en Physiologie

Option physiologie et biophysique moléculaires

Avril 2014

© Jessica Matar, 2014

Résumé

L'aquaporine-2 (AQP2) est le canal responsable de la réabsorption finale d'eau au niveau du tubule collecteur du rein. À la base, contenue dans des vésicules internes, l'AQP2 est acheminée à la membrane apicale des cellules principales du tubule collecteur suite à une stimulation par l'hormone antidiurétique (ADH). L'incapacité à accomplir cette fonction entraîne le diabète insipide néphrogénique (DIN), une maladie caractérisée par l'incapacité du rein à concentrer l'urine, entraînant une production de volumes urinaires élevés. Alors que les mutations récessives génèrent des protéines mal structurées et incapables de former des tétramères, les mutations dominantes sont capables de s'associer à leurs homologues sauvages, engendrant ainsi un DIN même chez les patients hétérozygotes. Ce mémoire présente l'analyse biochimique et fonctionnelle d'une nouvelle mutation naturelle de l'AQP2, la mutation T179N, aussi responsable du DIN. Cette dernière est particulièrement intéressante de par son génotype qui implique un caractère dominant, et sa position extracellulaire habituellement réservée aux mutations récessives. Les études comparatives de T179N à deux modèles de mutation récessive et dominante démontrent, tant en ovocytes de *Xenopus laevis* qu'en lignée cellulaire mpkCCDC₁₄, le caractère récessif de cette nouvelle mutation. Les tests d'immunobuvardage de lysats d'ovocytes en membranes totales et membranes plasmiques purifiées ont révélé que seule la forme sauvage atteint la membrane plasmique alors que le mutant T179N est séquestré dans la cellule. En accord avec ce résultat, les analyses de perméabilité fonctionnelle démontrent aussi une absence d'activité pour T179N. En cellule mpkCCDC₁₄, le mutant T179N exprimé seul n'atteint pas la membrane plasmique suite à l'action de la forskoline, contrairement à la forme sauvage. Cependant, ce mutant peut s'associer à son homologue sauvage en coexpression tant dans les ovocytes qu'en lignée mpkCCDC₁₄ sans toutefois engendrer l'effet typique de dominance négative. En fait, dans ce contexte de coexpression, on remarque une augmentation de la P_f de $83 \pm 7\%$ et une récupération d'adressage à la membrane plasmique en cellule (immunofluorescence). En conclusion, T179N serait un mutant récessif fonctionnellement récupérable lorsqu'en présence de l'AQP2 sauvage.

Mots-clés : Aquaporine 2, mutation, diabète insipide néphrogénique, expression hétérologue

Abstract

Aquaporin-2 (AQP2) is the channel responsible for the final reabsorption of water in the collecting duct of the kidney. Basically, contained in internal vesicles, the AQP2 is delivered to the apical membrane of the principal cells of the collecting tubule after stimulation by the antidiuretic hormone (ADH). The failure to perform this function causes nephrogenic diabetes insipidus (NDI); a disease characterized by the inability of the kidney to concentrate urine and induces the production of high urinary volumes. While recessive mutations generate poorly structured proteins unable to form tetramers, dominant mutations are capable of associating with their wild counterparts, thus generating a NDI even in heterozygous patients. This paper presents the biochemical and functional analysis of T179N, a new NDI-causing mutation of the human AQP2. The mutant is particularly interesting because of its dominant genotype, despite its extracellular position usually restricted to recessive mutations. Here, we compare T179N against archetypal recessive and dominant mutations using both *Xenopus laevis* oocytes and in mpkCCDc₁₄ cell model, and show the recessive nature of the mutation. The immunoblot tests on oocytes lysates in purified total and plasma membranes revealed that only the wild type protein reaches the plasma membrane while the T179N mutant is sequestered within cellular stores. Accordingly, functional analyzes indicate that T179N is inactive. In mpkCCDc₁₄ cells, T179N expressed alone does not reach the plasma membrane in response to forskolin stimulation, unlike the wild-type. However, T179N does show the capacity to associate with its wild-type counterpart in both oocytes and in mpkCCDc₁₄ cells, although without displaying the typical dominant negative effect. In fact, when coexpressed along wild-type, T179N gains back the functionality, with a P_f increase of 83±7% and adequate plasma membrane targeting in cells (immunofluorescence). In conclusion, the mutant T179N is a mild recessive mutation that is susceptible to functional recovery when in presence of wild type AQP2.

Keywords : Aquaporin 2, mutation, nephrogenic diabetes insipidus, heterologous expression.

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des abréviations.....	v
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	ix
Remerciements.....	xi
1. INTRODUCTION.....	
1.1 Les reins.....	1
1.1.1 Morphologie rénale.....	
1.1.1.1 Position et morphologie externe.....	2
1.1.1.2 Morphologie interne.....	2
1.2 Le néphron.....	3
1.2.1 Le corpuscule de Malpighi.....	4
1.2.1 Le tubule rénal.....	5
1.2.3 L'appareil juxtaglomérulaire.....	6
1.3 Morphologie vasculaire rénale.....	8
1.3.1 Vascularisation rénale.....	8
1.3.2 Vascularisation glomérulaire.....	9
1.3.3 Les capillaires péri-tubulaires.....	9
1.4 La physiologie rénale.....	9
1.4.1 Filtration glomérulaire.....	10
1.4.2 Réabsorption tubulaire.....	11
1.4.3 Sécrétion tubulaire.....	13
1.4.4 Mécanismes régulateurs de la concentration urinaire.....	13
1.4.5 Fonction endocrine du rein.....	14
1.5 L'hormone antidiurétique.....	
1.5.1 Synthèse et fonctions.....	15
1.5.2 Les récepteurs de l'hormone antidiurétique.....	17
1.5.2.1 Structure et fonction de l'AVPR2.....	18
1.5.2.2 Désensibilisation et internalisation de l'AVPR2.....	19
1.6 Le diabète insipide.....	20
1.6.1 Le diabète insipide central.....	21
1.6.2 Le diabète insipide néphrogénique.....	21
1.6.2.1 Le DIN lié au chromosome X.....	22
1.6.2.2 Le DIN autosomique.....	23
1.7 Les aquaporines.....	26
1.7.1 Historique.....	26
1.7.2 La répartition des aquaporines.....	27
1.7.3 La structure générale des aquaporines.....	28
1.7.4 La structure et la spécificité de transport du pore.....	31

1.7.5	Distribution et rôle des aquaporines	32
1.7.5.1	AQP0	33
1.7.5.2	AQP1	33
1.7.5.3	AQP3	33
1.7.5.4	AQP4	34
1.7.5.5	AQP5	34
1.7.5.6	AQP6	34
1.7.5.7	AQP7	34
1.7.5.8	AQP8	35
1.7.5.9	AQP9	35
1.7.6	AQP10	35
1.7.6.1	AQP11	36
1.7.6.2	AQP12	36
2.	AQUAPORINE-2	37
2.1	Protéosynthèse	38
2.2	Phosphorylation de l'AQP2 et adressage membranaire	39
2.3	Endocytose et dégradation	41
2.4	Les mutations de l'AQP2 et le DIN	42
2.5	Les modèles d'expression	
2.5.1	<i>Xenopus laevis</i>	45
2.5.1.1	Les ovocytes et les méthodes de purification	45
2.5.2	Les modèles cellulaires	46
2.5.2.1	Les cellules mpkCCD _{c14}	47
2.6	Objectifs	48
3.	RÉSULTATS	
	Article : <i>Functional Characterization of a New AQP2 Mutation Responsible for Nephrogenic Diabetes Insipidus</i>	50
4.	DISCUSSION	73
4.1	Caractérisation fonctionnelle du mutant T179N en ovocytes	73
4.2	Comparaison du mutant T179N au modèle dominant prévalent	74
4.3	Récupération fonctionnelle de mutants récessifs	75
4.4	Détermination des propriétés de T179N dans les cellules mpkCCD _{c14}	76
5.	CONCLUSIONS	77
	Bibliographie	xii

Liste des abréviations

Å : ångström

AC : adénylate cyclase

ACTH : hormone corticotrope (*adrenocorticotropic hormone*)

ADH : hormone antidiurétique (*antidiuretic hormone*)

ADN : acide désoxyribonucléique

ADN_C : acide désoxyribonucléique codant

AJG : appareil juxtaglomérulaire

AKAP : *PKA anchoring proteins*

AQP : aquaporine (0 à 13)

AQP2 : aquaporine-2

AMP_c : adénosine monophosphate cyclique

ARN_m : acide ribonucléique messenger

ATP : adénosine triphosphate

AVP : L-arginine-vasopressine, vasopressine, hormone antidiurétique

AVPR1a : récepteur 1a de l'arginine vasopressine

AVPR1b : récepteur 1b de l'arginine vasopressine

AVPR2 : récepteur 2 de l'arginine vasopressine

AVPR3 : récepteur 3 de l'arginine vasopressine

CCP: *clathrin coated pits*

CHIP28: *Channel-forming Integral Protein of 28 kDa*

cm/s : centimètre par seconde

CMV : corps multivésiculaires

CRE : *cAMP response element*

CREB-P : *cAMP response element binding protein*

C-terminale : carboxy-terminale

dDAVP : 1-désamino-8-D-arginine vasopressine, desmopressine

Del : délétion

DI : diabète insipide

DIC : diabète insipide central
DIN : diabète insipide néphrogénique
GPCR: *G protein coupled receptor*
GTP: guanosine triphosphate
HEK293: *Human Embryonic Kidney 293 cells*
Hsc70: *Heat shock 70k Da protein*
IMCD: *Inner Medullary Collecting Duct cell*
ins: insertion
Kb: kilobase
kDa: kiloDalton
MDCK: *Madin-Darby canine kidney*
MIP: *major intrinsic protein*
mm Hg : millimètre de mercure
mmol/kg: millimole/kilogramme
mOsm: milliosmole/L ou milliosmolaire
mpkCCDc14: *mouse cortical collecting duct cells*
mut: mutant
NFAT: *Nuclear factor of activated T-cells*
NPII : neurphysine II
NPA : asparagine-proline-alanine
N-terminale : amino-terminale
PDZ : *Post synaptic density protein (PSD95), Drosophila disc large tumor suppressor (Dlg1) et Zonula occludens-1 protein (zo-1)*
Pf : perméabilité osmotique
pH : potentiel d'Hydrogène
PI3-kinase: *Phosphoinositide 3-kinase*
PKA: protéine kinase A
PKC: protéine kinase C
PKG: protéine kinase G
Protéines G: protéine à guanine
PTH: *Parathyroid hormone*

Rab11: *Ras-related in brain-11*

Rap1: *Ras-related protein-1*

RE: réticulum endoplasmique

Rh: rhésus

RhoA: *Ras homolog gene family, member A*

RME1: *Regulator of meiosis-1*

RXR: *retinoid X receptor*

Spa-1: *signal-induced proliferation-associated gene-1*

SNAP-23: *synaptosomal-associated protein of 23 kDa*

SNARE: *Soluble NSF attachment protein receptor NSF: N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein*

TCP: tubule contourné proximal

TD: tubule distal

TonE: *tonicity responsive enhancer*

TonEBP: *tonicity responsive enhancer binding protein*

VAMP-2 : *Vesicle-associated membrane protein 2*

WT : *wild type, forme sauvage ou native*

Liste des tableaux

Tableau I :	Tableau récapitulatif des différents récepteurs à la vasopressine.....	17
Tableau II :	Étiologie des diabètes insipides néphrogéniques.....	22
Tableau III :	Liste des 46 mutations autosomiques dominantes et récessives responsables du DIN humain répertoriées à ce jour.....	25

Liste des figures

Figure 1 :	Schéma représentant l'appareil urinaire chez l'humain.....	1
Figure 2 :	Coupe sagittale d'un rein.....	2
Figure 3 :	Schéma d'un néphron.....	2
Figure 4 :	Image du corpuscule de Malpighi.....	4
Figure 5 :	Image de l'AJG.....	7
Figure 6 :	Vascularisation rénale.....	8
Figure 7 :	Schéma des fonctions rénales	10
Figure 8 :	Schématisation de la sécrétion et réabsorption dans les tubules rénaux.....	12
Figure 9 :	Schéma représentatif de la synthèse de l'AVP.....	15
Figure 10 :	Structure de l'AVP.....	16
Figure 11 :	Représentation de la cascade d'activation des récepteurs à l'AVP.....	18
Figure 12 :	Arbre phylogénétique de la famille des protéines MIP et leurs sous-groupes.....	20
Figure 13 :	Schéma représentatif de l'architecture de l'AQP1.....	30
Figure 14 :	Sélectivité du pore aqueux.....	31
Figure 15 :	Distribution ubiquitaire des aquaporines chez l'homme.....	32
Figure 16 :	Structure tertiaire de l'aquaporine-2.....	38
Figure 17 :	Schéma des différentes voies de signalisation de l'AQP2.....	41
Figure 18 :	Schématisation 2D de la protéine AQP2 et des mutations.....	43
Figure 19 :	Schématisation du modèle moléculaire des mutations dominantes et récessives de l'AQP2 responsable du DIN humain.	44

*« L'éducation n'est, en somme,
que l'art de révéler à l'être humain le sens
intime qui doit gouverner ses actes, préparer
l'emploi de ses énergies et lui communiquer le
goût et la force de vivre pleinement. »
Henry Bordeaux (1870-1963)*

*À mes parents, merci de m'avoir
inculqué cet Art, merci pour tout.*

Remerciements

Ce travail est le fruit de l'effort, de l'investissement, de l'ouvrage et de la passion d'une merveilleuse équipe. C'est pour cela que je voudrais remercier le Dr Daniel Bichet qui m'a ouvert les portes de son laboratoire et m'a donné la chance de découvrir un univers tout nouveau pour moi. Merci à Pierre Bissonnette pour sa présence quotidienne, son appui, et ses idées géniales. Je tiens à remercier Yoann Lussier, Sandra Da Cal et Abdullah El Tarazi pour toute l'aide technique, scientifique, morale et surtout leur amitié. Merci aux membres du GEPROM : les Drs Lucie Parent, Jean-Yves Lapointe, Rickard Blunk, Rémy Sauvé et leurs équipes de laboratoires respectives. J'aimerais remercier aussi Louise Lefort, Pierrette Fournel et Joanne Payette pour leur support administratif ainsi que Julie Verner et Michel Brunette pour leur aide technique.

Un grand merci à mes parents Ibrahim et Samia, à ma sœur Jennifer, à mes beaux-parents et surtout à mon mari Habib pour tout l'appui, la compréhension et l'amour qu'ils m'ont démontré tout au long de mon parcours scolaire et durant la rédaction de ce mémoire. Finalement, merci à mon petit trésor Michael qui a été patient, gentil et adorable le temps que je finisse de rédiger.

1. Introduction

1.1 Les reins

Les reins (**Fig. 1**), organes pairs en forme de haricot, jouent un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie du corps humain en assurant, entre autres, son équilibre hydrique. Ils sont dotés des fonctions d'épuration, d'excrétion et de réabsorption qui leur permettent respectivement de filtrer le plasma, d'excréter les déchets métaboliques et les toxines dans l'urine, et de retourner au sang les substances nécessaires au fonctionnement de l'organisme (Marieb and Lachaine 1999, Lacour 2013). En plus de leurs fonctions régulatrices, les reins sont également impliqués dans la production et/ou la modification de protéines indispensables au fonctionnement du corps humain. Citons ici la rénine, enzyme impliquée dans le contrôle de la pression artérielle et l'activité rénale, ou encore l'érythropoïétine qui stimule la production des globules rouges dans la moelle osseuse (Marieb and Lachaine 1999, Lacour 2013). Pour assurer ces fonctions diverses, il va sans dire que l'anatomie rénale impose une répartition intelligente des tâches, dont les différentes composantes structurales et cellulaires tiennent les rôles principaux.

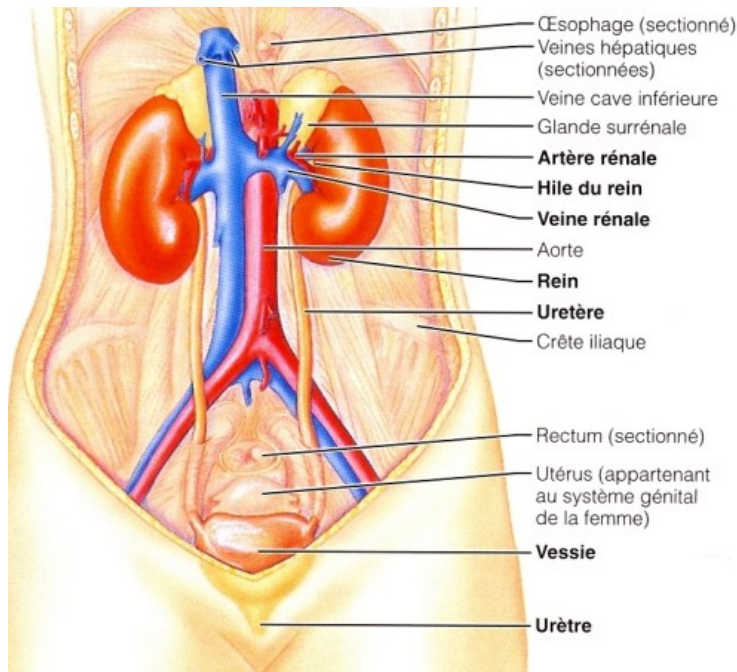


Figure 1 : Schéma représentant l'appareil urinaire chez l'humain adapté de (Marieb and Lachaine 1999).

1.1.1 Morphologie rénale

1.1.1.1 Position et morphologie externe

Situés en position rétropéritonéale et paravertébrale, les reins sont deux organes de forme ovoïde qui s'étendent généralement de la douzième vertèbre thoracique à la troisième vertèbre lombaire. Chez l'adulte, chaque rein pèse approximativement 150 g, et mesure environ 10 à 12 cm de hauteur, 6 cm de largeur et 3 cm d'épaisseur (Gougoux 2005). Dû à la compression exercée par le foie, le rein gauche est situé légèrement plus haut que le rein droit. Dotée d'une face latérale convexe, la face médiale concave de chaque rein est creusée d'une dépression verticale, le hile rénal, point d'entrée et de sortie de structures variées, dont les vaisseaux sanguins rénaux, les vaisseaux lymphatiques, l'uretère et les nerfs. Ces derniers se rejoignent au niveau du sinus rénal. Trois couches tissulaires maintiennent et englobent chaque rein et le protègent des traumatismes (Marieb and Lachaine 1999). La capsule fibreuse étant la plus interne, elle est d'emblée collée au rein et constitue une barrière étanche et résistante contre les invasions infectieuses. La capsule adipeuse intermédiaire sert quant à elle de protection contre les chocs physiques et fixe le rein à la paroi postérieure du tronc alors que le fascia rénal tient le rôle d'ancrage du rein et de la glande surrénale aux structures adjacentes.

1.1.1.2 Morphologie interne

Une coupe longitudinale du rein permet de distinguer trois grandes régions : le cortex, la médulla et le pelvis ou bassinnet (**Fig. 2**) (Wheater, Young et al. 2001, Lacour 2013). Le cortex, la partie la plus externe d'une épaisseur d'environ 1 cm, présente un aspect granuleux et une coloration pâle. Cette région est le siège des glomérules, structure essentielle à la fonction de filtration du rein. La médullaire de coloration rouge-brun se subdivise quant à elle en deux zones : la médullaire externe et la médullaire interne. Elle est constituée d'un réseau de structures coniques à l'aspect strié, les pyramides de Malpighi dont la base se trouve à la jonction corticomédullaire et dont la pointe se projette dans le pelvis rénal formant la papille rénale. En forme d'entonnoir, le bassinnet est une structure représentant le segment initial dilaté de l'uretère (Wheater, Young et al. 2001). Il est formé de calices majeurs et mineurs qui reçoivent l'urine et permettent son acheminement vers la vessie via l'uretère.

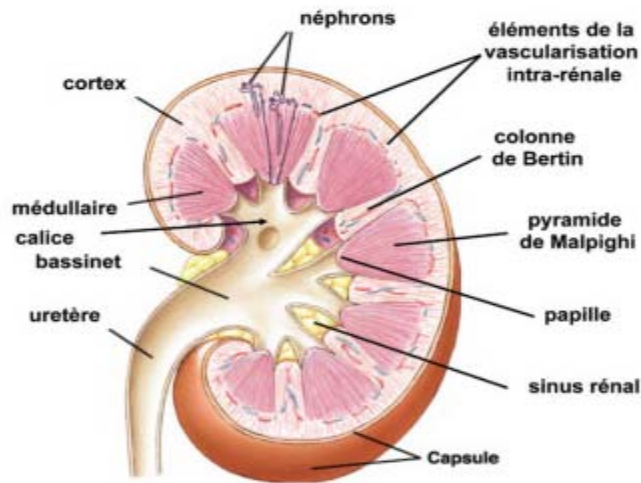


Figure 2 : Coupe sagittale d'un rein. Représentation schématique mettant en relief les différentes composantes structurales, tissulaires et vasculaires de l'anatomie rénale; tirée de (Lacour 2013).

1.2 Le néphron

Chez l'homme, on retrouve plus d'un million de néphrons par rein (**Fig. 3**) (Gougoux 2005, Lacour 2013). Leur rôle est primordial dans les processus de filtration glomérulaire, de réabsorption et de sécrétion tubulaires. Connu comme étant l'unité fonctionnelle et structurale du rein, le néphron est composé de deux parties essentielles : le corpuscule de Malpighi et le tubule rénal (Wheater, Young et al. 2001).

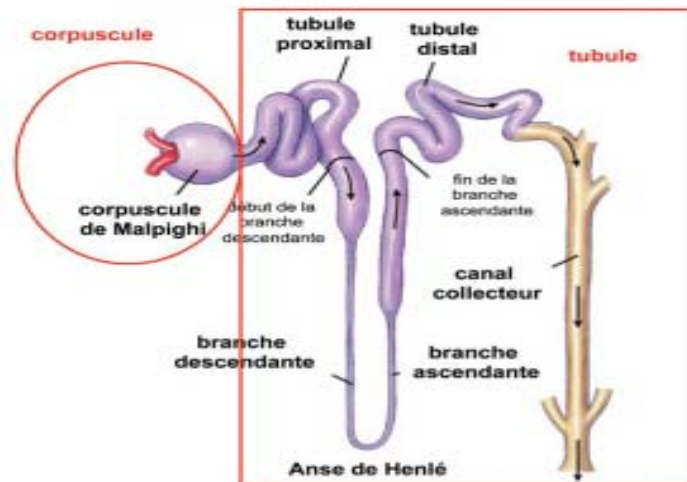


Figure 3 : Schéma d'un néphron. L'image représente le corpuscule rénal ainsi que les différentes parties du tubule rénal : TCP, anse de Henlé, TD, et canal collecteur; adapté de (Lacour 2013).

1.2.1. Le corpuscule de Malpighi

Le corpuscule de Malpighi (**Fig. 4**) (Lacour 2013), ou corpuscule rénal, est constitué d'un petit amas globulaire de capillaires, appelé glomérule, complètement entouré d'un bulbe creux, la capsule de Bowman ou la capsule glomérulaire rénale. Cette dernière a la forme d'un sac renflé à double feuillet et constitue le début du néphron. Son feuillet pariétal externe est formé d'un épithélium pavimenteux simple reposant sur une membrane basale et n'offre qu'un rôle structural. Son feuillet interne viscéral est quant à lui tapissé d'une couche de cellules épithéliales appelées podocytes qui entourent le glomérule. La région centrale du corpuscule rénal est formée de cellules mésangiales dont le rôle est phagocytaire. Les capillaires glomérulaires jouissent d'une nature poreuse, ce qui leur permet de filtrer l'eau et les composants plasmatiques de faible poids moléculaire. Il en résulte l'ultrafiltrat glomérulaire, l'urine primitive dont la composition sera modifiée tout au long de son parcours dans le reste du néphron (Marieb and Lachaine 1999, Wheater, Young et al. 2001).

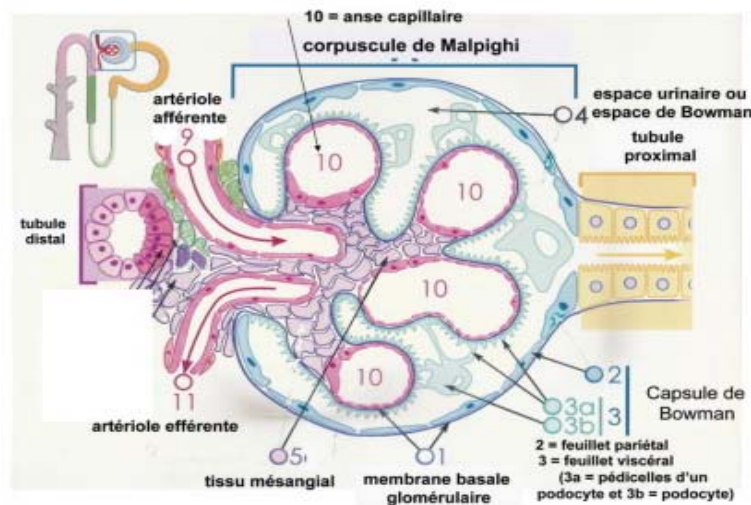


Figure 4 : Image du corpuscule de Malpighi. Le schéma représente les unités structurales internes sous-jacentes à sa fonction de filtration d'après (Lacour 2013).

1.2.2. Le tubule rénal

Bordé par une couche unique de cellules épithéliales, le tubule rénal consiste en une succession de tubules qui conduisent l'ultrafiltrat du glomérule au tube collecteur. Les tubules rénaux sont le siège de la formation graduelle de l'urine finale et permettent la réabsorption d'ions, de molécules variées et d'une grande partie de l'eau filtrée par le glomérule. La division du système tubulaire en trois parties majeures tient compte des différences histologiques et fonctionnelles des segments concernés.

Le tubule contourné proximal (TCP) constitue la première branche et, d'ailleurs, la plus longue de ce système tubulaire. Présent au niveau de la corticale rénale, le TCP est constitué d'un épithélium cubique simple doté de nombreuses mitochondries et microvillosités denses sur sa face apicale, ce qui augmente considérablement sa surface d'échange (≈ 20 fois) avec le liquide tubulaire et lui confère l'aspect de bordure en brosse (Wheater, Young et al. 2001, Lacour 2013). Outre ses rôles de réabsorption et de sécrétion de nutriments, d'ions, de médicaments et autres substances, le TCP participe au maintien du pH sanguin en régulant la sécrétion des ions H^+ . Mais c'est surtout la réabsorption d'eau (70 %) et de NaCl (75 %) qui demeure ses fonctions les plus proéminentes.

L'anse du néphron, ou anse de Henle, succède au TCP et présente une forme en U. Celle-ci est formée d'une branche descendante et d'une branche ascendante d'épithéliums distincts. La partie descendante, de structure cubique et d'une composition cellulaire proche de celle du TCP (Marieb and Lachaine 1999), devient pavimenteuse et perméable à l'eau à son niveau grêle. Dans la partie ascendante grêle et large, on remarque une diminution de l'osmolarité due à l'imperméabilité de cette branche de l'anse à l'eau alors qu'elle poursuit la réabsorption d'ions (Wheater, Young et al. 2001). De par ses propriétés d'échange d'eau et d'urée, l'anse de Henle détient un rôle majeur dans le maintien d'une pression osmotique élevée dans la médullaire rénale.

La longueur de l'anse de Henle est fonction de la population de néphrons et de son locus. En effet, les néphrons superficiels prennent leur origine dans les surfaces superficielles et moyennes du cortex et présentent une anse de Henle courte, alors que les néphrons profonds

dont l'anse est longue naissent des corpuscules localisés à la jonction corticomédullaire (Gougoux 2005).

Le tubule distal (TD) est entièrement situé dans la corticale rénale. Il est histologiquement dissociable du TCP par des cellules épithéliales plus minces et l'absence de microvillosités (Marieb and Lachaine 1999). De plus, le TD est le siège de la réabsorption des ions sodium et joue un rôle important dans l'équilibre acido-basique. Par ailleurs, on note que la sécrétion tubulaire dans ce segment dépasse le phénomène de réabsorption. Le contenu du TD est ensuite déversé dans le tube collecteur.

Le tube collecteur est issu de la fusion de plusieurs néphrons et, comme son nom l'indique, il collecte l'urine afin de l'acheminer, tout au long de la pyramide Malpighi, vers la papille située à son sommet. Doté d'un épithélium cylindrique simple, il est formé de deux types cellulaires : les cellules intercalées riches en mitochondries et responsables de l'équilibre acido-basique; et les cellules principales, plus claires qui réabsorbent l'eau, le sodium et sécrètent le potassium (Gougoux 2005). Au long de son parcours, l'urine sera concentrée puis cette urine finale sera déversée via le conduit papillaire dans le système pyélocaliciel avant de sortir du rein pour se rendre dans la vessie. Sous contrôle de la vasopressine, ou ADH, le tube collecteur module sa réabsorption d'eau, produisant ainsi une urine plus ou moins hypertonique selon les besoins. Ce contrôle de la réabsorption finale d'eau est central à l'équilibre hydrique de l'organisme.

1.2.3 L'appareil juxtaglomérulaire

L'appareil juxtaglomérulaire (AJG) (**Fig. 5**) est une masse syncytiale endocrine dont le rôle est essentiel dans la régulation de la pression artérielle systémique. Situé au pôle vasculaire du glomérule, il résulte du contact du TD avec l'artériole afférente (AA) glomérulaire d'un même néphron. Il se compose de trois parties (Wheater, Young et al. 2001) : la macula densa du TD, les cellules mésangiales extraglomérulaires et les cellules juxtaglomérulaires de l'artériole afférente, également appelées cellules granuleuses.

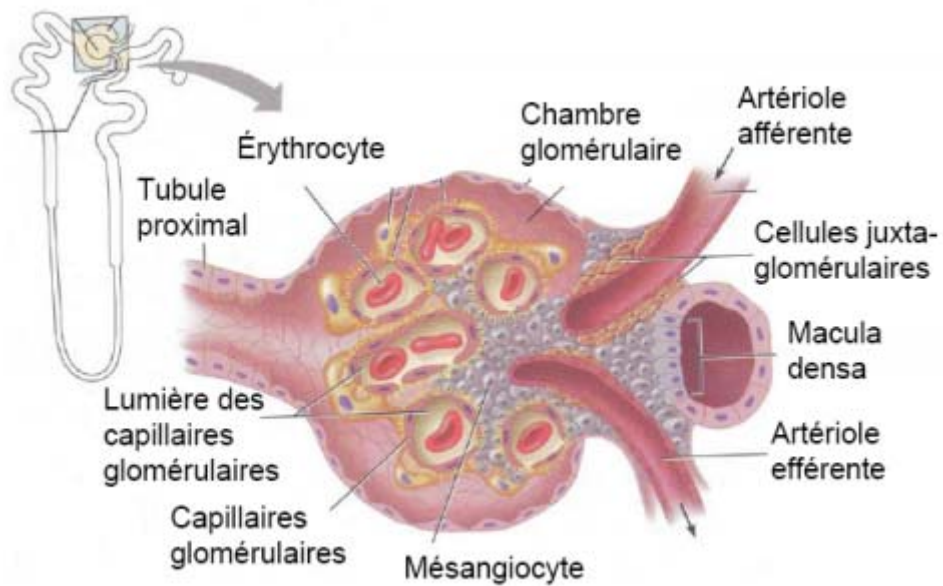


Figure 5 : Schéma de l’AJG extrait de (Leduc-Nadeau 2010).

La macula densa est un agrégat de cellules qui limite la portion terminale du tubule droit distal. Ces cellules prismatiques à gros noyaux, plus hautes que les autres cellules du TD, agissent en tant qu’osmorécepteurs face aux variations de la concentration des solutés dans le filtrat du TD.

Dans la région de la paroi de l’artériole afférente se retrouvent les cellules juxtaglomérulaires de nature musculaire lisse. Leur cytoplasme contient de gros granules riches en rénine, une enzyme impliquée dans la régulation de la pression artérielle. De ce fait, ces cellules jouent le rôle de mécanorécepteurs.

Les cellules mésangiales extraglomérulaires, ou cellules de lacis, sont des cellules aplaties et allongées délimitées à leur base par la macula densa et par les artérioles afférente et efférente en position latérale. Leur fonction reste encore quelque peu mystérieuse en dépit de leur position stratégique au sein de L’AJG.

1.3 Morphologie vasculaire rénale

Alors que leur poids représente moins que 0,5 % du poids total du corps humain, les reins demeurent d'une efficacité remarquable vu qu'ils reçoivent 20 % du débit cardiaque (Campbell and Mathieu 1995). En conséquence, environ 1,2 L de sang est filtré par les reins à chaque minute (Gougoux 2005), dont 90 % perfuse le cortex et 10 % la médullaire. Un tel travail nécessite la présence d'un réseau vasculaire bien développé en vue de répondre adéquatement aux fonctions demandées.

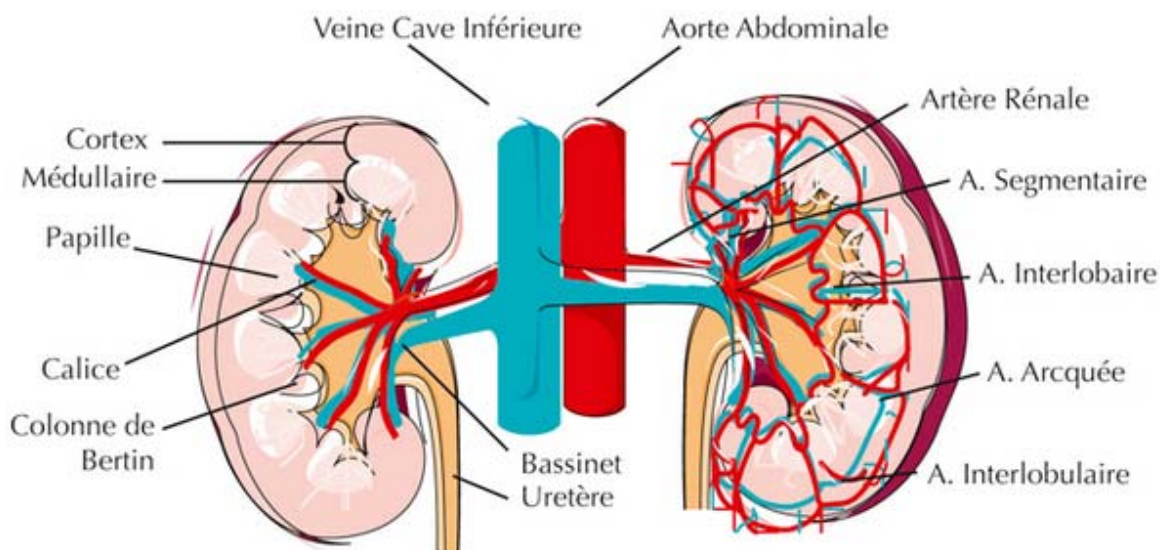


Figure 6 : Schéma de la vascularisation rénale extrait de (Gueutin, Deray et al. 2012).

1.3.1 Vascularisation rénale

Le sang arrive au rein par l'artère rénale (**Fig. 6**), qui se divise en deux branches au niveau du hile. Ces dernières se ramifient en plusieurs petites artères, les artères interlobaires, qui remontent le long des pyramides rénales jusqu'à la jonction corticomédullaire. À cette hauteur, les artères interlobaires s'orientent en angle droit et se ramifient en artères arcuées du rein, dont le trajet est parallèle à la capsule rénale. De nombreuses artères interlobulaires naissent des artères arciformes allant irriguer le tissu cortical qui contient la majorité des néphrons. Le sang qui circule dans les veines émergentes du rein suit approximativement, mais inversement, le chemin du circuit artériel (Marieb and Lachaine 1999).

1.3.2 Vascularisation glomérulaire

À la hauteur du néphron, l'artériole glomérulaire afférente, issue d'artères interlobulaires, rentre dans le corpuscule rénal au niveau de la capsule de Bowman. Le glomérule est ensuite formé, suite à la ramification de l'artère afférente en plusieurs capillaires anastomosés. L'artériole glomérulaire efférente qui draine le glomérule naît de la fusion de ce réseau capillaire à la sortie de la capsule (Campbell and Mathieu 1995). Les artérioles afférente et efférente sont responsables du maintien d'un gradient de pression qui permet la propulsion du liquide dans l'espace glomérulaire. Ceci est dû à la différence de résistance vasculaire entre l'artériole afférente et l'artériole efférente, la première étant de diamètre plus large (Campbell and Mathieu 1995).

1.3.3 Les capillaires péritubulaires

Agissant dans la région corticale et issus de l'artériole efférente glomérulaire, les capillaires péritubulaires forment une microcirculation. Ils s'enchevêtrent avec les tubules contournés proximaux et distaux et détiennent un rôle particulier dans l'absorption, vu leur nature poreuse. Les vasa recta (vaisseaux droits) forment quant à eux la microcirculation du côté de la médulla rénale. Issus des prolongements des artérioles efférentes des glomérules juxtamédullaires, ils sont en forme d'épingle et voyagent parallèlement aux branches ascendante et descendante de l'anse de Henle (Gougoux 2005). Leur fonction consiste à maintenir l'espace médullaire hypertonique de façon à permettre la concentration de l'urine.

1.4 La physiologie rénale

En dépit de leur faible poids (300 g) (Gougoux 2005), les reins sont l'incarnation même d'une usine en pleine activité. Ils traitent environ 180 litres de liquides acheminés par le courant sanguin, mais n'expulsent toutefois que 1,5 à 2 litres d'urine par jour, le reste ayant regagné la circulation. Outre le maintien de l'homéostasie des liquides corporels qui demeure leur principale fonction, les reins sont aussi dotés d'une fonction endocrine essentielle dans la régulation de certains mécanismes physiologiques. Ce rôle d'excrétion de nombreuses substances et déchets métaboliques dans l'urine s'accomplit en trois processus essentiels

(Fig. 7) : la filtration glomérulaire, la réabsorption tubulaire et la sécrétion tubulaire (Gougoux 2005).

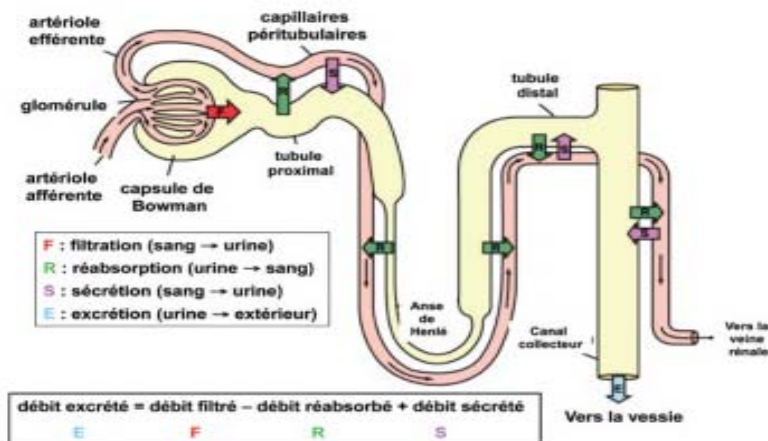


Figure 7 : Schéma des fonctions rénales. Schématisation du néphron mettant en évidence les fonctions de filtration, sécrétion et réabsorption dans les différentes parties du tubule rénal; adapté de (Lacour 2013).

1.4.1 Filtration glomérulaire

Il s'agit de la première étape dans le processus de l'élaboration de l'urine. Elle permet, par pression hydrostatique, le passage passif et non sélectif d'une fraction liquide du sang, le filtrat glomérulaire, de la lumière capillaire glomérulaire vers la chambre urinaire de Bowman. Ce passage est rendu possible grâce à deux facteurs, soit la différence de pression entre le glomérule (55 mm Hg) et le lit capillaire (18 mm Hg ou moins) (Marieb and Lachaine 1999) ainsi que la membrane de filtration qui constitue une cloison poreuse permettant la diffusion libre de l'eau et des molécules de faible poids moléculaire (< 70 kDa). Trois couches constituent la membrane de filtration : l'endothélium capillaire, la membrane basale glomérulaire et le feuillet viscéral de la capsule de Bowman qui contient des cellules épithéliales de grande taille, les podocytes, dont les prolongements donnent lieu aux pédicelles qui délimitent les fentes de filtration (Wheater, Young et al. 2001).

Cette barrière de filtration exerce une perméabilité sélective qui dépend de la taille, la configuration et la charge électrique de la molécule. Ainsi, toute molécule volumineuse, anionique ou de poids moléculaire > 70 kDa restera au niveau des couches extérieures de la

membrane de filtration dans le but d'être dégradée ou phagocytée (Marieb and Lachaine 1999, Wheater, Young et al. 2001). Donc, l'ultrafiltrat de l'espace urinaire de Bowman renferme de l'eau et les substances non protéiques : glucose, minéraux, acides aminés et déchets azotés. Dans le but de maintenir un débit de filtration glomérulaire constant, cette fonction rénale est hautement contrôlée par plusieurs systèmes dont le système rénine-angiotensine, le système nerveux et intrinsèquement à travers un mécanisme d'autorégulation.

1.4.2 Réabsorption tubulaire

L'importance de la réabsorption tubulaire (**Fig. 8**) est mise en évidence par le faible volume de liquide excrété (1 %) par rapport au volume total filtré quotidiennement par les reins. En restituant au sang toutes ses composantes organiques ainsi que l'eau et les minéraux, les reins assurent un bilan hydrique et électrolytique nul. Ainsi, dès que le filtrat atteint le TCP, un processus de transport transépithélial hautement sélectif débute, permettant la réabsorption de multiples substances de la lumière tubulaire, en passant dans l'espace interstitiel pour finalement atteindre les capillaires péri-tubulaires avant de se déverser dans le sang. Le transport passif ou actif est fonction de la nature des substances à réabsorber. Le sodium, qui est le principal cation du filtrat et consomme 80 % de l'énergie (Marieb and Lachaine 1999) associée à la réabsorption active via la pompe $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase, dicte le processus actif secondaire de réabsorption d'une kyrielle de substances dont le glucose et les acides aminés.

L'eau, quant à elle, est réabsorbée par l'osmose favorisée par la réabsorption de multiples nutriments, alors que les anions tels le HCO_3^- et le Cl^- sont soumis à un phénomène de diffusion passive pour équilibrer les charges négatives entre le filtrat et le plasma (Marieb and Lachaine 1999). Sachant que le TCP est le siège de réabsorption de la majorité des substances (eau, glucose, acides aminés, sodium, potassium, chlore et anions organiques) (Lacour 2013), la branche descendante mince réabsorbe également l'eau et les autres branches de l'anse participent aussi à la réabsorption de certaines substances, citons ici le calcium et le magnésium réabsorbés par transport passif.

À la hauteur du tubule distal, de faibles quantités de chlore, calcium, bicarbonate entre autres, sont réabsorbées (Gougoux 2005) alors que l'aldostérone permet la réabsorption du sodium par transport actif primaire. Le tubule collecteur (TC) est, quant à lui, le siège de la réabsorption finale de l'eau via des canaux hydriques; les aquaporines-2 (AQP2), présentées plus en détail au Chapitre 2. Présentes à la membrane apicale des cellules principales du TC, les AQP2 sont contrôlées par un mécanisme hormonal régi par l'hormone antidiurétique (ADH) en réponse au besoin de l'organisme. De plus, l'aldostérone agit ici aussi en favorisant la réabsorption du sodium en contrepartie à la sécrétion des ions potassium. Alors que la créatinine et l'acide urique sont complètement excrétés par les reins, les molécules d'urée présentes dans le filtrat sont réabsorbées de 50 à 60 %. Certaines substances sont aussi excrétées en vue de leurs propriétés chimiques ou le manque de transporteurs qui empêchent leur réabsorption (Marieb and Lachaine 1999).

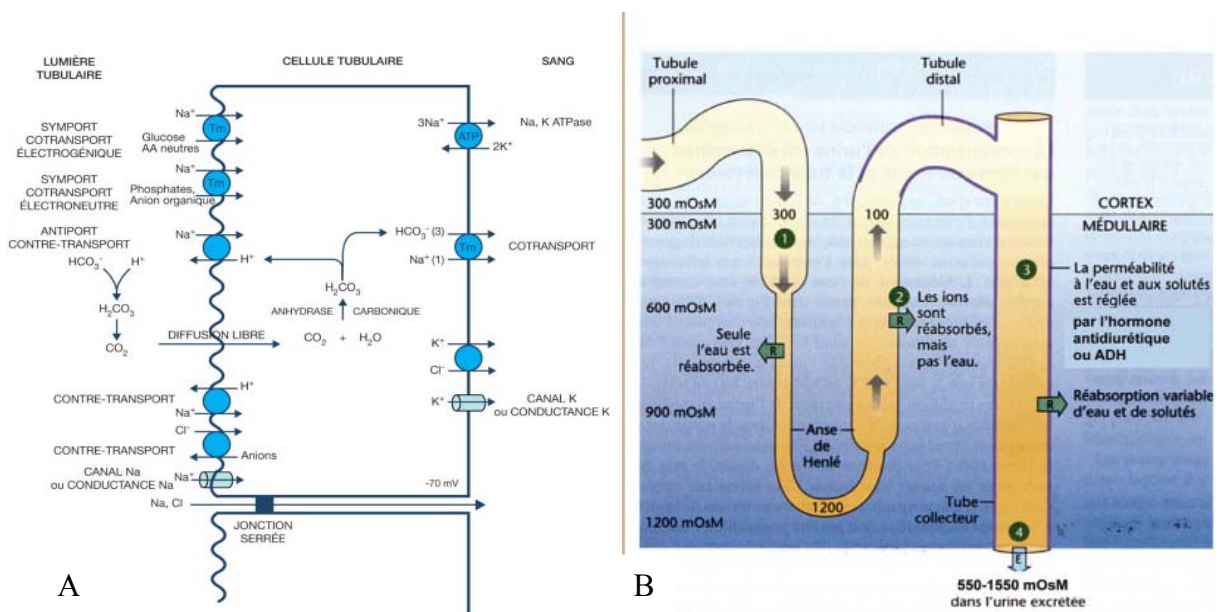


Figure 8 : Schématisation de la sécrétion et de la réabsorption dans les tubules rénaux. Schéma représentant les mécanismes de sécrétion et de réabsorption dans le TCP, ainsi que les différents transporteurs et solutés impliqués (A) et schématisation du phénomène de réabsorption de l'eau et des substances au niveau de l'anse de Henle et du tubule collecteur (B); tirée de (Lacour 2013).

1.4.3. Sécrétion tubulaire

La sécrétion tubulaire, comme la filtration glomérulaire, permet à une substance de passer du milieu sanguin vers la lumière tubulaire. Ce mécanisme assure l'excrétion de l'urée et de l'acide urique ainsi que des substances absentes du filtrat, comme les médicaments. De plus, elle régit le pH sanguin via la sécrétion des ions H^+ dans le TCP et le tubule collecteur cortical, et permet au corps de se libérer de l'excès en ions potassium. À l'image de la réabsorption, la sécrétion tubulaire peut être passive ou active (Marieb and Lachaine 1999) selon que le transport de la substance se fait en faveur ou à l'encontre de son gradient électrochimique à travers les membranes cellulaires.

1.4.4. Mécanismes régulateurs de la concentration urinaire

Les reins ajustent les volumes urinaires aux entrées d'eau, de façon à maintenir constante l'osmolalité plasmatique (≈ 300 mmol/kg) (Marieb and Lachaine 1999). Pour se faire, la production d'une urine hypertonique requiert l'intervention de deux acteurs principaux responsables des mécanismes à contre-courant : les anses de Henle, qui sont des multiplicateurs à contre-courant et les vasa recta qui sont des échangeurs à contre-courant. Ce mécanisme repose essentiellement sur la création et le maintien d'un gradient osmotique entre la lumière tubulaire et l'interstitium médullaire.

En effet, dans la branche descendante de l'anse, l'osmolalité du filtrat qui s'équilibre avec l'interstitium augmente de 300 à 1200 mmol/kg en atteignant la partie la plus profonde de la médulla rénale où s'opère la diffusion de l'eau par osmose vers l'interstice médullaire (Marieb and Lachaine 1999). Alors que dans la branche ascendante épaisse du néphron, la perméabilité s'inverse et les ions Na^+ sont réabsorbés activement tandis que les ions K^+ et Cl^- suivent un transport actif secondaire à travers le cotransporteur $Na^+-K^+-2Cl^-$. Et comme cette partie de l'anse est imperméable à l'eau, le filtrat devient dilué (100 mmol/kg) à l'approche du cortex alors que l'osmolalité du liquide interstitiel médullaire augmente. Ainsi, la différence de perméabilité entre les branches ascendante et descendante engendre un gradient osmotique dont le but est de produire un filtrat hypertonique au point descendant de la branche et hypotonique du côté ascendant de la branche. Cette forte osmolalité interstitielle médullaire permet la réabsorption d'eau tant au niveau de la branche descendante de Henle qu'au tubule

collecteur. Comme la circulation du filtrat dans les branches descendante et ascendante est de sens opposé, le gradient osmotique est maintenu grâce à une addition des variations élémentaires latérales et une multiplication de l'effet final de concentration.

Par ailleurs, les parties médullaires profondes des tubules collecteurs sont aussi perméables à l'urée, ce qui en permet la diffusion vers l'espace interstitiel et contribue aussi à maintenir une osmolalité médullaire élevée.

Les vasa recta perméables à l'eau et aux ions, sont en forme d'épingle et transportent le sang à un rythme très lent. Ces deux facteurs sont cruciaux pour le maintien de l'échange à contre-courant qui empêche l'élimination des gradients de concentration établis dans la médulla rénale. En effet, dans la partie descendante des vasa recta, le NaCl et l'urée sont réabsorbés dans le sang, tandis que l'eau diffuse dans le sens inverse par osmose. Le sang devient donc de plus en plus hypertonique dans la région médullaire. Sur la partie ascendante des vasa recta, le NaCl et l'urée sont sécrétés dans le milieu interstitiel médullaire, tandis que l'eau est réabsorbée. Il en résulte que le sang qui circule dans les vasa recta est presque isoosmotique avec le liquide interstitiel et le gradient osmotique de la médulla est maintenu.

1.4.5. Fonction endocrine du rein

Hormis son rôle principal de filtration et d'épuration du sang, le rein est doté d'une fonction endocrine qui lui permet de synthétiser, sécréter et modifier certaines substances. En effet, la pression artérielle systémique est régulée par la rénine (système rénine angiotensine) dont l'action est vasoconstrictrice, et par la kinine (système kallikréine kinine) dont le rôle est vasodilatateur. De plus, le rein contrôle la production des globules rouges par la moelle osseuse en synthétisant l'érythropoïétine et contribue à la minéralisation osseuse en sécrétant une enzyme qui transforme la vitamine D en sa forme active.

De plus, plusieurs substances extrarénales viennent agir au niveau des reins dont la vasopressine ou hormone antidiurétique (ADH) déjà citée antérieurement, la calcitonine, la PTH et l'insuline, entre autres (Gougoux 2005).

1.5 L'hormone antidiurétique

1.5.1 Synthèse et fonction

L'hormone antidiurétique (ADH), aussi communément nommée arginine vasopressine (AVP), est un polypeptide de neuf acides aminés qui, comme l'ocytocine, est emmagasinée et libérée au niveau de la neurohypophyse. La vasopressine et l'ocytocine ne diffèrent que par deux acides aminés et présentent donc une forte homologie, suggérant ainsi un phénomène de duplication génique et la présence d'un ancêtre commun. Le gène prépro-AVP-neurophysine II (*prepro-AVP-NPII* 2,5 kb) de la région chromosomique 20p13, est exprimé dans les neurones sécrétoires des noyaux supraoptiques et paraventriculaires de l'hypothalamus antérieur, et code pour la synthèse du précurseur de l'AVP (Bichet 2005). Ce dernier est une préprohormone, la prépro-vasopressine formée de 164 acides aminés qui, suite à une cascade de clivage et de maturation au long de son trajet des axones vers l'hypophyse postérieure devient mature. L'hormone active, l'AVP, sera par la suite stockée dans des vésicules de sécrétion. De plus, le clivage du précurseur aboutit à la formation d'un glycopeptide de 39 acides aminés de fonction biologique ambiguë et de la neurophysine II, une protéine de 93 acides aminés, essentielle à la sécrétion hypophysaire de l'AVP (Fig. 9, 10).

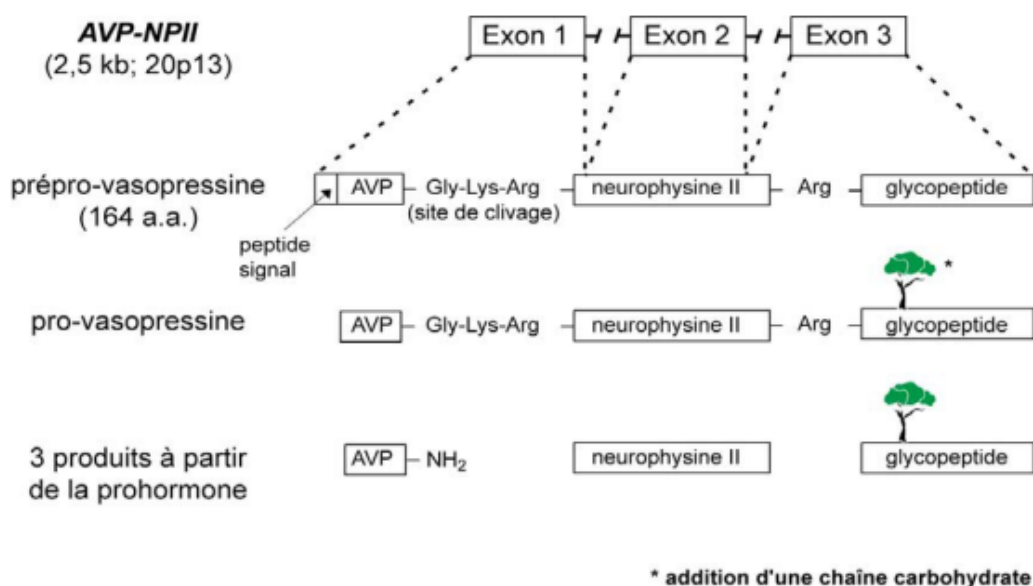


Figure 9 : Schéma représentatif de la synthèse de l'AVP. Synthèse de l'AVP à partir de son gène AVP-NPII et les trois protéines obtenues suite au clivage du précurseur, l'AVP, la neurophysine II et le glycopeptide; tiré de (Bichet 2005).

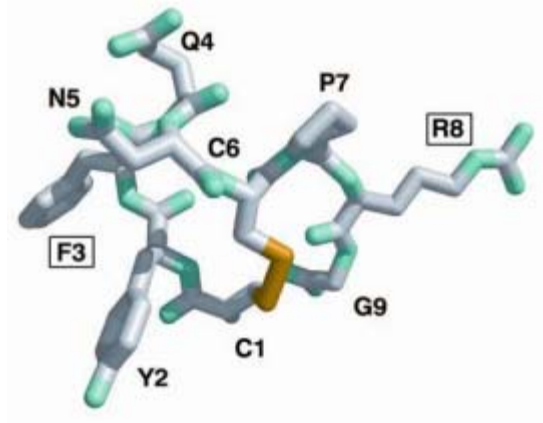


Figure 10 : Structure de l'AVP tirée de (Bichet 2005).

Une des principales actions de l'AVP est de régir les changements de l'osmolalité plasmatique et du volume sanguin. La libération de la vasopressine dans la circulation systémique est donc tributaire de deux stimuli essentiels : une variation de l'osmolalité ou une variation de la volémie. En effet, la vasopressine exerce une sorte de rétroaction qui permet d'ajuster l'osmolalité, en réponse à la détection des variations de concentration sanguine en soluté et en eau, par des osmorécepteurs de l'hypothalamus. Donc, une augmentation de l'osmolalité induit l'exocytose de l'AVP dans le sang qui aura comme effet d'augmenter la réabsorption aqueuse au tubule collecteur par une augmentation de sa perméabilité à l'eau. De même, une chute de la pression artérielle ou du volume sanguin détectée par des barorécepteurs aortiques et carotidiens et de l'oreillette gauche mène à son tour à la sécrétion d'AVP. De plus, elle exerce de multiples fonctions selon les cibles concernées : effet vasoconstricteur, sécrétion d'ACTH et d'aldostérone, agrégation plaquettaire, mitogenèse, entre autres (Bichet 2005). L'AVP est inactivée après sa dégradation par les aminopeptidases présentes dans la majorité des organes et sa demi-vie varie de 10 à 35 minutes (Delmas, Leone et al. 2003).

1.5.2 Les récepteurs de l'hormone antidiurétique

Les sous-types des récepteurs à la vasopressine font partie de la superfamille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G. L'effet observé après la sécrétion de la vasopressine est tributaire de l'emplacement, la densité et la distribution des récepteurs à l'AVP. À ce jour, trois sous-types de récepteurs (**Tab. I**) connus régissent les actions de l'AVP (V1R, V2R et V3R) et sont classés selon le système du second messager auquel ils sont couplés.

Récepteur	Localisation	Propriétés moléculaires	Action
V1R (ancien V1a)	Cellule musculaire lisse des vaisseaux, rein, myomètre, rate, vésicule, testicule, plaquettes, adipocytes, hépatocytes	Activation d'une phospholipase C Libération de calcium intracellulaire	Vasoconstriction
V2R	Tubule collecteur rénal Cellules endothéliales	Couplage à une protéine G ↑ AMPc intracellulaire	Réabsorption rénale de l'eau
V3R (ancien V1b)	Hypophyse	Couplage à une protéine G ↑ AMPc intracellulaire	↑ sécrétion d'ACTH
OTRs (récepteur de l'ocytocine)	Utérus, sein Veine ombilicale, aorte, artère pulmonaire	Activation d'une phospholipase C ↑ calcium cytosolique Libération de NO	Vasodilatation

Tableau I : Tableau récapitulatif des différents récepteurs à la vasopressine. Les récepteurs à l'AVP sont classés selon leurs localisations, leurs fonctions et leurs propriétés moléculaires distinctes; adapté de (Delmas, Leone et al. 2003).

Les récepteurs vasculaires V1 (V1R anciennement connu sous le nom AVPR1a) sont situés sur le muscle lisse vasculaire et contrôlent la vasoconstriction. En outre, les récepteurs V1 se retrouvent au niveau des reins, du myomètre, de la vessie, dans les adipocytes, les hépatocytes, les plaquettes, la rate et les testicules. Les récepteurs V1 couplés aux protéines $G_{\alpha_q/11}$ déclenchent la vasoconstriction par l'activation de la voie de la phospholipase C et la libération du calcium des réserves intracellulaires par la cascade de signalisation du phosphoinositol. Les récepteurs hypophysaires V3 (V3R anciennement connu sous le nom AVPR1b) ont des effets centraux, comme l'augmentation de la production d'ACTH, l'activation de différentes protéines G et l'augmentation de l'AMPc intracellulaire. Ce récepteur est aussi lié à la voie de signalisation du phosphoinositol via la protéine $G_{\alpha_q/11}$ couplée au GTP et active la phospholipase C, avec le calcium intracellulaire en tant que second messager.

Le récepteur rénal V2 (V2R anciennement connu sous le nom AVPR2) de l'AVP est spécifiquement présent dans les cellules principales de la membrane basolatérale du tubule collecteur. En revanche, il est couplé aux protéines Gs qui activent la voie de signalisation de l'adénylate cyclase, avec l'AMPc agissant en tant que médiateur intracellulaire. Cette cascade de signalisation (**Fig. 11**) a pour effet l'augmentation de la perméabilité à l'eau du tubule collecteur et sa rétention (Holmes, Patel et al. 2001, Verbalis 2009).

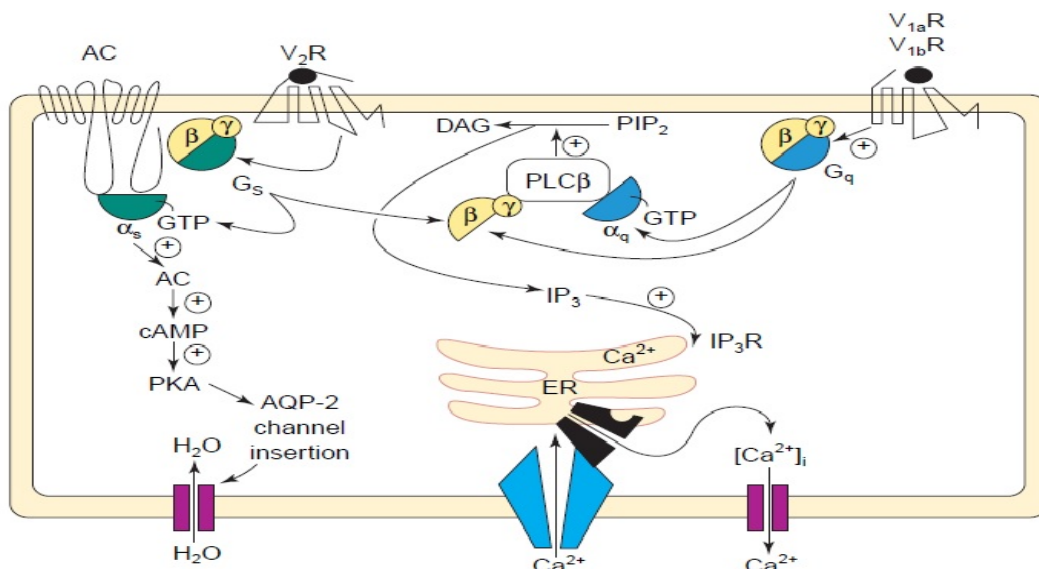


Figure 11 : Représentation de la cascade d'activation des récepteurs à l'AVP. Schéma représentatif de la cascade de signalisation de l'AC et de la phospholipase C, mettant en relief les différents effecteurs impliqués dans la transduction du signal et l'activation des récepteurs à la vasopressine; adaptée de (Birnbaumer 2000).

1.5.2.1 Structure et fonction de l'AVPR2

Le gène humain codant pour le récepteur à la vasopressine VR2 (AVPR2) a été localisé sur la région q28 du chromosome X. Composé de 3 exons et de 2 introns, il possède une taille d'environ 2 kb et code pour un polypeptide de 371 acides aminés dont la structure tertiaire est caractéristique de la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G à 7 passages transmembranaires (GPCR) (Lolait, O'Carroll et al. 1992, Lolait, O'CARROLL et al. 1995). En outre, le récepteur V2 forme un homodimère (Hebert, Moffett et al. 1996) et affiche des caractéristiques structurales qui définissent la plupart des GPCR : sept hélices transmembranaires hydrophobes qui se rejoignent en alternant leurs boucles intracellulaires et extracellulaires, un domaine extracellulaire N-terminal et un domaine cytoplasmique

C-terminal. De plus, ce récepteur possède un site de glycosylation en N-terminal, un pont disulfure entre deux cystéines hautement conservées reliant les deuxième et troisième domaines extracellulaires et un site de palmitoylation sur deux résidus cystéines dans le domaine C-terminal qui semblent être impliqués dans sa stabilité (Birnbaumer 2000).

Le récepteur V2 occupé par son ligand l'AVP, entraîne un changement de conformation qui favorise la dissociation de la protéine Gs-GTP hétérotrimérique en ses sous-unités α et $\beta\gamma$. La sous-unité α stimule l'activité de l'adénylate cyclase (AC) dont quatre isoformes interagissent avec le récepteur V2 (AC4, AC5, AC6 et AC9). L'activation de l'AC induit l'hydrolyse de l'ATP en AMPc qui, à son tour, active la PKA puis déclenche la translocation des vésicules intracellulaires contenant les aquaporines-2 (AQP2) vers la surface apicale des cellules principales du tubule collecteur (Nielsen, Kwon et al. 1999). Ce mécanisme à court terme implique la phosphorylation par la PKA du résidu sérine 256 de la partie C-terminale de la protéine de l'AQP2 (Soloff and Jeng 2003). En revanche, la régulation à long terme implique des mécanismes qui modifient l'abondance de l'AQP2, modulant ainsi le nombre total de canaux à eau dans la cellule. En effet, l'augmentation des niveaux de la sous-unité catalytique de la PKA dans le noyau induit la phosphorylation des facteurs de transcription tels CREB-P (AMPc responsive element binding protein) et c-Jun/c-Fos. Elle comprend aussi un élément de réponse à l'AMPc (CRE; cAMP-responsive element) et un site consensus du facteur de transcription AP1 de la région 5'-non traduite du gène AQP2. L'activation de ces facteurs augmente la transcription du gène de l'AQP2 et donc la quantité de canaux AQP2 présents dans la cellule (Marples, Frøkiaer et al. 1999).

1.5.2.2 Désensibilisation et internalisation de l'AVPR2

L'association du V2R à son ligand déclenche, outre la phosphorylation du récepteur, son internalisation et sa désensibilisation conduisant à une réduction de la réponse cellulaire à l'agoniste (Martin, Lefkowitz et al. 2003). Comme dans le cas d'autres récepteurs couplés aux protéines G, l'extrémité C-terminale du V2R comprend de multiples sites de phosphorylation (résidus sérine et thréonine) et constitue un domaine majeur de régulation de l'interaction des récepteurs aux β -arrestines et leur transport dans la cellule. Cependant, le sort des complexes récepteurs- β -arrestine diffère nettement entre les récepteurs et est tributaire de la stabilité de ce

dernier qui semble réguler le taux de re-sensibilisation du récepteur (Oakley, Laporte et al. 2001). Des études antérieures ont démontré que la phosphorylation de V2R augmente son affinité pour la β -arrestine. Le complexe récepteur- β -arrestine est ensuite internalisé par endocytose dans les puits recouverts de clathrine (CCP) et accumulé dans des vésicules à proximité du noyau (Oakley, Laporte et al. 1999). Dans la majorité des cas, les récepteurs qui se dissocient des β -arrestines sont déphosphorylés et recyclés vers la membrane plasmique. Le récepteur V2R peut aussi être dirigé vers le compartiment lysosomal pour y être dégradé en réponse à l'ubiquitinylation de la lysine 268 (Martin, Lefkowitz et al. 2003).

Les mutations du gène du récepteur V2 de la vasopressine causent un déficit de fonction de ce dernier et sont responsables du diabète insipide néphrogénique lié au chromosome X (Bichet 1997).

1.6 Le diabète insipide

Le diabète insipide (DI) est une maladie qui se traduit par l'inaptitude du rein à concentrer l'urine, induisant du coup une polyurie parfois sévère. Le phénotype d'un patient atteint de DI se traduit par une diurèse élevée (> 30 ml/kg par jour) et une urine hypo-osmolaire (< 250 mmol/kg) (Bichet 2006). Le DI peut-être héréditaire ou acquis et il est le résultat d'une panoplie de facteurs. En effet, on note même l'apparition d'un DI chez la femme enceinte (Babey, Kopp et al. 2011) dû à la synthèse d'une aminopeptidase placentaire qui métabolise l'ocytocine et l'ADH; cet état est réversible après l'accouchement par la prise de dDAVP. Une perturbation du centre de régulation de la soif causant le DI apparaît aussi chez des patients qui souffrent de troubles nerveux (DI psychogène; schizophrénie, syndrome maniaco-dépressif) ou suite à l'atteinte du système nerveux central (DI dipsogène; traumatisme, maladie auto-immune, infection cérébrale) (Bagnis, Baumelou et al. 2000).

Par ailleurs, on distingue deux formes majeures existantes du DI en fonction du gène et/ou de la protéine affectée : le diabète insipide central (DIC) et le diabète insipide néphrogénique (DIN).

1.6.1 Le diabète insipide central

Le diabète insipide central ou neurogénique résulte d'une carence en hormone arginine-vasopressine (Sands and Bichet 2006). Alors que beaucoup de cas de DIC sont considérés comme idiopathiques, la défaillance de l'hypophyse postérieure à synthétiser ou sécréter la vasopressine peut aussi être de nature héréditaire, due à des mutations autosomiques dominantes ou récessives touchant le gène codant pour l'AVP. On note aussi une multitude d'autres facteurs extragéniques incluant les traumatismes après un accident ou une chirurgie, les lésions dues à certaines tumeurs, ou à des maladies inflammatoires, auto-immunes et vasculaires (Maghnie, Cosi et al. 2000). L'administration de dDAVP, un analogue synthétique de l'AVP, est le traitement le plus efficace pour remédier à ce problème, du fait de ses propriétés chimiques (spécificité et effet antidiurétique prolongé) et la facilité de son administration (Robinson 1976).

1.6.2 Le diabète insipide néphrogénique

Le DIN qui se traduit par l'incapacité du rein à répondre adéquatement à la sécrétion d'AVP, est une pathologie qui peut être acquise ou encore transmise héréditairement. Ici, l'hypophyse postérieure est bien stimulée en raison de l'augmentation de l'osmolalité plasmatique et génère une quantité suffisante d'AVP, mais les reins ne réussissent pas à augmenter la perméabilité hydrique du tubule collecteur pour produire une urine concentrée. Ainsi, ils échouent dans la production et/ou le maintien d'un gradient osmotique corticomédullaire qui constitue la force d'entrain du débit hydrique des conduits collecteurs jusqu'à l'interstitium (Makaryus and McFarlane 2006).

Le DIN acquis survient à la suite de traitements ou de désordres électrolytiques ou rénaux (**Tab. II**) : hypokaliémie (Marples, Frøkiær et al. 1996), administration de lithium (Marples, Christensen et al. 1995), de médicaments tels les antibiotiques, les antifongiques et les antinéoplasiques (Moeller, Rittig et al. 2013), l'hypercalcémie chronique, la nicotine, l'alcool, l'insuffisance rénale chronique et les néphropathies interstitielles, entre autres (Bichet 2006). Dans le cas du DIN héréditaire, 90 % des patients sont des hommes présentant une mutation sur le gène codant pour le récepteur de l'hormone antidiurétique (V2R), et donc une hérédité liée au chromosome X. Dans 10 % des cas de DIN héréditaire, il s'agit d'une

transmission génétique autosomique récessive ou autosomique dominante. Les mutations identifiées touchent le gène de l'aquaporine-2 (AQP2) (Morello and Bichet 2001).

DIN (définition restreinte) : la perméabilité à l'eau du canal collecteur rénal n'est pas augmentée par la vasopressine
Héréditaire :
DIN lié à l'X
DIN autosomique récessif
Hypercalcémie
Hypokaliémie
Médicaments :
lithium
déméclocycline
amphotéricine B
méthoxyflurane
diphénylhydantoïne
nicotine
alcool
DIN (définition élargie) : impossibilité d'établir un gradient corticomédullaire rénal
Héréditaire :
syndrome de Bartter
Insuffisance rénale :
aiguë
chronique (surtout néphrite interstitielle et polykystose rénale)
Uropathie obstructive
Altérations de la médullaire rénale :
anémie falciforme
amyloïdose
syndrome de Sjögren
sarcoïdose
hypercalcémie
hypokaliémie
malnutrition protéique
cystinose

Tableau II : Étiologie des diabètes insipides néphrogéniques d'après (Bichet 2006).

1.6.2.1 Le DIN lié au chromosome X

Cette maladie rare (incidence de 8,8 par million d'enfants mâles à la naissance au Québec) (ARTHUS, LONERGAN et al. 2000), constitue la majorité des cas des DIN héréditaires et est tributaire de mutations génétiques touchant le gène qui code pour le récepteur V2 de la vasopressine sur le chromosome X. Les garçons atteints présentent dès la phase néonatale des épisodes de polyurie et de déshydratation sévère, accompagnés de fièvres et de vomissements, et souffrent d'anorexie et d'un retard de croissance (van den Ouweland, Dreesen et al. 1992). Le retard mental est aussi une des conséquences de la déshydratation en absence de traitement précoce. Les mutations sont divisées en cinq classes selon le sort du récepteur muté : la classe I comprend les récepteurs tronqués. La classe II, soit la plus

courante, inclut les récepteurs mal repliés et séquestrés dans les compartiments intracellulaires. La troisième classe regroupe des récepteurs mal repliés qui atteignent la membrane plasmique, mais altèrent le cycle de l'AMPc. Les récepteurs mutés de classe IV atteignent la surface cellulaire, mais ont une faible affinité à la vasopressine. Enfin, les récepteurs de la classe V sont complètement traduits, mais mal acheminés dans la cellule. (Tsukaguchi, Matsubara et al. 1995, Bichet 1998, Babey, Kopp et al. 2011).

À ce jour, 222 mutations du gène de l'AVPR2 ont été établies dans plus de 200 familles atteintes de DIN; 62 % de ces mutations sont faux-sens/non-sens, 25 % sont causées par un décalage du cadre de lecture par suppression ou insertion de nucléotides, 7 % sont des délétions importantes, 4 % sont des délétions ou insertions en phase et 1 % des mutations touchent les sites d'épissage (Morello and Bichet 2001, Moeller, Rittig et al. 2013). Aujourd'hui, on se tourne vers des thérapies plus spécifiques ciblant différentes protéines impliquées dans la cascade de signalisation avec l'emploi de chaperonnes pharmacologiques, d'agonistes et d'antagonistes non peptidiques de la vasopressine, de statines, allant même jusqu'à tenter de contourner le récepteur muté au lieu de l'activer. Cependant, ces thérapies n'ont pas encore fait preuve de succès cliniquement probants (Moeller, Rittig et al. 2013).

1.6.2.2 Le DIN autosomique

Rares sont les cas de DIN congénitaux dus à des mutations dans le gène codant pour l'AQP2. Et contrairement à la forme de la maladie liée au chromosome X, le DIN résultant de mutations de l'AQP2 peut être autosomique récessif (90 %) (Deen, Verdijk et al. 1994) ou autosomique dominant (10 %) (Mulders, Bichet et al. 1998) et atteint les hommes aussi bien que les femmes.

À ce jour, on compte 46 mutations du canal AQP2 recensées (**Tab. III**) et responsables du DIN chez plus que 50 familles distinctes (Bichet, El Tarazi et al. 2012, Moeller, Rittig et al. 2013). Les mutations autosomiques récessives qui sont situées sur toute la longueur du gène de l'AQP2, engendrent des protéines qui sont séquestrées dans le réticulum endoplasmique en raison de leur mauvais repliement et sont destinées à la dégradation. En revanche, les mutations dominantes sont exclusives à l'extrémité C-terminale de la protéine et sont retenues

au complexe golgien (Mulders, Bichet et al. 1998). Les études démontrent aussi que les mutations dominantes sont capables de former des hétérotétramères avec l'AQP2 sauvage, mais ceux-ci sont retenus à l'intérieur de la cellule, empêchant la protéine d'atteindre la membrane apicale; c'est le principe de *dominance négative* qui caractérise les mutations dominantes de l'AQP2. (Marr, Bichet et al. 2002, Marr, Bichet et al. 2002). Au regard de la maladie, les patients porteurs de mutations dominantes ont un phénotype moins sévère par rapport à ceux présentant des mutations récessives. 82 % des mutations autosomiques sont des faux-sens/non-sens, 5 % sont des mutations d'épissage et 13 % résultent d'un décalage du cadre de lecture en raison des délétions ou des insertions de nucléotides (Bichet, El Tarazi et al. 2012, Moeller, Rittig et al. 2013).

Traiter les patients atteints de DIN pose encore des problèmes majeurs. Cependant, pour les formes secondaires à la prise de médicaments et/ou liées à des troubles métaboliques, l'arrêt du traitement ou le rétablissement renverse souvent en quelques semaines la résistance rénale à la vasopressine (Baylis and Cheetham 1998). Par contre, les formes héréditaires de diabète insipide sont particulièrement difficiles à gérer; l'administration de dDAVP est généralement inefficace et la prise de grande quantité d'eau affecte la qualité de vie du patient. Cependant, une thérapie qui consiste en une diète restreinte en sel combinée avec un traitement aux thiazides peut aider en dépit de leur effet diurétique. Les thiazides diminuent l'absorption du sodium et du chlore à l'extrémité tubule distal en bloquant le cotransporteur Na-Cl, ce qui permet une plus grande absorption de sodium dans le tubule proximal suivie d'une réabsorption d'eau via l'AQP1 (Makaryus and McFarlane 2006, Moeller, Rittig et al. 2013).

Count	No. of families	Name of mutation	Domain	Nucleotide change	Predicted consequence	Reference	
Missense [25]							
1	1	M11	NH2	ATG-to-ATT	Met-to-Ile	Sahakitrungruang et al. [26]	
2	1	L22V	TMI	CTC-to-GTC	Leu-to-Val	Canfield et al. [27]	
3	1	V24A	TMI		Val-to-Ala	Leduc-Nadeau et al. [22]	
4	1	L28P	TMI	CTC-to-CCC	Leu-to-Pro	Marr et al. [28]	
5	1	G29S	TM1		Gly-to-Ser	Sahakitrungruang et al. [26]	
6	2	A47V	TMII	GCG-to-GTG	Ala-to-Val	Marr et al. [28]; Muller et al. [29]	
7	2	Q57P	TMII	CAG-to-CCG	Glu-to-Pro	Lin et al. [24]	
8	1	G64R	CII	GGG-to-AGG	Gly-to-Arg	van Lieburg et al. [30]	
9	1	N68S	CII	AAC-to-AGC	Asn-to-Ser	Mulders et al. [31]	
10	1	A70D	CII	GCC-to-GAC	Ala-to-Asp	Cheong et al. [32]	
11	2	V71M	CII	GTG-to-ATG	Val-to-Met	Marr et al. [28]	
12	2	G100V	TMIII	GGA-to-GTA	Gly-to-Val	Lin et al. [24]	
13	1	G100R	TMIII	GGA-to-AGA	Gly-to-Arg	Carroll et al. [33]	
14	1	I107D	EII	ATC-to-AAC	Ile-to-Asp	Zaki et al. [34]	
15	1	T125M	EII	ACG-to-ATG	Thr-to-Met	Goji et al. [35]; Kuwahara [36] (same family)	
16	1	T126M	EII	ACG-to-ATG	Thr-to-Met	Mulders et al. [31]	
17	1	A147T	TMIV	GCC-to-ACC	Ala-to-Thr	Mulders et al. [31]	
18	2	D150E	ICII	GAT-to-GAA	Asp-to-Glu	Guyon et al. [21]; Iolascon et al. [37]	
19	1	V168M	TMV	GTG-to-ATG	Val-to-Met	Vargas-Poussou et al. [38]	
20	1	G175R	TMV	GGG-to-AGG	Gly-to-Arg	Goji et al. [35]; Kuwahara [36] (same family); Boccalandro et al. [39]	
21	1	G180S	EIII	GGC-to-AGC	Gly-to-Ser	Carroll et al. [33]	
22	1	C181W	EIII	TGC-to-TGG	Cys-to-Trp	Canfield et al. [27]	
23	1	P185A	EIII	CCT-to-GCT	Pro-to-Ala	Marr et al. [28]	
24	3	R187C	EIII	CGC-to-TGC	Arg-to-Cys	Deen et al. [17]; van Lieburg et al. [30]; de Mattia et al. [40]; Leduc-Nadeau et al. [22]	
25	1	R187H	EIII	CGC-to-CAC	Arg-to-His	Cheong 2005 #1846 [32]	
26	1	A190T	EIII	GCT-to-ACT	Ala-to-Thr	Kuwahara [36]; de Mattia et al. [40]	
27	1	G196D	EIII	GGC-to-GAC	Gly-to-Asp	Guyon et al. [21]	
28	1	W202C	EIII	TGG-to-TGT	Trp-to-Cys	Oksche et al. [41]	
29	1	G215C	TMVI	GGC-to-TGC	Gly-to-Cys	Iolascon et al. [37]	
30	2	S216P	TMVI	TCC-to-CCC	Ser-to-Pro	Deen et al. [17]; Vargas-Poussou et al. [38]	
31	1	S216F	TMVI	TCC-to-TTC	Ser-to-Phe	Maan et al. [42]	
32	1	K228E	CIV		Lys-to-Glu	Leduc-Nadeau et al. [22]	
33	1	R254Q	CIV	CGG-to-CAG	Arg-to-Gln	Robertson et al. [25]; Savelkoul et al. [43]	
34	1	R254L	CIV	CGG-to-CTG	Arg-to-Leu	de Mattia et al. [40]; de Mattia et al. [44]	
35	1	E258K	CIV	GAG-to-AAG	Glu-to-Lys	Mulders et al. [45]; Kamsteeg et al. [46]; Kamsteeg et al. [47]; Kamsteeg et al. [48]	
36	2	P262L	CIV	CCG-to-CTG	Pro-to-Leu	Kuwahara [36]; de Mattia et al. [40]	
Nonsense [2]							
1	2	R85X	CII	CGA-to-TGA	Arg-to-stop	Vargas-Poussou et al. [38]; Bircan et al. [49]	
2	1	G100X	TMIII	GGA-to-TGA	Gly-to-stop	Hochberg et al. [50]	
Frameshift [6]							
1	1	369delC	EII	1bp deletion	Stop at Codon 131	van Lieburg et al. [30]	
2	1	721delG	CIV	1 bp deletion	Post-elongation	Kuwahara et al. [51]; Ohzeki et al. [52]	
3	1	727delG	CIV	1 bp deletion	Post-elongation	Marr et al. [53]	
4	1	763-772del	CIV	10 bp deletion	Post-elongation	Kuwahara et al. [51]	
5	1	779-780insA	CIV	1 bp insertion	Post-elongation	Kamsteeg et al. [54]	
6.	1	812-818del	CIV	7 bp deletion	Post-elongation	Kuwahara et al. [51]	
Splice-site [2]							
1	1	IVS2-1G>A	NA	G-to-A	NA	D. G. Bichet et al., unpublished	
2	1	IVS3+1G>A	NA	G-to-A	NA	Marr et al. [53]	
46	53	Note: a family was counted only once if the affected child was homozygous or if the affected child was compound heterozygous					

Tableau III : Liste des 46 mutations autosomiques dominantes et récessives responsables du DIN humain répertoriées à ce jour d'après (Bichet, El Tarazi et al. 2012).

1.7 Les aquaporines

Les aquaporines (AQP) constituent une vaste famille de protéines transmembranaires dotées d'une grande aptitude pour le passage de l'eau et de petites molécules à travers la bicouche lipidique. Elles sont omniprésentes dans les cinq règnes d'organismes vivants (**Fig. 12, page 28**), confirmant ainsi la nécessité de l'homéostasie hydrique pour les êtres vivants. Les aquaporines sont connues pour leur implication dans de nombreux mécanismes physiologiques et pathologiques.

1.7.1 Historique

L'eau, considérée comme le solvant de la vie, constitue 70 % du poids du corps humain, ce qui la rend la composante majeure de toutes cellules et tissus. Il en est de même chez les autres vertébrés, les invertébrés, les microbes et les plantes (Agre and Kozono 2003). Alors que le transport de l'eau à travers les bicouches lipidiques se réduisait à la simple théorie de la diffusion, plusieurs circonstances expérimentales ont démontré la présence d'un processus plus complexe et plus rapide qui a changé ce consensus. En effet, c'est en 1987 qu'un groupe de chercheurs dirigé par Peter Agre a fait une découverte capitale en purifiant une protéine membranaire qui possède une puissante perméabilité à l'eau dans les membranes érythrocytaires. En étudiant l'antigène Rh des érythrocytes, Agre et son équipe ont fait la découverte inopinée des aquaporines en utilisant une technique de purification des protéines Rh qui a révélé la présence d'un contaminant à 28 kDa de fonction inconnue (Agre, Saboori et al. 1987). Par la suite, la structure tétramérique de la protéine de 28 kDa a été définie (Smith and Agre 1991) et sa séquence N-terminale a été utilisée pour cloner un ADNc qui code pour un polypeptide de 269 acides aminés à partir d'une banque de cellules érythrocytaires (Preston and Agre 1991). Cette protéine, fortement abondante chez les cellules érythrocytaires et dans les tubules rénaux proximaux, fut initialement baptisée CHIP28 (Channel forming Integral Protein of 28 kDa) (Carbrey and Agre 2009).

Le rôle de CHIP28 fut établi en 1991, quand Agre et ses collaborateurs ont exprimé CHIP28 dans des ovocytes de grenouille *Xenopus laevis*. Les ovocytes, qui normalement possèdent une faible perméabilité à l'eau, se gonflaient puis éclataient lorsqu'incubés dans un

milieu hypotonique, une fois injectés d'ARNm de CHIP28 (Preston, Carroll et al. 1992). Ainsi, l'induction de la perméabilité à l'eau imputable à CHIP28 a fourni la première preuve sur l'existence de canaux à eau, désignés dorénavant sous le nom d'« Aquaporines »; CHIP28 devenait ainsi aquaporine-1 ou AQP1 (Agre, Sasaki et al. 1993). Cette percée historique et les travaux qui s'ensuivirent ont valu à Peter Agre le prix Nobel de chimie en 2003 et levèrent le rideau sur cette nouvelle famille de protéines membranaires qui compte aujourd'hui 13 membres chez les mammifères (AQP0-12) et plus de 200 homologues chez les autres organismes vivants (Schrier and Cadnapahornchai 2003).

1.7.2 La répartition des aquaporines

Aujourd'hui, on dénombre treize aquaporines au sein du groupe des mammifères. Dotées de structures très similaires, chacune de ces aquaporines possède toutefois une distribution tissulaire et sous-cellulaire unique (King, Kozono et al. 2004). En se basant sur les caractéristiques de perméabilité qui coïncident généralement avec certains motifs de séquence d'acides aminés spécifiques, on peut diviser la famille des aquaporines en trois groupes (Rojek, Praetorius et al. 2008) : les canaux exclusivement sélectifs à l'eau sont les aquaporines orthodoxes ou classiques qui regroupent AQP0, AQP1, AQP2, AQP4 et AQP5, les canaux perméables à l'eau, au glycérol et/ou autres petites molécules dites aquaglycéroporines qui comprennent AQP3, AQP7, AQP9 et AQP10, et un troisième groupe englobant les aquaporines non orthodoxes qui comprend AQP6, AQP8, AQP11 et AQP12. Bien que la séquence de l'AQP6 soit similaire au groupe sélectif à l'eau, les observations de conductance ont plutôt démontré sa perméabilité aux anions. L'AQP8, qui laisserait possiblement passer l'urée et l'eau, possède une séquence intermédiaire entre celles du groupe d'aquaporines classiques et celles du groupe des aquaglycéroporines (King, Yasui et al. 2000). Les AQP11 et AQP12 ne sont pas encore bien définies.

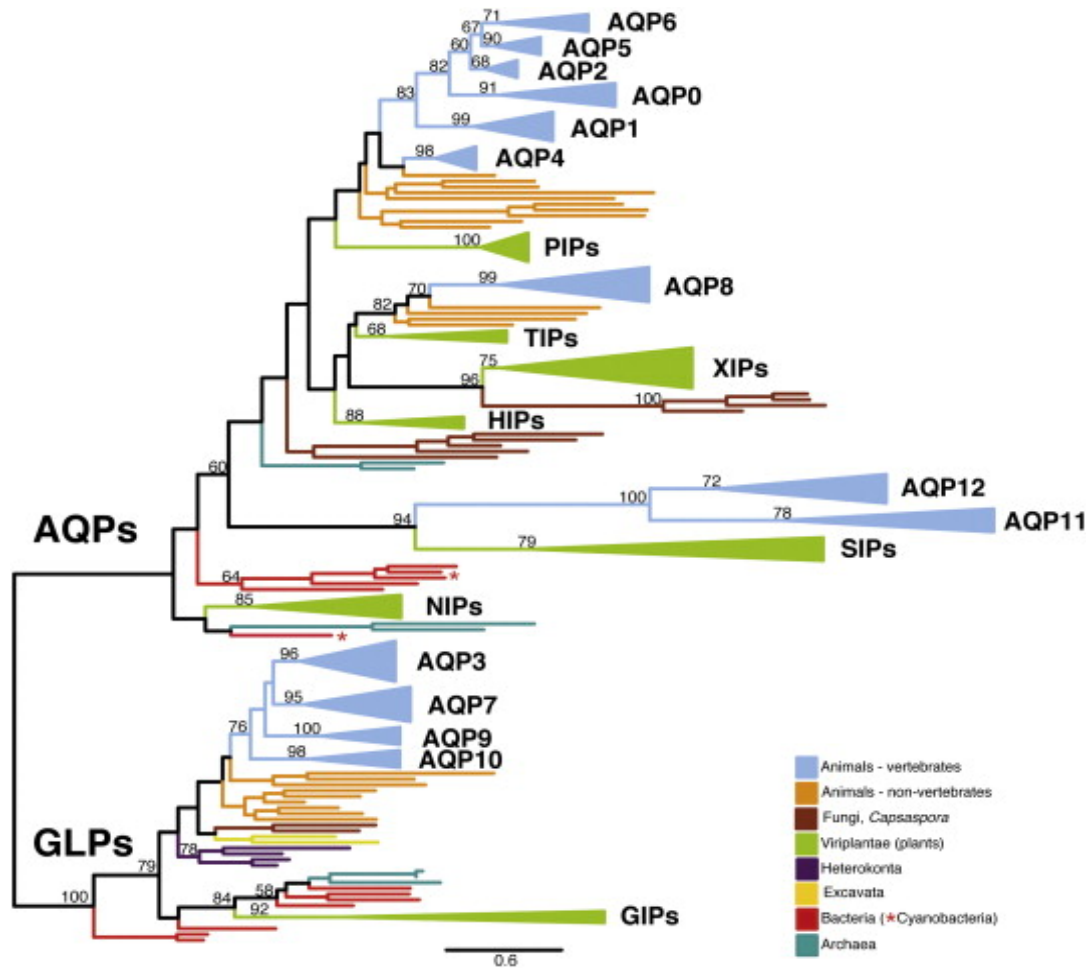


Figure 12 : Arbre phylogénétique de la famille des protéines MIP et leurs sous-groupes. Les couleurs des branches correspondent aux différents règnes expliqués dans la légende; tiré de (Abascal, Irisarri et al. 2013).

1.7.3 La structure générale des aquaporines

De grands efforts ont été déployés dans le but de déterminer la structure (**Fig. 13**) de l'AQP1, vu ses spécificités uniques de perméabilité et de transport. Les premières analyses biochimiques de l'AQP1 humaine ont révélé que cette protéine de 28 kDa exhibait des caractéristiques communes à d'autres protéines canal (Smith and Agre 1991). Comportant 269 acides aminés, l'AQP1 présente six domaines transmembranaires constitués de deux répétitions en tandem de trois hélices alpha traversant la membrane avec des extrémités N et C-terminales situées du côté cytoplasmique de la membrane. On trouve aussi deux boucles hautement conservées entre tous les membres de la famille des AQPs (B extracellulaire et E intracellulaire) contenant chacune la séquence consensus asparagine-proline-alanine (NPA)

(Preston, Jung et al. 1994, Murata, Mitsuoka et al. 2000). Les boucles B et E se replient de façon opposée dans la bicouche lipidique et interagissent de par leurs séquences NPA, pour former une partie de la surface du pore aqueux. Les hélices 2 et 5 ainsi que les moitiés C-terminales des hélices 1 et 4 forment le reste de la surface du pore (Jung, Preston et al. 1994, King, Kozono et al. 2004). Plusieurs études ont permis l'élaboration de la structure 3D de l'AQP1, dont la cristallographie (Cheng, Van Hoek et al. 1997, Li, Lee et al. 1997, Walz, Hirai et al. 1997). De plus, nombreuses observations ont permis de démontrer la structure homotétramérique des aquaporines qui, contrairement à nombre de canaux ioniques, contient quatre pores aqueux indépendants, un par monomère, et non pas un pore central créé par l'ensemble des sous-unités (Smith and Agre 1991, Jung, Preston et al. 1994, King, Kozono et al. 2004). L'AQP1, comme les autres aquaporines, présente aussi une glycosylation, possiblement sur un seul des quatre monomères constitutifs (Nielsen, Frøkiær et al. 2002). La cystéine en position 189, présente à proximité du motif NPA en position C-terminale, est responsable de la sensibilité de la protéine au mercure (Preston, Jung et al. 1993).

Parallèlement aux études sur l'AQP1, Fu et son équipe ont réussi à obtenir une structure cristalline à haute résolution (2.2Å) de GlpF, l'analogue de l'AQP1 chez E. Coli, et qui s'est avérée être similaire à quelques différences près à celle de l'AQP1 (Fu, Libson et al. 2000, Nielsen, Frøkiær et al. 2002).

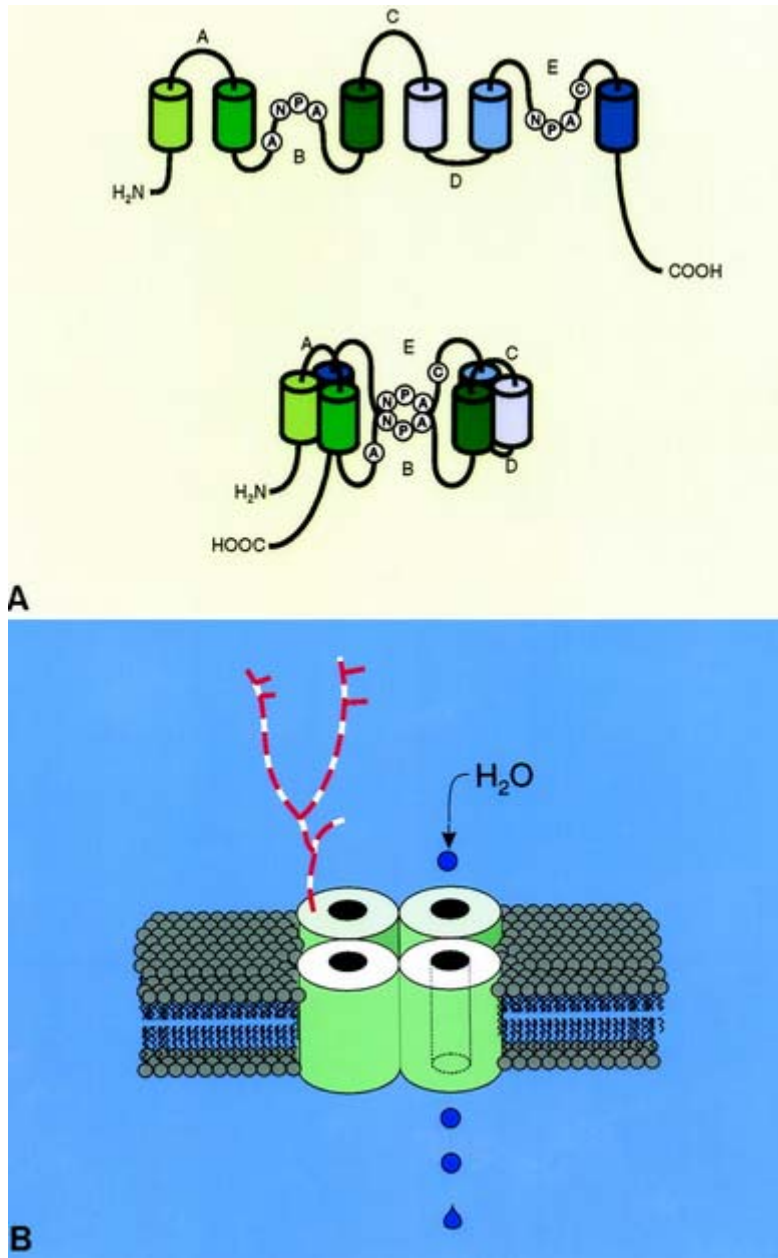


Figure 13 : Schéma représentatif de l'architecture de l'AQP1. (A) représente le monomère d'AQP1 avec ses caractéristiques structurales : protéine à six passages transmembranaires, queue N- et C-terminales intracytoplasmiques, les deux motifs NPA ainsi que le repliement des hélices B et E qui confère au canal son modèle de sablier. La figure (B) représente une schématisation d'un tétramère d'AQP1 dont chacun des monomères comprend un pore aqueux et la présence de la N-glycosylation sur un seul des monomères; tiré de (Nielsen, Frøkiær et al. 2002).

1.7.4 La structure et la spécificité de transport du pore

Une des caractéristiques remarquables de l'AQP1 est sa grande capacité de transport de l'eau qui s'élève à 3×10^9 molécules/monomère/seconde (Zeidel, Ambudkar et al. 1992, Nielsen, Frøkiær et al. 2002). À ceci, on ajoute la très haute sélectivité de ce canal au passage de l'eau au détriment des autres molécules ou solutés, en particulier les protons. Des analyses et des études structurales (**Fig. 14**) ont permis de mettre au clair le mécanisme essentiel derrière cette sélectivité à l'eau et la restriction au passage des ions et protons (de Groot and Grubmüller 2001, Tajkhorshid, Nollert et al. 2002) via le rétrécissement du canal à un diamètre de 3 Å à environ 8 Å au-dessus du centre de la bicouche qui limite physiquement la taille des molécules qui peuvent le traverser, quoique, adéquat au passage de l'eau. De plus, un résidu d'arginine hautement conservé (R195) (Kozono, Yasui et al. 2002) fournit une charge positive fixe au point de ce rétrécissement et exerce une répulsion électrostatique envers les protons et l'ion hydronium, H_3O^+ . La deuxième barrière à la conduction des protons est due à l'orientation d'une paire de dipôles formée par les demi-hélices des boucles B et E et les deux résidus asparagines hautement conservés (N76 et N192) du motif NPA. Ces dipôles interagissent avec les molécules d'eau qui du coup se réorientent et empêchent les liens hydrogène aux molécules d'eau adjacentes. Il en résulte que l'eau peut facilement traverser le canal membranaire sous forme d'une colonne unique et continue, sans permettre le déplacement d'ions H^+ (Murata, Mitsuoka et al. 2000, Kozono, Yasui et al. 2002, De Groot, Frigato et al. 2003).

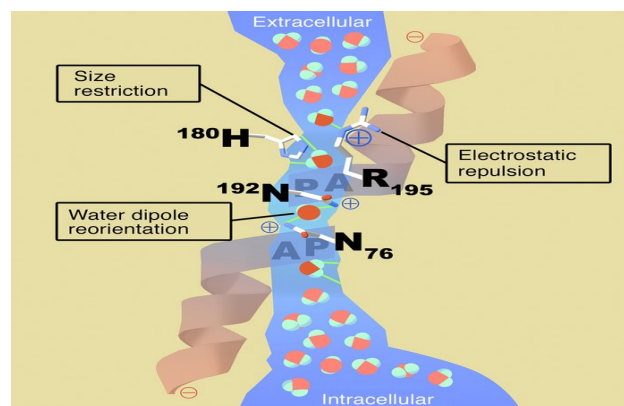


Figure 14 : Sélectivité du pore aqueux. Schématisation d'une coupe sagittale de l'AQP1 démontrant la sélectivité du pore à l'eau de par son diamètre de 2,8 Å quasi = à celui d'une molécule d'eau, le résidu R195 et les charges partielles des dipôles imposent une barrière au passage des protons et l'ion H_3O^+ , induisant la réorientation des molécules d'eau qui passent en une colonne unique et continue; adaptée de (Kozono, Yasui et al. 2002).

1.7.5 Distribution et rôle des aquaporines

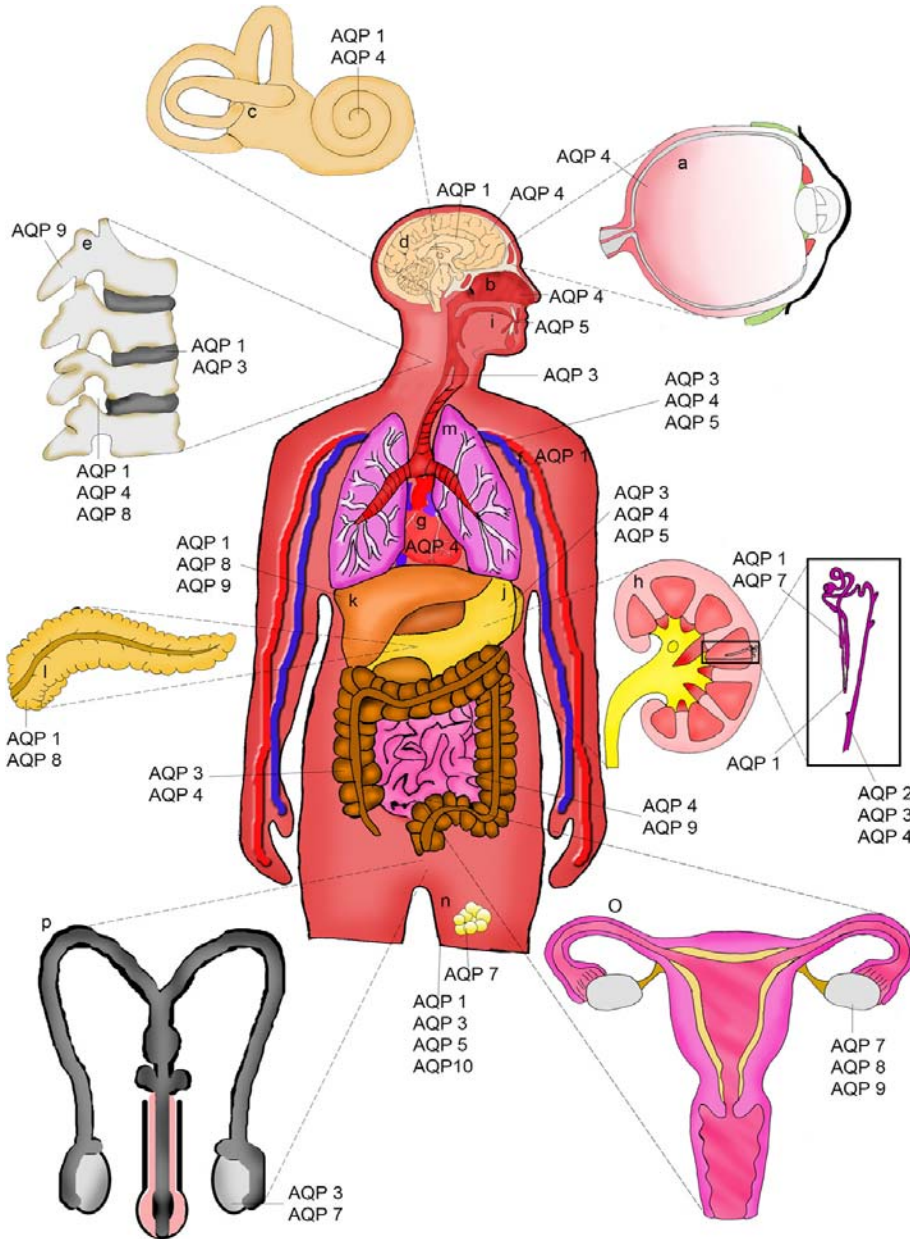


Figure 15 : Distribution ubiquitaire des aquaporines chez l'homme. Représentation schématique de la distribution tissulaire des différentes aquaporines impliquées dans le transport de l'eau à travers le corps humain; tirée de (Day, Kitchen et al. 2013).

1.7.5.1 AQP0

AQP0 (aussi appelée MIP) constitue 50 % des protéines membranaires dans les cellules des fibres de la lentille oculaire. En plus de fonctionner comme un canal à eau à faible perméabilité, cette protéine semble être dotée d'un rôle structural comme molécule d'adhésion entre les cellules (Agre, King et al. 2002). Le pH et le calcium sont les deux modulateurs de l'AQP0 (Hachez and Chaumont 2010), et les mutations de cet isoforme peuvent causer la cataracte (Mulders, Preston et al. 1995).

1.7.5.2 AQP1

Les études qui ont suivi la découverte de l'AQP1 ont permis de mettre à jour son importance dans le maintien de l'homéostasie globale du corps humain. Outre sa présence au rein (tubules proximaux, anse descendante de Henle et vasa recta) où elle seule est responsable du transport transépithélial de l'eau, l'AQP1 a été identifiée dans plusieurs organes et tissus : dans l'œil, les globules rouges, le plexus choroïde, le foie, les poumons, le placenta, le cœur, le pancréas et dans différents endothéliums capillaires, entre autres (Mulders, Van Lieburg et al. 1996, Agre, King et al. 2002). De plus, des travaux plus récents ont démontré l'implication de l'AQP1 dans la migration cellulaire, un dénominateur commun à plusieurs phénomènes biologiques, dont l'angiogenèse et les métastases tumorales (Saadoun, Papadopoulos et al. 2005).

1.7.5.3 AQP3

L'AQP3 fait partie de la famille des aquaglycéroporines et, outre le transport de l'eau, l'AQP3 est perméable au glycérol et à l'urée (Echevarria, Windhager et al. 1994, Ishibashi, Sasaki et al. 1994). Initialement découverte dans le rein, elle est constitutivement présente à la membrane basolatérale du tubule collecteur où elle permet le passage de l'eau vers le milieu interstitiel (Ecelbarger, Terris et al. 1995). De plus, la présence de l'AQP3 dans plusieurs autres organes et tissus (œil, peau, voies respiratoires, côlon, cerveau, vessie, trachée) met en relief l'importance de son rôle dans l'homéostasie du corps ainsi que dans la prolifération et la migration cellulaire et l'hydratation de la peau (Frigeri, Gropper et al. 1995, Mulders, Van Lieburg et al. 1996, Nielsen, King et al. 1997, Agre, King et al. 2002, Verkman 2008).

1.7.5.4 AQP4

À l'instar de l'AQP3, l'AQP4 est aussi retrouvée de façon constitutive à la membrane basolatérale des cellules principales du tubule collecteur, où elle est essentiellement responsable du transport de l'eau dans la médullaire interne (Noda, Sohara et al. 2010). Mais c'est surtout au niveau du cerveau que sa présence est prédominante et que son rôle est crucial. En effet, elle participe au maintien de l'équilibre hydrique du cerveau, dans la migration des cellules gliales, et dans la transduction du signal neuronal (Verkman, Binder et al. 2006). Caractérisée par son insensibilité au mercure (Agre, King et al. 2002), l'AQP4 est aussi impliquée dans l'œdème cérébral vasogénique et cytotoxique (Papadopoulos and Verkman 2007) en plus d'être présente dans l'œil, l'intestin et les poumons (Mulders, Van Lieburg et al. 1996).

1.7.5.5 AQP5

Clonée en 1995, l'AQP5 occupe une place stratégique à la membrane apicale des glandes sécrétrices telles les glandes lacrymale et salivaire où elle participerait à la formation de larmes et de salive, ainsi que dans certains organes comme les poumons, la trachée et les yeux. Le syndrome de Sjögren qui s'explique par l'absence de salive ou de larmes est une condition auto-immune qui semble être associée à l'AQP5 (Mulders, Van Lieburg et al. 1996, Agre, King et al. 2002).

1.7.5.6 AQP6

L'AQP6 présente certaines caractéristiques distinctives dont le transport d'anions. De plus, elle est localisée près de la pompe H^+ -ATPase dans les vésicules intracellulaires des cellules intercalaires de type α du tubule collecteur, impliquées dans la régulation acido-basique rénale. Ceci suggère que l'AQP6 joue un rôle dans la sécrétion urinaire d'acide (Yasui, Hazama et al. 1999, Yasui, Kwon et al. 1999).

1.7.5.7 AQP7

Cette aquaglycéroporine, qui a été identifiée en premier lieu dans les testicules et le tissu adipeux (Rojek, Praetorius et al. 2008), se retrouve aussi à la membrane en bordure en brosse du tubule proximal (Noda, Sohara et al. 2010). Les études démontrent l'implication de

l'AQP7 dans le mécanisme de réabsorption de glycérol dans le rein, ainsi que son rôle dans le métabolisme des lipides, comme voie de sortie de celui-ci lors de la gluconéogenèse (Agre, King et al. 2002). De plus, Liu et ses collaborateurs suggèrent que l'AQP7 est une voie d'entrée de l'arsénite dans les cellules chez les mammifères.

1.7.5.8 AQP8

L'AQP8 fut clonée en 1997 par homologie. Elle est présente au système digestif des mammifères (les glandes salivaires, le foie, le pancréas, l'intestin grêle et le côlon), dans les testicules, le cœur, les reins et les voies respiratoires. Sa spécificité de transport est fonction de l'espèce dans laquelle elle se trouve; ainsi elle est uniquement perméable à l'eau chez l'homme alors qu'elle transporte aussi l'urée chez le rat et la souris (Elkjær, Nejsun et al. 2001, Yang, Song et al. 2005).

1.7.5.9 AQP9

L'AQP9 est un membre de la famille des aquaglycéroporines. Outre sa perméabilité à l'eau et au glycérol, l'AQP9 permet aussi le passage d'une variété de petits solutés non chargés (Rojek, Skowronski et al. 2007). Initialement découverte dans les hépatocytes en 1998 (Tsukaguchi, Shayakul et al. 1998) et dans les leucocytes (Ishibashi, Kuwahara et al. 1998), l'AQP9 se retrouve dans différents tissus et organes comme le système reproducteur mâle, dans le cerveau, la rate et la moelle épinière du rat et dans l'épiderme de la souris, alors que son rôle reste encore ambigu à ces niveaux (Rojek, Skowronski et al. 2007).

1.7.6 AQP10

Hatakeyama et ses collègues furent les premiers à cloner l'AQP10 et à préciser sa localisation. En effet, l'AQP10 a été retrouvée dans le tractus gastro-intestinal; et plus précisément de façon exclusive au duodénum et du jéjunum (Badaut, Lasbennes et al. 2002). Bien que sa structure soit similaire à celle des aquaglycéroporines, l'AQP10 est imperméable au glycérol et à l'urée et sa perméabilité à l'eau est compromise en présence du mercure. Alors que certaines observations démontrent une distribution plus large de l'AQP10; au niveau du côlon chez le chien et des tissus orofaciaux chez l'homme, d'amples études sont nécessaires afin de bien la caractériser (Wang, Hart et al. 2003, Ishibashi 2009).

1.7.6.1 AQP11

L'AQP11 fait partie de la famille des supraquaporines. Cette classe d'AQPs est caractérisée par une différence structurale au niveau des motifs NPA et un taux d'homologie inférieur à 20 % par rapport aux autres AQPs (Ishibashi, Koike et al. 2009). Alors que sa fonction et sa spécificité de transport restent encore inconnues, l'AQP11 est retrouvée dans de nombreux organes, notamment les testicules, mais aussi au foie, au cerveau, et dans les reins, entre autres. Chez les souris déficientes en AQP11, les études ont révélé un phénotype de reins polykystiques, causant la mort de ces dernières (Gorelick, Praetorius et al. 2006, Ishibashi, Hara et al. 2009). Des travaux supplémentaires sont toutefois nécessaires pour mettre au clair le rôle et les propriétés de transport de l'AQP11.

1.7.6.2 AQP12

Comme l'AQP11, l'AQP12 appartient au groupe des supraquaporines. Sa fonction exacte demeure inconnue et les études ont démontré sa rétention dans le domaine intracellulaire (Itoh, Rai et al. 2005). Sa présence exclusive dans les cellules acinaires du pancréas est, à ce jour, l'information la plus substantielle à son sujet (Ishibashi, Hara et al. 2009).

2. Aquaporine-2

L'AQP2 fut cloné en 1992 par l'équipe de Fushimi et ses collaborateurs sous le nom de WCH-CD à partir d'une banque issue de tubules collecteurs de rat (Fushimi, Uchida et al. 1993). La nomenclature AQP2 survint un peu plus tard dans un article de Peter Agre dans lequel il proposa le nom d'aquaporine à cette nouvelle classe de canaux membranaires (Agre, Sasaki et al. 1993). La communauté scientifique s'est rapidement intéressée à cette nouvelle protéine et plusieurs laboratoires ont œuvré à sa caractérisation. Les études indiquent que le gène d'AQP2 humain, présent sur le chromosome 12q13, comprend quatre exons et trois introns et code pour un polypeptide de 271 acides aminés (Sasaki, Fushimi et al. 1994, Ma, Yang et al. 1996, Ma, Yang et al. 1997). Tout comme les autres AQPs, le modèle du sablier s'applique à l'AQP2, où chacun de ses 4 monomères constitutifs est formé de 6 domaines transmembranaires comprenant 2 motifs NPA avec des segments N-terminal et C-terminal intracellulaires et un pore permettant le passage de l'eau. Notons d'ailleurs que sa structure à haute résolution (2.75 Å) a été générée tout dernièrement (Frick, Eriksson et al. 2014). La protéine de 29 kD présente aussi une forme de haut poids moléculaire (35–50 kDa) qui correspond à l'ajout d'une N-glycosylation sur l'asparagine 124 (Schenk, Werten et al. 2005, Sasaki 2012).

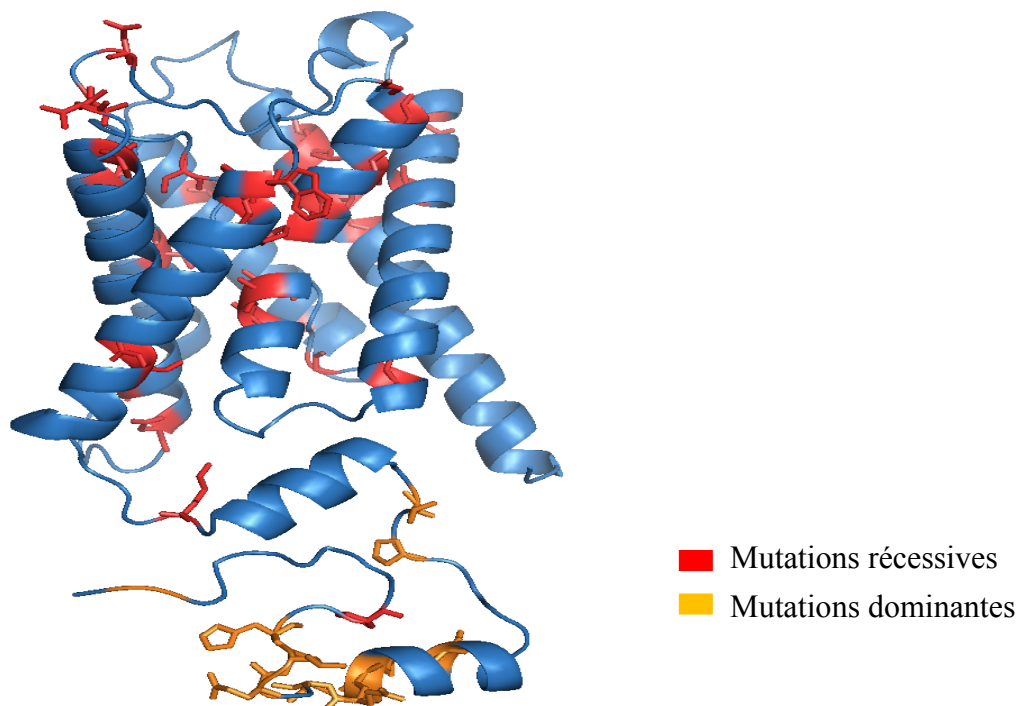


Figure 16 : Structure tertiaire de l'aquaporine-2 (générée par Pymol). Les mutations récessives (en rouge) occupent l'espace extracytoplasmique alors que les mutations dominantes (en jaune) se retrouvent dans la queue C-terminale.

2.1 Protéosynthèse

La vasopressine contrôle l'équilibre hydrique du corps par deux mécanismes différents faisant appel à l'aquaporine-2. Un mécanisme à court terme, déterminé par le trafic des vésicules d'AQP2 déjà existantes vers la membrane apicale, et une régulation à long terme faisant appel à la synthèse d'AQP2, changeant ainsi le nombre total de canaux dans la cellule (Nielsen, Kwon et al. 1999). Par l'intermédiaire de l'AQP2, le tubule collecteur présente une perméabilité sélective à l'eau en fonction des besoins du moment. Cette dernière est synthétisée après stimulation par l'hormone antidiurétique (AVP) au côté basolatéral de la cellule selon le mécanisme expliqué dans la section 1.5.2.1 (Nielsen, Kwon et al. 1999). Les travaux de Knepper et ses collaborateurs, présentent une description détaillée de facteurs de transcription additionnels et certains motifs qui semblent impliqués dans la synthèse de l'AQP2 tels les sites GATA et Sp1, un site du facteur nucléaire des lymphocytes T activés (NFAT) et un site du récepteur rétinolide X (RXR), entre autres (Wilson, Miranda et al. 2013).

Il a aussi été démontré que l'hypertonie joue un rôle dans la transcription de l'AQP2 et de plusieurs autres gènes via l'interaction entre le facteur de transcription TonEBP et son ligand TonE qui est présent sur le gène de l'AQP2 (Sasaki 2012).

Suite à leur synthèse dans le RE, les protéines d'AQP2 traversent le réseau Golgi/trans-Golgi pour ensuite être emmagasinées dans des vésicules de stockage, en attente du signal qui activera leur transport vers la membrane apicale. Ainsi, ces amas de particules voyagent entre la membrane plasmique et les vésicules cytoplasmiques en fonction de la présence et/ou l'absence de vasopressine.

2.2 Phosphorylation de l'AQP2 et adressage membranaire

Des quatre sites de phosphorylation présents dans la queue C-terminale (S256, S261, S264, S269) de l'AQP2, la sérine en position 256 (S256) est la plus importante dans l'adressage de l'AQP2 (Fenton, Moeller et al. 2008, Sasaki 2012). Outre la PKA, la vasopressine semble aussi contrôler le degré de phosphorylation par le biais d'autres protéines kinase (PKC, PKG, Caséine kinase II) qui agissent à différents sites de phosphorylation, citons ici les résidus sérine 148, 229 et 231 (Van Balkom, Savelkoul et al. 2002, Bouley, Pastor-Soler et al. 2005) aussi impliqués dans le processus d'adressage à la membrane apicale (Sasaki 2012). Noda et ses collaborateurs ont isolé la protéine Spa-1 à partir d'une banque d'ADNc de papilles rénales de rat (Noda, Horikawa et al. 2004). Spa-1, de motif semblable à celui des ligands du domaine PDZ, s'avère être une protéine d'activation de la GTPase Rap1, et s'associe à l'extrémité C-terminale de l'AQP2 pour guider son trajet vers la membrane plasmique apicale (Sasaki and Noda 2007, Sasaki 2012).

Pour atteindre la membrane plasmique apicale (**Fig. 17**), plusieurs acteurs sont mis à contribution. Les AKAPs sont des protéines d'ancrage dont le rôle est d'attacher la PKA et d'autres facteurs de signalisation aux vésicules de stockage (Nedvetsky, Tamma et al. 2009). De plus, la dynamique du cytosquelette d'actine joue un rôle important dans ce système en facilitant la translocation des vésicules d'AQP2 à la membrane apicale en présence du stimulus (AVP) (Sasaki and Noda 2007). En effet, les études ont démontré le rôle de la vasopressine dans la dépolymérisation de l'actine-F apicale en inhibant indirectement la

GTPase RhoA, menant du coup à la migration de l'AQP2 en apicale. De plus, plusieurs travaux ont établi une association directe entre l'actine et le segment C-terminal de l'AQP2, de même qu'un changement d'affinité de l'AQP2 à la tropomyosine-5b phospho-dépendante résultant en la dépolymérisation de l'actine-F (Klussmann, Tamma et al. 2001, Noda, Horikawa et al. 2004, Noda and Sasaki 2005, Wilson, Miranda et al. 2013). L'implication du calcium dans ce mécanisme d'adressage soulève aussi des points d'interrogation. En effet, certains groupes de recherche ont réussi à détecter une augmentation du calcium intracellulaire dans les cellules IMCD, en réponse à l'AVP, et à démontrer son rôle dans l'exocytose de l'AQP2 (Maeda, Han et al. 1993, Yip 2002). D'autres auteurs stipulent par contre, que l'AMPC est suffisante à elle seule pour déclencher la cascade de signalisation qui mobilisera les vésicules d'AQP2 vers la membrane plasmique apicale et leur exocytose (Lorenz, Krylov et al. 2003).

La fusion et l'exocytose de l'AQP2 à la membrane apicale nécessitent l'action des protéines de la superfamille des SNAREs. Le mécanisme derrière cette étape est identique à celui que l'on retrouve au niveau des synapses neuronales. Les études ont mis en évidence la présence de la syntaxine-4 et la SNAP-23 qui sont des t-SNAREs de la membrane apicale du tubule collecteur, ainsi que VAMP-2, une v-SNARE, et SNAP-23 qui sont présentes avec l'AQP2 dans les vésicules de transport (Nielsen, Marples et al. 1995, Inoue, Nielsen et al. 1998, Gouraud, Laera et al. 2002).

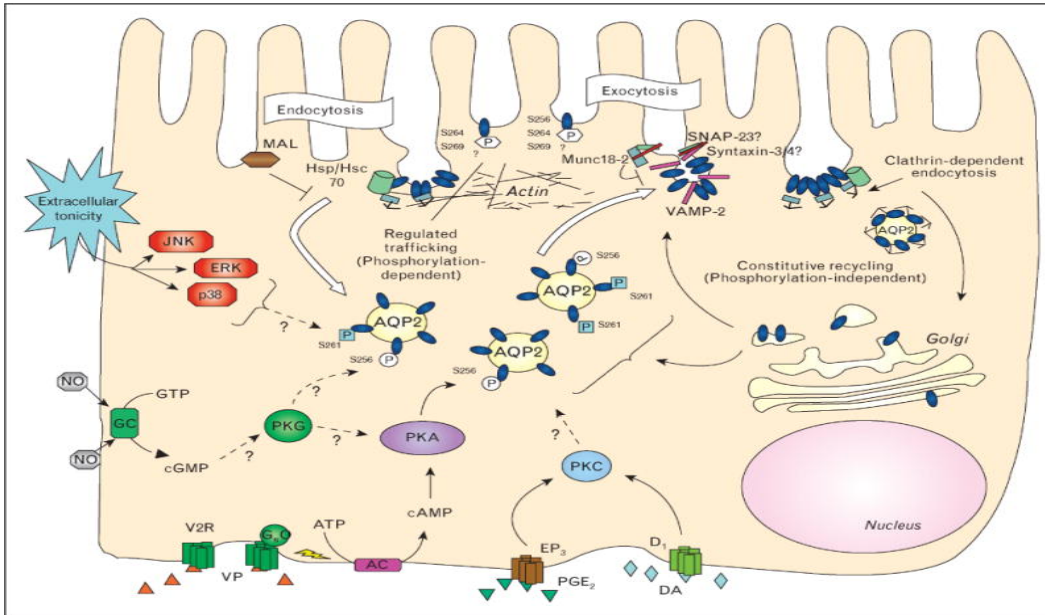


Figure 17 : Schéma des différentes voies de signalisation de l'AQP2. Représentation schématique des processus de synthèse, d'exocytose et d'endocytose de l'AQP2 en réponse à la vasopressine, ainsi que les différents éléments effecteurs impliqués dans chacun des mécanismes : enzymes, protéines et récepteurs entre autres; tiré de (Brown, Hasler et al. 2008).

2.3 Endocytose et dégradation

Le mécanisme d'endocytose (Fig. 17) de l'AQP2 requiert aussi une coordination de plusieurs protéines. En effet, suite au retrait du stimulus adéquat (vasopressine), l'AQP2 s'accumule dans des puits recouverts de clathrine puis est internalisée par un processus impliquant plusieurs protéines : hsc70, clathrine, endophiline, RME1, dynamine, et les protéines du cytosquelette, entre autres (Brown, Hasler et al. 2008). La protéine hsc70, une ATPase de la clathrine, s'est avérée être importante à ce mécanisme d'endocytose puisqu'elle interagit directement avec l'AQP2 en C-terminal et permet de découvrir les vésicules recouvertes de clathrine (Lu, Sun et al. 2007).

Après son passage aux endosomes précoces par la voie du PI3-kinase, l'AQP2 se retrouve dans des vésicules de stockage spécifiques contenant Rab11 et qui, sous l'effet de l'ADH, sont réacheminées à la membrane plasmique apicale. De plus, les microtubules et les filaments d'actine agissent de pair avec ces différentes protéines afin d'assurer une

coordination efficace des mécanismes d'endocytose et d'exocytose (Tajika, Matsuzaki et al. 2004, Tajika, Matsuzaki et al. 2005).

D'autre part, l'ubiquitination sur la lysine 270 de l'AQP2 enclenche son endocytose et sa dégradation au protéasome (polyubiquitination) ou au lysosome (mono ou oligoubiquitination) (Kamsteeg, Hendriks et al. 2006, Wilson, Miranda et al. 2013). La présence de l'AQP2 dans l'urine proviendrait de vésicules membranaires originaires des vésicules internes des CMVs (endosomes tardifs) (Pisitkun, Shen et al. 2004).

2.4 Les mutations de l'AQP2 et le DIN

En 1994, Deen et ses collaborateurs présentent le premier article décrivant un cas de DIN autosomique imputable à une mutation de l'AQP2 (Deen, Verdijk et al. 1994). Aujourd'hui, au moins 46 mutations ont été répertoriées dont seulement 8 montrent un caractère dominant (**Fig. 18**) : E258K, 721delG, 763–772del, 812–818del, R254L, R254Q, 779-780insA, 727delG (Bichet, El Tarazi et al. 2012, Moeller, Rittig et al. 2013).

La classification dominante et récessive est tributaire de la relation génotype/phénotype et de la capacité des monomères d'AQP2 mutés à s'associer avec leurs homologues sauvages (**Fig. 19**). À l'exception de (P262L), les mutations touchant la queue C-terminale sont toutes dominantes et compromettent le ciblage normal de la protéine à la membrane plasmique apicale. Comme la mutation n'affecte pas la structure du canal dans sa portion membranaire, la formation d'hétérotétramères entre les formes mutantes et les formes sauvages reste possible (Robben, Knoers et al. 2006). Cependant, cette association engendre un phénotype de DIN même chez les patients hétérozygotes en provoquant la séquestration du canal hétéromérique au niveau du Golgi (E258K), (Mulders, Bichet et al. 1998), les endosomes tardifs et les lysosomes, ou encore son ciblage vers la membrane plasmique basolatérale (Kamsteeg, Bichet et al. 2003). Récemment, la mutation R254L a été décrite comme dominante, mais contrairement à ses pairs, elle perturbe la phosphorylation du résidu S256, préservant l'état basal d'AQP2 dans la cellule (de Mattia, Savelkoul et al. 2005).

Les formes récessives du DIN présentent des mutations disséminées dans tout le canal hormis la queue C-terminale (**Fig. 18** pour la forme déployée et **Fig. 16** dans la structure

tertiaire) (exception pour P262L). Dans ces cas-ci, c'est le repliement de la protéine qui est perturbé, engendrant du coup sa rétention dans le RE et sa dégradation subséquente au lysosome ou au protéasome (Deen, Verdijk et al. 1994, Lin, Bichet et al. 2002, Bichet, El Tarazi et al. 2012). Aussi, ces monomères mutés sont incapables de s'associer aux protéines sauvages; ce qui explique le phénotype hétérozygote (parental) normal (Robben, Knoers et al. 2006). Par contre, certaines mutations récessives présentent un degré de fonctionnalité partiel (AQPs2 -L22V, -A47V, -G64R, -T125M, -T126M, -A147T, -D150E, -K228E et -V168M) ou total (P262L) (Canfield, Tamarappoo et al. 1997, Marr, Bichet et al. 2002, de Mattia, Savelkoul et al. 2004, Robben, Knoers et al. 2006, Guyon, Lussier et al. 2009, Leduc-Nadeau, Lussier et al. 2010), ce qui laisse sous-entendre l'existence d'une structure tétramérique adéquate pour celles-ci ainsi qu'une possibilité de récupération fonctionnelle par association avec l'AQP2 sauvage (V24A, D150E et K228E) (Guyon, Lussier et al. 2009, Leduc-Nadeau, Lussier et al. 2010).

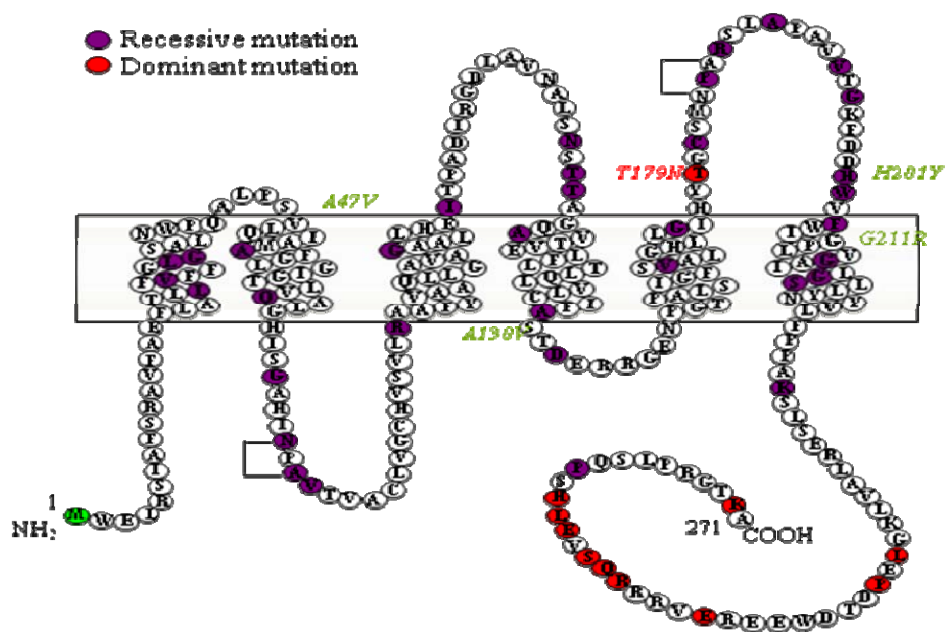


Figure 18 : Schématisation 2D de la protéine AQP2 et des mutations. Représentation de la protéine d'AQP2 humaine montrant les mutations récessives et dominantes avec cinq nouvelles mutations présentement à l'étude au laboratoire (A47V, A130V, T179N, H201Y et G211R). Les crochets représentent les motifs NPA.

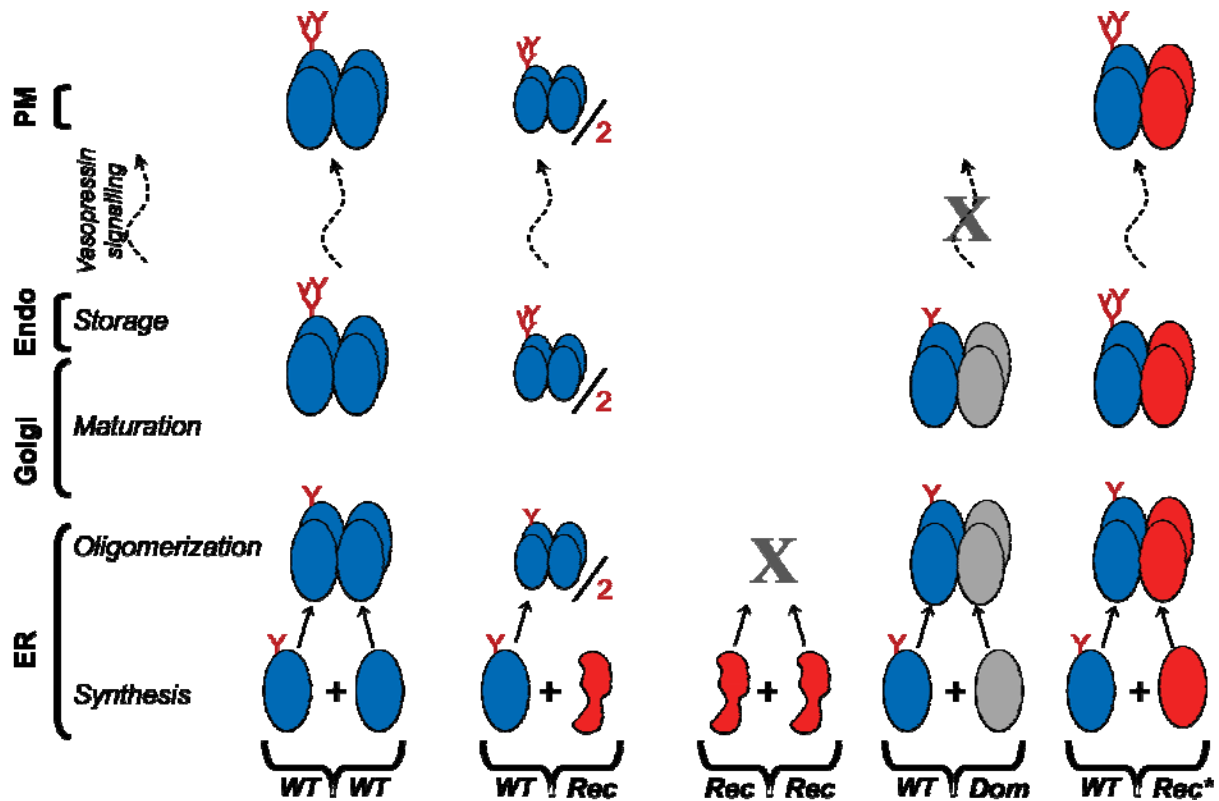


Figure 19 : Schématisation du modèle moléculaire des mutations dominantes et récessives de l'AQP2 responsable du DIN humain. Dans les formes natives (*wt / wt*), la protéine d'AQP2 se tétramérise, mûrit et atteint la membrane plasmique (PM) en réponse au stimulus approprié (AVP). Les mutations récessives (*rec*) sont mal structurées, et ne peuvent pas s'associer avec leurs homologues sauvages *wt* et aboutissent à un génotype (*rec / rec*) causant le DIN ou (*wt/rec*) sans DIN. Les mutations dominantes (*Dom*) s'associent facilement avec les formes natives mais sont séquestrées dans les compartiments intracellulaires (l'appareil de Golgi, endosomes), provoquant ainsi le DIN même chez les hétérozygotes (*wt / dom*). Les mutations récessives légères (noté ici *rec**), peuvent s'associer avec leurs homologues *wt*, mais à l'encontre des mutations dominantes, elles ne retiennent pas les hétéromères *rec*/ wt* et induisent une fonction d'AQP2 normale par un processus de récupération fonctionnelle.

2.5 Les modèles d'expression

2.5.1 *Xenopus laevis*

Xenopus laevis, ou dactylère du cap, est un amphibien appartenant à la famille des *Pipidae* originant d'Afrique australe et décrite pour la première fois par le naturaliste français, François Marie Daudin. De nature carnivore, la grenouille possède une apparence physique particulière qui se caractérise par l'absence de langue et d'oreilles visibles. Les mâles qui n'ont pas de sac vocal pèsent aux alentours de 60 grammes, et sont d'environ 5 à 6 centimètres de long. Les femelles à leur tour, pèsent approximativement 200 grammes, mesurent environ 10 à 12 centimètres de long, et possèdent des extensions du cloaque à la fin de l'abdomen (Daudin 1802, Garvey 2000).

Le recours aux amphibiens dans le domaine de la recherche scientifique remonte jusqu'à la fin du 19^e siècle. Les avancées scientifiques de l'époque dans le domaine de la biologie moderne, permirent à Gurdon et ses collaborateurs d'être les premiers à utiliser l'ovocyte de xénope afin d'exprimer des protéines à partir d'ARNm injecté (Gurdon 1971, Gurdon 2013). Depuis, ce modèle d'expression fit ses preuves tant dans l'étude des protéines sécrétrices que membranaires, tels des récepteurs et des canaux ioniques (Brown 2004) et bien sûr la caractérisation des AQPs par Peter Agre, tel que cité plus haut (Preston, Carroll et al. 1992, Brown 2004).

2.5.1.1 Les ovocytes et les méthodes de purification

Le recours aux grenouilles *Xenopus laevis*, offre plusieurs avantages; outre sa facilité d'entretien en laboratoire et son endurance remarquable à la maladie, cette grenouille est capable de produire à l'année longue un grand nombre d'œufs de taille appropriée, obtenus par microchirurgie (Gurdon and Hopwood 2000). Cette dernière consiste à extraire les sacs d'ovocytes matures (stades V-VI) de la grenouille et d'en détacher les ovocytes pour les trier manuellement. Par la suite, ceux-ci sont traités à la collagénase pour en retirer les follicules. Les ovocytes ainsi récoltés peuvent survivre en bonne condition jusqu'à deux semaines dans un milieu de culture à 18 degrés Celsius.

En phase V, soit le stade minimal d'utilisation, les ovocytes ont presque atteint leur taille maximale et la vitellogenèse cesse progressivement. Le dernier stade est, quant à lui, caractérisé par l'apparition d'une bande équatoriale non pigmentée alors que la taille finale des ovocytes atteint de 1 à 1,3 mm (Dumont 1972). En raison de leur dimension adéquate, leur machinerie de synthèse protéique rapide et efficace, et la grandeur de leurs organelles et compartiments intracellulaires, les ovocytes de *Xenopus laevis* constituent un modèle de choix pour l'expression des protéines membranaires. Ainsi, ce système d'expression a permis de mettre au point certaines caractéristiques principales relatives au caractère dominant ou récessif des mutants AQP2, y compris la fonctionnalité réduite des mutants, la synthèse, la stabilité et la maturation des protéines ainsi que la rétention intracellulaire (Marr, Kamsteeg et al. 2001, Marr, Bichet et al. 2002, Guyon, Lussier et al. 2009).

Cependant, les ovocytes ne sont pas un système d'expression infaillible. Ils présentent des limitations tant au niveau technique (tri, dévitellinisation, méthode de purification, traitement à la collagénase) que physiologique (taux de synthèse protéique, machinerie différente des mammifères). En effet, ce modèle ne permet que certains types d'analyses (western pour qualifier la synthèse de la protéine, et tests de gonflement pour l'évaluation de fonction) ce qui est insuffisant dans le cas d'analyses de mutations d'AQP2. En effet ces résultats obtenus sur ovocytes doivent nécessairement être complétés par des expériences en lignées cellulaires d'origine rénale, de sorte à tenir en compte la physiologie rénale (ciblage à la membrane plasmique et maturation de la protéine (N-glycosylation)). Comme exemple, citons le ciblage de certaines mutations à la membrane plasmique qui, bien qu'adéquates en ovocytes, restent séquestrées dans les compartiments cytoplasmiques dans les lignées cellulaires (Leduc-Nadeau, Lahjouji et al. 2007).

2.5.2 Les modèles cellulaires

Pour mieux évaluer les mécanismes moléculaires et physiologiques sous-jacents à l'osmorégulation épithéliale, il a fallu recourir à des systèmes d'expression plus près de la réalité fonctionnelle, telles les lignées cellulaires d'origine rénale. Les cellules MDCK, issues de tubules collecteurs rénaux, ont été obtenues il y a plus de 30 ans (Gorshkov, Snigirevskaya et al. 2009). De point de vue morphologique, ces cellules polarisées sont dotées d'un

épithélium semblable à celui des tubules collecteurs et se caractérisent par leur capacité à exprimer le récepteur V2 et de répondre adéquatement à l'action de la dDAVP (Deen, Rijss et al. 1997). Cependant, la transfection des MDCK est difficile et ne réussit qu'en recourant à des lignées stables (Hoffert, Fenton et al. 2008, Fenton, Moeller et al. 2010) ce qui limite leur utilisation. Les cellules IMCD proviennent de la médullaire interne du tubule collecteur de rat, site d'action de la vasopressine (Pisitkun, Bieniek et al. 2006, Uawithya, Pisitkun et al. 2008). Facilement transfectables, elles sont efficaces pour la synthèse et le ciblage de l'AQP2 hétérologue (Guyon, Lussier et al. 2009). Alors qu'elles conservent plusieurs des caractéristiques des cellules médullaires internes (Rauchman, Nigam et al. 1993), certaines données ont démontré par contre, une expression fautive de l'AQP2 au côté basolatéral en réponse à la vasopressine (Brown 2003). Les cellules HEK293, décrites en 1977 par Graham et ses collaborateurs (Graham, Smiley et al. 1977), sont une lignée cellulaire rénale d'origine humaine facilement transfectable, mais non polarisée (Nedvetsky, Tabor et al. 2010).

2.5.2.1 Les cellules mpkCCD_{c14}

Dans le but d'étudier l'absorption du sodium dans le tubule collecteur, le groupe de Vandewalle a réussi à établir plusieurs clones issus des cellules principales du tubule collecteur dérivé d'une souris transgénique (l'antigène grand T du SV40 sous le contrôle de l'activateur de type-L du promoteur de la kinase pyruvate) (Hasler, Mordasini et al. 2002). Leurs particularités morphologiques et fonctionnelles conservées à partir de cellules précurseurs du tubule collecteur, et leur épithélium serré et polarisé en ont fait le choix approprié pour les études des protéines du tubule collecteur (Bens, Vallet et al. 1999, Robert-Nicoud, Flahaut et al. 2001). Parmi celles-ci, les cellules mpkCCD_{c14} sont particulièrement intéressantes puisqu'elles ont la capacité de produire naturellement l'AQP2 lorsqu'induites à la vasopressine (Bens, Vallet et al. 1999, Robert-Nicoud, Flahaut et al. 2001, Hasler, Mordasini et al. 2002).

2.6 Objectifs

Nous avons identifié la mutation T179N chez un patient présentant un DIN sévère. Or, l'analyse génotypique démontre qu'il s'agit d'une mutation dominante, bien que celle-ci soit retrouvée en position extracytoplasmique, soit le lieu réservé aux mutations récessives.

À ce jour, les mutations dominantes répertoriées se retrouvent toutes dans la région C-terminale et tel que mentionné précédemment, elles possèdent la capacité de former des multimères et d'inhiber la contrepartie sauvage par une mécanique de dominance négative (Kamsteeg, Wormhoudt et al. 1999, Marr, Bichet et al. 2002). La mutation T179N est d'un intérêt particulier de par sa position, son génotype et le phénotype du patient qui portent à équivoque quant à son caractère dominant ou récessif. Dans le présent travail, nous avons donc caractérisé cette nouvelle mutation en évaluant en premier temps sa fonctionnalité et sa présence à la membrane plasmique par les études de perméabilité et d'immunobuvardage des protéines sur des ovocytes de *Xenopus laevis*, en la comparant à deux mutations l'une récessive (R187C) et l'autre dominante (R254Q) déjà répertoriées (de Mattia, Savelkoul et al. 2005, Savelkoul, De Mattia et al. 2009). Nous avons par la suite évalué la capacité du mutant T179N à former des multimères en condition de co-expression dans les ovocytes par les études de co-immunoprécipitation. Finalement, nous avons corroboré nos résultats obtenus sur les ovocytes (ciblage à la membrane plasmique), cette fois-ci dans un modèle plus adéquat, les cellules mpkCCD_{c14} par visualisation en immunofluorescence.

3. Résultats

Authorship

For the work presented below, I generated all results performed on oocytes, relating to functionality and expressions assays of *wt*-AQP2 variants, including data analysis (figures 1-4). I also assisted Abdullah El Tarazi with assays on the cell line mpkCCDc14 (figure 5) and participated in the writing of the paper.

FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF A NEW AQP2 MUTATION RESPONSIBLE
FOR NEPHROGENIC DIABETES INSIPIDUS

Jessica MATAR¹, Abdulah EL TARAZI¹, Sandra DA CAL¹, Robert J. Unwin², Pierre
BISSONNETTE¹, and Daniel G. BICHET^{1, 3}

¹Groupe d'Étude des Protéines Membranaires (GÉPROM), département de Physiologie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada, ²UCL Centre for Nephrology, Royal Free Hospital, London, UK, and ³Centre de Recherche, Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Running head: functional analysis of new AQP2 mutations

Abstract

Aquaporin-2 (AQP2) is a homotetrameric water channel responsible for the final water reuptake in the kidney's principal collecting duct cells. Mutations in *AQP2* induce nephrogenic diabetes insipidus (NDI), a condition which challenges the bodily water balance by producing large urinary volumes. The prevailing model to NDI presents recessive mutations as ill-structured proteins unable to oligomerize while dominant mutations retain their ability to associate with *wt*-AQP2, inducing NDI phenotypes in *wt/dom* heterozygotes through dominant negative effect. This study describes a new and challenging AQP2 mutation (T179N) considered as dominant according to its genotype, despite its extracellular location where only recessive variants are found. Using both *Xenopus* oocytes and kidney cell line mpkCCDc14, we compared the key functional and biochemical features of T179N to both classical recessive (R187C) and dominant (R254Q) forms and rather found typical recessive features for T179N, including double band profile in Western blot, low protein abundance, lack of functionality and targeting in oocytes and lack of dominant negative effect over *wt*-AQP2, a typical signature to dominant forms. Moreover, we found that T179N exhibits functional recovery features when co-expressed along *wt*-AQP2 both in oocytes and mpkCCDc14 cells, a behavior also found with several mild recessive mutations. In conclusion, and contrary to expectation, T179N presents the typical properties of recessive mutants susceptible to functional recovery.

Introduction

Aquaporin-2 (AQP2) is a water channel specifically expressed in principal cells of the kidney's collecting duct. Similar to all known aquaporins, AQP2 is constituted of four identical subunits, each one bearing its own functional pore. Its activity, central to the regulation of body water homeostasis, is under the tight control of the antidiuretic hormone vasopressin which regulates the apical expression of the channel [1-4]. Natural mutations in AQP2 are responsible for nephrogenic diabetes insipidus (NDI), a condition where affected individuals are unable to concentrate ultrafiltrate, thus producing large urinary volumes, with corollary health problems including polydipsia, polyuria, dehydration and possibly death [5, 6].

Previous studies, using mostly heterologous expressing systems such as *Xenopus laevis* oocytes and cell lines, have described the key features of NDI-causing AQP2 mutations (*mut*-AQP2) in terms of reduced synthesis efficiently [7, 8], inadequate synthesis (quality control / maturation) and routing [7, 9, 10]. Most *mut*-AQP2 forms described so far were found to be recessive [11], which implies that only *mut/mut* homozygotes are affected while *wt/mut* heterozygotes bearing one wild-type allele (*wt*-AQP2) are asymptomatic. Globally, the mutated protein is believed to be misfolded, prompting intracellular retention mostly in endoplasmic reticulum (ER) and premature degradation (class II mutations) [11]. These mutations are found to be disseminated throughout the protein's structure which constitutes the channel *per se*. On the other hand, the few dominant mutations identified so far were found to be restricted to the intracellular C-terminus end of the protein, a segment not participating to the channel structure [12]. Consequently, and in opposition to recessive forms, dominant mutations retain their ability to associate with *wt*-AQP2, inducing NDI phenotypes even in heterozygotes, through sequestration of *wt/mut* heteromeric complexes (*dominant negative effect*) [13]. These key features have led to a general model for AQP2-dependent NDI where subunit interactions within the homotetrameric structure of the channel are central [14, 15].

However, our recent work describing recessive mutations (V24A, D150E, K228E) of mild phenotypes (reduced functionality) not only stressed that all recessive AQP2 mutations were not ill-structured but most importantly demonstrated that such mutations may have the capacity to associate with *wt*-AQP2 in structured channels, even recuperating their loss in function [8, 16]. This *functional recovery* of mild AQP2 mutations challenges the proposed model for NDI [1, 17] with the introduction of a new class of recessive mutants.

In this study, we have characterized a new NDI-causing mutation for AQP2 (T179N); one expected to be recessive according to its position within the protein (last extracellular loop) and yet found to be dominant according to family history. Using *Xenopus laevis* oocytes and the mpkCCDc14 cell-line as expressing systems, we have performed both functional analysis and biochemical characterization for T179N, probing both pure and coexpression conditions to determine the means by which this mutation induces NDI. We provide data that conflicts with the dominant nature expected for the mutation and present with a new case of functionally recovered mutant.

Material and Methods

Vectors and cRNA

T179N, R254Q and R187C mutations were generated using site-directed mutagenesis on the pT7Ts vector, as previously described [8, 16]. To generate pT7Ts-GFP-AQP2, the human AQP2 sequence was first subcloned from pT7Ts-AQP2 into the pAc-GFP vector (Invitrogen), producing the pAc-GFP-AQP2 vector. BclII and SpeI restriction sites were then added at flanking 5' and 3' ends of GFP-AQP2 coding sequence then subcloned back into pT7Ts vector to produce pT7Ts-GFP-AQP2. Vectors were linearized with SalI and cRNAs synthesized using the mMessage mMachine T7 kit (Ambion, Austin, TX). For expression in mpkCCDC14 cells, all constructs were performed using the bicistronic pBi-CMV1 vectors (Clontech) so to impose a tight synchronization for both transcripts expression within each transfected cell. First, HA-tagged AQP2 (wild-type and mutants) were subcloned into the MCS2 of pBi-CMV1 vector using NheI and SalI restriction sites. Then, when required (double expressions), untagged *wt*-AQP2 was subcloned from pDNR-1-*wt*-AQP2 (clontech) into the MCS2 of pBi-CMV1 vector using EcoRI and XbaI restriction sites. With such constructs, we were able to isolate the signal from mutants through HA labelling. Exceptionally for the dominant mutation R254Q, the HA tag was placed on *wt*-AQP2 instead of mutant in order to follow *wt*-AQP2's targeting.

Oocyte preparation, injection and maintenance

Detailed preparation of oocytes was described previously [16]. Briefly, mature oocytes from gravid *Xenopus laevis* frogs were dissected by hand and treated with collagenase (17.5 mg/ml, Type 1A, Sigma-Aldrich) in a Ca⁺⁺ free Barth's solution (in mM: 90 NaCl, 3 KCl, 0.82 MgSO₄, and 5 HEPES pH 7.6) to remove follicles. The oocytes were thereafter kept at 18°C in normal Barth's solution (same as above with 0.4 mM CaCl₂ and 0.33 Ca(NO₃)₂) supplemented with horse serum (5%), sodium pyruvate (2.5 mM) and antibiotics (100 U/ml penicillin, 0.1 mg/ml streptomycin and 0.1 mg/ml kanamycin). The oocytes were then injected using a microinjection apparatus (Drummond Scientific, Broomall, PA) with 46 µl of water (controls)

or AQP2 cRNA solutions to meet the required amount (see figure legends) and further incubated for 18-24 hours before experimentation.

Cell culture maintenance and Transfection

mpkCCDc14 cells were routinely cultured in DMEM-F12 media supplemented with 10% FBS and antibiotics (100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin) and maintained in a 95% air 5% CO₂ atmosphere. For immunocytochemistry assays, cells were seeded on coverslips in the same culture media and transfected the next day (60-90% confluency) using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to manufacturer, and further incubated for 24 hours before experimentation.

Preparation of total and plasma membrane fractions of oocytes

For descriptive methodology, see [\[18\]](#). Briefly, total membranes were prepared by homogenizing 15 oocytes in 1 ml PBS then centrifuged at low (250 x g for 10 min.) and high (16,000 x g for 20 min.) speed. Final pellets were resuspended in 30 µl PBS (2 µl solution / oocyte) and processed immediately for Western blots or immunoprecipitation. For purification of plasma membranes, 40 oocytes were treated for 10 minutes at room temperature with 0.005% subtilisin A (Sigma-Aldrich, # P5380) diluted in MBSS (80 mM NaCl, 20 mM MES pH 6.0) followed by two 1 hour polymerizing steps consisting first in 1% ludox (Sigma- Aldrich, # 420883), then with 0.1% polyacrylic acid; (Sigma-Aldrich, MW 30,000 # 41.604-5) again diluted in MBSS and performed on ice. The oocytes were then homogenised in 1 ml cold HbA using a P200 pipettor then subjected to successive low speed centrifugations (16, 16, 25 and 35 x g, 30 sec at 4°C) keeping the bottom 75 µl and replacing the supernatant with equivalent volumes of fresh HbA (925 µl). Purified plasma membranes were pelleted using a final centrifugation at 16,000 x g for 20 minutes, resuspended in 10 ul HbA and immediately processed for Western blot.

Immunoprecipitation

Immunoprecipitations were performed on oocytes injected with a mixture of cRNA coding for GFP-wt-AQP2 and untagged variants of AQP2, as specified in figure legends. Purified total membranes, as described above, were solubilized for 1 hour at room temperature using 2% deoxycholate in PBS then centrifuged at 100,000 x g for 30 min. Supernatants were first incubated with goat anti-GFP (1/1000 dilution, cat no.sc-5384, Santa Cruz Biotechnology) for 2 hours at room temperature under gentle agitation to which was added 20 µL of pre-washed protein-G coated magnetic beads (dynabeads, Invitrogen) and further incubated for 30 min. Beads were rinsed 4 times in solubilisation solution then dispersed in 40 µl Laemmli buffer, and heated at 95°C for 5 min. Samples of 20 µl were loaded on gel and processed for Western blot detection. Also, 20 µl of starting material (initial solubilisations) were loaded in parallel to assess total AQP2 samples.

Immunocytochemistry

Immunocytochemistry was performed on mpkCCDc14 cells grown on coverslips and transfected with pBi-HA-AQP2 variants (wt and mutants) either in absence (single insert) or presence (double inserts) of untagged wt-AQP2 (24 hours incubation time). After treatment with forskolin (50 µM, 45 min. [19]) in order to promote the plasma membrane targeting of AQP2, the coverslips were fixed at -20°C for 20 minutes with formaldehyde (1%) diluted in ice-cold methanol, and then rinsed in PBS. The immunolabeling procedure was as previously described [16] using mouse FITC-anti-HA (1/100 dilution, cat no: H7411, Sigma-Aldrich). Coverslips were mounted using an anti-quenching agent (Prolong Gold antifade, Molecular Probes, Eugene OR) prior visualization (60 X) using an Olympus IX-81 microscope along Image-Pro Plus v.5.0 software for images acquisition.

Western blots

Western blots were performed as described previously [20] for both total (3 oocytes/sample) and purified plasma membranes (35 oocytes/sample). Samples were run on a 12% gel and transferred onto a nitrocellulose membrane. The efficiency of the overall procedure was monitored by Ponceau red staining. The membranes were first blocked with 5%

non-fat milk in TBS-T (TBS + Tween 20, 0.1%) then incubated overnight at 4°C with α -AQP2 (C-17, 1:1000, Santa Cruz Biotech, CA) followed the next day by incubation for one hour with secondary antibody (HRP-linked chicken anti-goat 1:25,000, Santa Cruz Biotech,CA). Blots were revealed using enhanced chemiluminescence detection (Phototope-HRP, New England Biolabs, Pickering, ON, Canada).

Volume measurements

Functionality of AQP2 was evaluated by water flux measurements in water-injected and AQP2-injected oocytes. A detailed procedure is presented in a previous publication [21]. Briefly, the oocytes were placed in a 0.07 ml bath on the stage with the cross-section image monitored using an inverted, low powered microscope equipped with a camera and associated software to evaluate volume variations. A mild hypo-osmotic solution was applied to the oocytes by removing mannitol from the isotonic media (-20 mOsm). The variations in volume were used to determine water permeability values (Pf) which are presented herein as % of *wt*-AQP2 activity.

Data analysis

All experiments were performed at least three times using different oocyte batches or cell cultures and values are presented as mean \pm SD. One-way ANOVA was performed on all Pf determinations. Molecular weights and densitometry analyses were performed using software from alpha-imager 2000 (Alpha Innotech Corp, San Leandro, CA).

Ethical approval

All procedures regarding manipulations and treatments of animals were performed in accordance with the Canadian guidelines and ethics committee of the Université de Montréal.

Results

Patient

The T179N mutation was identified in an obese (BMI 35) 42 year old patient presenting with hypothyroidism and uncontrolled type II diabetes. While the family has no previous record of NDI, the proband displays clear NDI features including dilute urine (100 à 300 mOsm/kg), elevated daily water intake (15 to 20 l/day) and resistance to oral dDAVP treatment. Both glomerular filtration rate (88 ml/min) and pituitary morphology (RMI scan) were normal. Sequencing from genomic DNA confirmed wild type V2R sequences on both alleles but indicated heterozygosity for AQP2 with T179N mutation along two inconsequential polymorphisms in exon 2 (S167S) and TGA+20 (homozygosity). Although adequate family background is unavailable, this AQP2 mutation is considered to be dominant in account to DNA sequencing.

Functional characterization of T179N in oocytes

The use of *Xenopus* oocytes as expression system has long been privileged to describe NDI-causing AQP2 mutations in both functionality and biochemical features. In this assay, we have performed a comparative analysis of T179N against *wt*-AQP2, individually expressed in oocytes. As shown in figure 1A, *wt*-AQP2 generates a gradual increase in water permeability (Pf) which adequately corresponds to the injected mRNA load (0.5 to 3 ng). On the other hand, the similar procedure using T179N fails to produce any significant increase in Pf, even at highest mRNA contents, suggesting a complete lack of function for this mutant (n=6). Purified total membrane fractions from the same oocytes were tested in Western blot to evaluate both quantitative (protein abundance) and qualitative (band profiles) features (figure 1B). As seen, the presence of *wt*-AQP2 adequately correlates with function while the expression of T179N is clearly challenged under same conditions, and only accounts to $23 \pm 6\%$ that of *wt*-AQP2 (densitometry analysis, mean of 3 estimations). Also of importance is the distinctive profile of T179N which display two closely-associated bands corresponding to the non-glycosylated (29 kDa) and core-glycosylated (31 kDa) forms of the protein, a signature typical of recessive mutations [7, 22]. In comparison, *wt*-AQP2 only displays the non-glycosylated band along occasional mature glycosylated band (39-45 kDa;

not displayed here). Since targeting issues are central to AQP2 mutations, we have also evaluated this trait on Western blot from purified plasma membrane fractions. In comparison to *wt*-AQP2 which is adequately targeted (plasma membrane lanes), we find that T179N is never detected under same conditions (3 ng/oocytes), even in overexposed blots, indicating that T179N does not reach the plasma membrane.

Confronting T179N to key features for dominant AQP2 mutations in oocytes

Previous reports have identified two key characteristics to dominant AQP2 mutations; 1- its ability to associate with *wt*-AQP2 in heteromeric structures (heterotetramers), and 2- its capacity to impede the global functionality by sequestration of *wt*-AQP2 within intracellularly trapped heteromers. As a dominant mutation, T179N is thus expected to associate to *wt*-AQP2, which can be validated using a co-immunoprecipitation (co-IP) assay. Technically, we took advantage of the previously reported strategy where a GFP-tagged *wt*-AQP2 (50 kDa) is coexpressed along untagged AQP variants (*wt*-AQP2, R187C, T179N and R254Q, herein) so to pull down heteromeric complexes in IP assays using anti-GFP while discriminating interacting proteins through distinctive molecular weights in anti-AQP2 blot [19]. As shown in figure 2B, positive pull-downs are evidenced for T179N, similarly to *wt*-AQP2 and dominant negative mutation R254Q (positive controls), as opposed to the recessive mutant form R187C used herein as negative control in regards to its reported monomeric structure [14, 23].

As mentioned above, dominant mutations have the ability to impede normal functionality through sequestration, a trait readily observable through water permeability evaluations in oocytes [14, 24]. We have consequently tested this feature in T179N, in comparison to typical recessive (R187C) and dominant (R254Q) AQP2 mutants. The figure 3A presents water permeability of oocytes expressing *wt*-AQP2, R187C, T179N or R254Q either alone (- condition) or in presence of equivalent amounts of *wt*-AQP2 (+ condition). The specific activities for each condition were determined by subtracting either the control value from single (-) expressions, or the single *wt*-AQP2 value from dual (+) expression conditions (figure 3B). Finally, the discrepancies between single (-) and dual (+) expressions represent

the functional outcome attributed to each mutant when coexpressed along *wt*-AQP2 (figure 3C). Mandatory to such study, we first confirmed in figure 3A that functionality of *wt*-AQP2 do correlates with RNA loads (*wt*-AQP2; + vs 2+ conditions) so to discard issues regarding expression saturation. The figure 3A shows that although all three mutants tested fail to display any significant activity when expressed alone (- condition; values similar to control water-injected oocytes), the functional outcome when coexpressed with *wt*-AQP2 (+ condition) vary according to each mutant. As expected, the permeability elicited by *wt*-AQP2 is not affected by the recessive R187C, but hindered by $45\pm 13\%$ when in presence of the dominant R254Q form (figure 3C). Contrary to expectation, T179N display an increasing of overall Pf by $83\pm 7\%$. This unusual behavior, previously reported for two recessive AQP2 mutations of mild phenotypes [16], was found to be associated to an increased stabilization of the mutant forms when in presence of *wt*-AQP2 counterparts. Consequently, we used densitometry analysis in Western blots to evaluate if the abundance of T179N is altered when expressed in presence of *wt*-AQP2. Here again, we took advantage of the higher molecular weight of GFP-*wt*-AQP2 to discriminate signals specific to mutant forms. As shown in figure 4A, coexpressing *wt*-AQP2 slightly reduces the density of R254Q or R187C. On the other hand, T179N's density is clearly increased which is confirmed in densitometry analysis for three individual assays and presented in figure 4B (T179N = 250% increase).

Characterization of T179N using the kidney cell model mpkCCDc14

Although a positive co-IP is determined for T179N (figure 2), its functional recovery found when coexpressed along *wt*-AQP2 is in complete contradiction with its expected dominant nature. To complement and confirm the data found in oocytes, we confronted the properties of T179N this time using the mpkCCDc14 cell-line of kidney origin essentially to evaluate if a recuperated targeting is also evidenced when in presence of *wt*-AQP2, as for previously reported mild mutations [16]. As shown in figure 5A (arrow), forskolin treatment promptly induces plasma membrane targeting of *wt*-AQP2 ($78\pm 2\%$ efficiency), a condition thus used in all further conditions. In agreement to results found in oocytes, T179N fails to reach plasma membrane when expressed alone (-*wt*-AQP2) but efficiently recovers this property when coexpressed along *wt*-AQP2 (+*wt*-AQP2). As expected, the recessive R187C

remains within intracellular stores, even when in presence of *wt*-AQP2. Also, the dominant negative effect of R254Q is clearly demonstrated as it efficiently retains *wt*-AQP2 within intracellular stores (+ R254Q condition). The figure 5C summarizes observations for three distinct experiments (100 sampling for each condition) and clearly indicates the effective recovery for T179N ($54\pm 6\%$) in opposition to R187C.

Discussion

In the pathophysiology of NDI-causing AQP2 mutations, recessive forms are essentially described as ill-processed and non-functional proteins, unable to associate with *wt*-AQP2 counterparts within an active tetrameric channel [13, 14]. Such monomeric AQP2 particles are believed to be sequestered in the ER and destined to be eliminated [13]. Conversely, dominant mutations are believed to be structurally competent as they retain the ability to associate with *wt*-AQP2 to form heteromers [11, 14]. Yet, these mutations will hinder the normal targeting process of the heterotetramer through a *dominant negative effect* [1, 17], sequestering particles within internal stores [13, 14], and inducing NDI phenotypes even in *wt/mut* heterozygotes [24-26]. Such propensity for dominant mutations to associate with *wt*-AQP2 is explained by their location in the intracellular C-terminal tail of the protein, distant from the actual core structure of the channel (TM domains) and not implicated in intersubunit contact points [12, 27]. In this case study, T179N was identified in only one allele, along two non-impacting polymorphisms, which consequently categorized the mutation as a dominant trait. Surprisingly, T179N is not located in the expected C-terminal region as all other dominant mutations, but rather in the last extracellular loop where only recessive mutations are found. With this premise, we set to characterize T179N to determine how this mutation compares to other reported dominant mutants and to the accepted model of NDI. A series of critical experiments was thus conducted using well characterized expression models (oocytes and mpkCCDc14 cells), comparing data from T179N to *wt*-AQP2 as well as typical recessive (R187C) and dominant (R254Q) forms.

As a dominant mutation, T179N is expected to display some key features distinctive of recessive forms regarding protein maturation, heteromeric associations and targeting. Yet, when considering overall data, we concluded that T179N does not present with typical dominant traits, but instead compares adequately to the subclass of mild recessive mutations susceptible to functional recovery [16]. As shown in figure 1 and 3, T179N which is essentially non-functional when expressed alone, exhibits a robust recovery behavior (83% of *wt*-AQP2) when coexpressed in oocyte along *wt*-AQP2. This is in complete opposition to the expected dominant negative effect, a landmark element of dominant mutations, as is the

recuperation of T179N plasma membrane targeting when coexpressed along *wt*-AQP2 in mpkCCDc14 cells. In account to this functional recovery principle, we expect only *wt*/T179N heteromers to be efficiently targeted while T179N/T179N homomers, if they exist, should remain sequestered within internal stores. Also concurring to the recessive nature of T179N is 1) the low expression level found in oocytes in comparison to *wt*-AQP2 ($23 \pm 6\%$ of *wt*-AQP2, densitometry analysis in (figure 1), which indicates a reduced synthesis rate and/or a rapid degradation, typical of many recessive AQP2 mutations [13, 22], and 2) the Western blot profile for T179N displaying both core-glycosylated (31 kDa) and non-glycosylated (29 kDa) bands, typical of recessive mutants such as R187C and never found with dominant variants [19, 28, 29], including R254Q presented herein (figure 4). This double band suggests ER retention often associated with synthesis hindrance and premature degradation [13].

Our recent work describing recessive mutations (V24A, D150E, K228E) of mild phenotypes (minimal functionality) not only stressed that all recessive AQP2 mutations were not ill-structured but most importantly demonstrated that such mutations may have the capacity to associate with *wt*-AQP2 in functional channels, even recuperating their loss in function [16]. T179N represents the most extreme case of functional recovery evidenced yet as its functionality changes from null when expressed alone to full recovery when coexpressed along *wt*-AQP2. This functional recovery of mild AQP2 mutations challenges the proposed model for NDI [1, 17] with the introduction of a new class of recessive mutants. We still have no definitive explanation as to the reported dominant nature of T179N. The physical condition of the patient, namely hypothyroidism and type II diabetes, are not part of NDI etiology. A more thorough examination of the genetic background from both patient and related family members should be envisaged at this time to confirm the actual dominant trait of T179N.

References

1. Katsura, T., et al., *Constitutive and regulated membrane expression of aquaporin 1 and aquaporin 2 water channels in stably transfected LLC-PK1 epithelial cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(16): p. 7212-6.
2. Nielsen, S. and P. Agre, *The aquaporin family of water channels in kidney*. Kidney Int, 1995. **48**(4): p. 1057-68.
3. Christensen, B.M., et al., *Localization and regulation of PKA-phosphorylated AQP2 in response to V(2)-receptor agonist/antagonist treatment*. Am J Physiol Renal Physiol, 2000. **278**(1): p. F29-42.
4. Knepper, M.A. and T. Inoue, *Regulation of aquaporin-2 water channel trafficking by vasopressin*. Curr Opin Cell Biol, 1997. **9**(4): p. 560-4.
5. Bichet, D.G. and T.M. Fujiwara, *Nephrogenic diabetes insipidus*. In: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 8th ed2001, New York ; Montreal: McGraw-Hill. 4 v.
6. Sands, J.M. and D.G. Bichet, *Nephrogenic diabetes insipidus*. Ann Intern Med, 2006. **144**(3): p. 186-94.
7. Marr, N., et al., *Cell-biologic and functional analyses of five new Aquaporin-2 missense mutations that cause recessive nephrogenic diabetes insipidus*. J Am Soc Nephrol, 2002. **13**(9): p. 2267-77.
8. Guyon, C., et al., *Characterization of D150E and G196D aquaporin-2 mutations responsible for nephrogenic diabetes insipidus: importance of a mild phenotype*. Am J Physiol Renal Physiol, 2009. **297**(2): p. F489-98.
9. Deen, P.M., et al., *Water channels encoded by mutant aquaporin-2 genes in nephrogenic diabetes insipidus are impaired in their cellular routing*. J Clin Invest, 1995. **95**(5): p. 2291-6.
10. Lin, S.H., et al., *Two novel aquaporin-2 mutations responsible for congenital nephrogenic diabetes insipidus in Chinese families*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(6): p. 2694-700.
11. Robben, J.H., N.V. Knoers, and P.M. Deen, *Cell biological aspects of the vasopressin type-2 receptor and aquaporin 2 water channel in nephrogenic diabetes insipidus*. Am J Physiol Renal Physiol, 2006. **291**(2): p. F257-70.
12. Schenk, A.D., et al., *The 4.5 Å structure of human AQP2*. J Mol Biol, 2005. **350**(2): p. 278-89.

13. Tamarappoo, B.K. and A.S. Verkman, *Defective aquaporin-2 trafficking in nephrogenic diabetes insipidus and correction by chemical chaperones*. J Clin Invest, 1998. **101**(10): p. 2257-67.
14. Kamsteeg, E.J., et al., *An impaired routing of wild-type aquaporin-2 after tetramerization with an aquaporin-2 mutant explains dominant nephrogenic diabetes insipidus*. Embo J, 1999. **18**(9): p. 2394-400.
15. de Mattia, F., et al., *A novel mechanism in recessive nephrogenic diabetes insipidus: wild-type aquaporin-2 rescues the apical membrane expression of intracellularly retained AQP2-P262L*. Hum Mol Genet, 2004. **13**(24): p. 3045-56.
16. Leduc-Nadeau, A., et al., *New autosomal recessive mutations in aquaporin-2 causing nephrogenic diabetes insipidus through deficient targeting display normal expression in Xenopus oocytes*. J Physiol. **588**(Pt 12): p. 2205-18.
17. Marr, N., et al., *Heteroligomerization of an Aquaporin-2 mutant with wild-type Aquaporin-2 and their misrouting to late endosomes/lysosomes explains dominant nephrogenic diabetes insipidus*. Hum Mol Genet, 2002. **11**(7): p. 779-89.
18. Leduc-Nadeau, A., et al., *Elaboration of a novel technique for the purification of plasma membranes from Xenopus laevis oocytes*. Am J Physiol Cell Physiol, 2006.
19. de Mattia, F., et al., *Lack of Arginine Vasopressin-Induced Phosphorylation of Aquaporin-2 Mutant AQP2-R254L Explains Dominant Nephrogenic Diabetes Insipidus*. J Am Soc Nephrol, 2005.
20. Bissonnette, P., et al., *Functional expression of tagged human Na⁺-glucose cotransporter in Xenopus laevis oocytes*. J Physiol, 1999. **520 Pt 2**: p. 359-71.
21. Duquette, P.P., P. Bissonnette, and J.Y. Lapointe, *Local osmotic gradients drive the water flux associated with Na(+)/glucose cotransport*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(7): p. 3796-801.
22. Marr, N., et al., *Functionality of aquaporin-2 missense mutants in recessive nephrogenic diabetes insipidus*. Pflugers Arch, 2001. **442**(1): p. 73-7.
23. Marr, N., et al., *Heteroligomerization of an Aquaporin-2 mutant with wild-type Aquaporin-2 and their misrouting to late endosomes/lysosomes explains dominant nephrogenic diabetes insipidus*. Human Molecular Genetics, 2002. **11**(7): p. 779-789.
24. Mulders, S.M., et al., *An aquaporin-2 water channel mutant which causes autosomal dominant nephrogenic diabetes insipidus is retained in the Golgi complex*. J Clin Invest, 1998. **102**(1): p. 57-66.
25. Knoers, N.V. and P.M. Deen, *Molecular and cellular defects in nephrogenic diabetes insipidus*. Pediatr Nephrol, 2001. **16**(12): p. 1146-52.

26. Mulders, S.M., et al., *New mutations in the AQP2 gene in nephrogenic diabetes insipidus resulting in functional but misrouted water channels*. J Am Soc Nephrol, 1997. **8**(2): p. 242-8.
27. Verkman, A.S. and A.K. Mitra, *Structure and function of aquaporin water channels*. Am J Physiol Renal Physiol, 2000. **278**(1): p. F13-28.
28. Kamsteeg, E.J., et al., *Missorting of the Aquaporin-2 mutant E258K to multivesicular bodies/lysosomes in dominant NDI is associated with its monoubiquitination and increased phosphorylation by PKC but is due to the loss of E258*. Pflugers Arch, 2008. **455**(6): p. 1041-54.
29. Savelkoul, P.J., et al., *p.R254Q mutation in the aquaporin-2 water channel causing dominant nephrogenic diabetes insipidus is due to a lack of arginine vasopressin-induced phosphorylation*. Hum Mutat, 2009. **30**(10): p. E891-903.

Legends to figures

FIGURE 1: Comparative expression of AQP2 and T179N in oocytes. Oocytes were injected with increasing mRNA loads for both *wt*-AQP2 and T179N mutant (0.5 to 3 ng, as specified) and incubated for 24 hours prior testing for water permeability (A) and Western blot on both total (B; 1 min and 30 min exposures) and plasma membranes (C). Pf values are mean \pm SD with $n=8$ per condition, and is typical of 3 assays. Asterisks indicate statistical significance ($p < 0.05$) in comparison to water-injected oocytes.

FIGURE 2: Immunoprecipitation of AQP2 in heterozygous condition. Oocytes were injected with 0.5 ng mRNAs for each untagged AQP2 variants (*wt*-AQP2, T179N, R187C and R254Q) along equimolar amounts of GFP-*wt*-AQP2 (1 ng) and incubated for 24 hours prior IP using anti-GFP (see methods). Blots were probed using anti-AQP2 to reveal both GFP-tagged *wt*-AQP2 (58 kDa) and untagged AQP2 forms (29 kDa). A) Solubilized samples subjected to IP, B) IP blot showing co-precipitated untagged variants (29 kDa). Blots are typical of 3 assays.

FIGURE 3: Functional recovery assay for T179N. Oocytes were injected with 0.5 ng mRNA coding for *wt*, R187C, T179N and R254Q either in absence (-) or presence (+) of same amount of *wt*-AQP2 and incubated for 24 hours prior testing for water permeability. Activities are presented in % \pm SD of *wt*-AQP2 with $n=8$ per condition and is typical of 3 assays. A) Total activity in single (-) and dual expressions (+). B) Specific activities for single (control Pf value subtracted from (-) expressions) and double (*wt*-AQP2 Pf (-) value subtracted from (+) expressions) expressing conditions. C) Gain of function for each AQP2 variant determined by subtracting specific Pf values in absence (-) to that in presence (+) of *wt*-AQP2.

FIGURE 4: Stabilization of T179N protein in functional recovery condition. Oocytes were injected with 0.5 ng mRNAs for each untagged AQP2 variants (*wt*-AQP2, T179N, R187C and R254Q) with (+) or without (-) equimolar amounts of GFP-*wt*-AQP2 (1 ng), and incubated for 24 hours prior Western blot detection (A). Untagged AQP2 bands (29 kDa) were evaluated using densitometry to evaluate the potential stabilization induced by the presence of *wt*-AQP2 (B). Densitometry values are mean \pm SD of 3 assays.

FIGURE 5: Functional recovery of T179N in mpkCCDc14 cells. Cells grown on coverslips were transfected with pBi vectors expressing HA-tagged AQP2 variants (*wt*-AQP2, T179N, and R187C) as single transcript (-) or along untagged *wt*-AQP2 (+) for dual expressions (see methods). Conversely, for dominant R254Q mutant, HA-tag was added onto *wt*-AQP2 instead of mutant so to follow the expected internalization of the *wild-type* form. Immunofluorescence using anti-HA allowed visualization of tagged variants to evaluate effective plasma membrane targeting (arrows). A) Induction of plasma membrane targeting (arrow) of *wt*-AQP2 through forskolin treatment (50 μ M, 30 min). B) Induction of plasma membrane targeting for T179N but not R187C, by coexpression with *wt*-AQP2, and retention of *wt*-AQP2 by coexpression of R254Q. C) Histogram of positive plasma membrane targeting for each condition presented in B. Data collection encompassed 100 cells from each condition (3 assays) for each variant, in absence/presence of *wt*-AQP2.

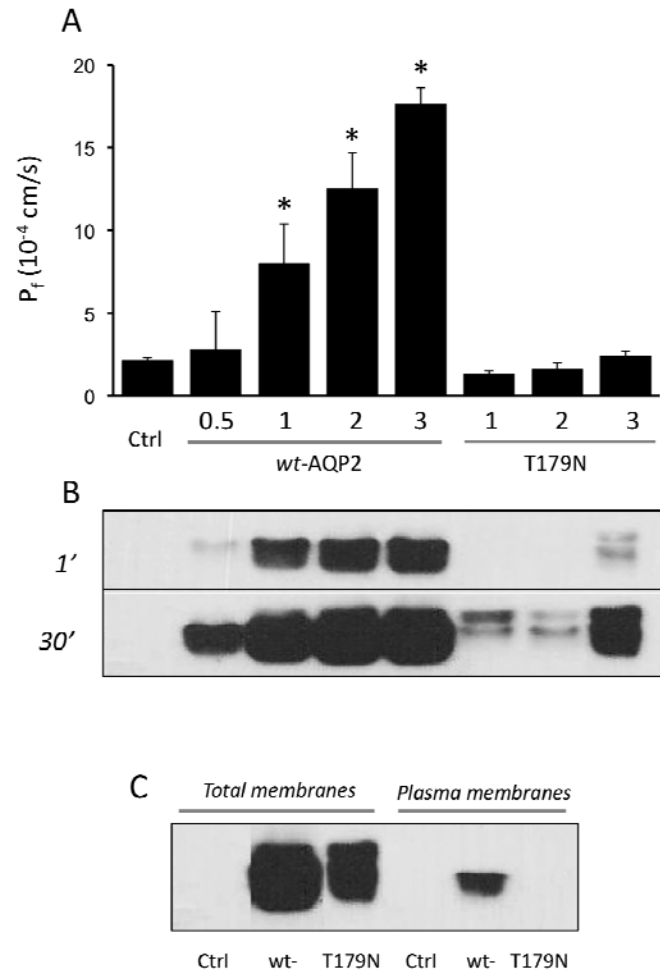


FIGURE 1

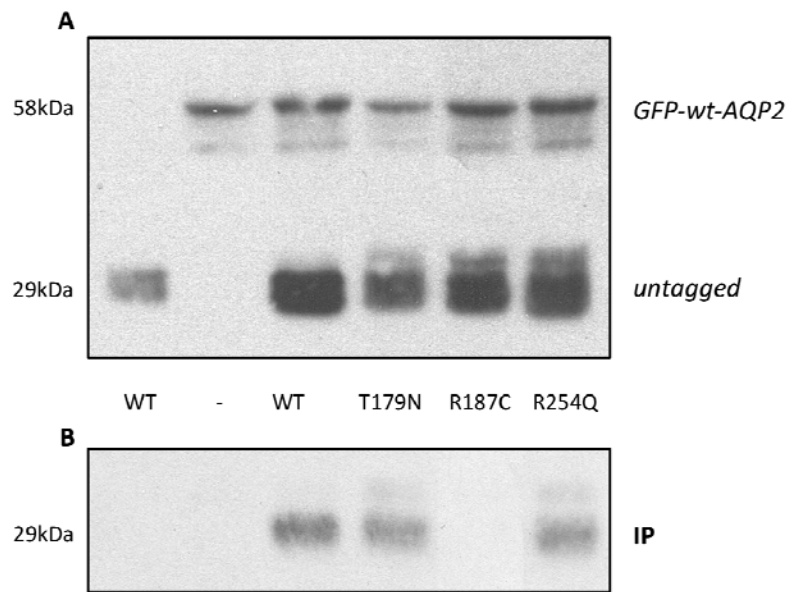


FIGURE 2

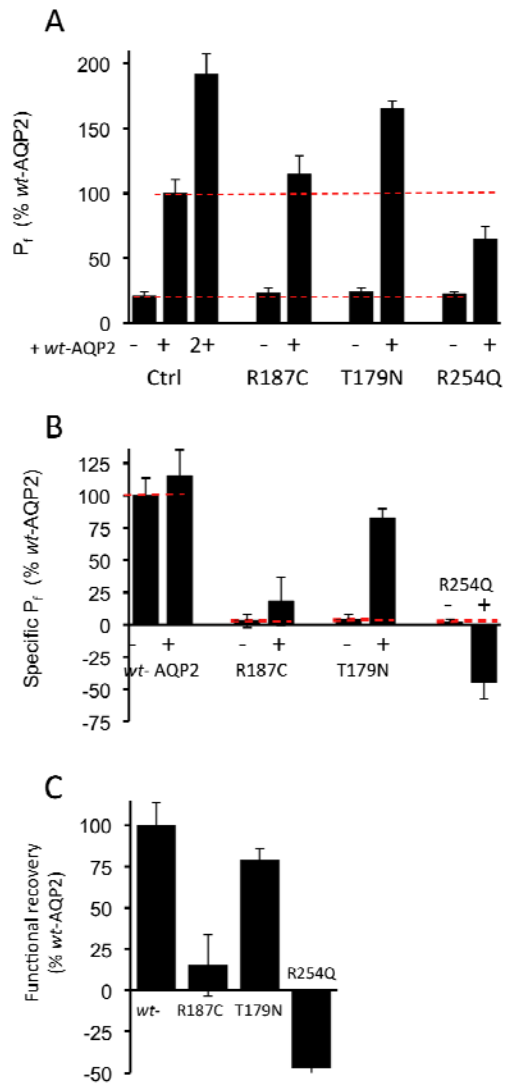


FIGURE 3

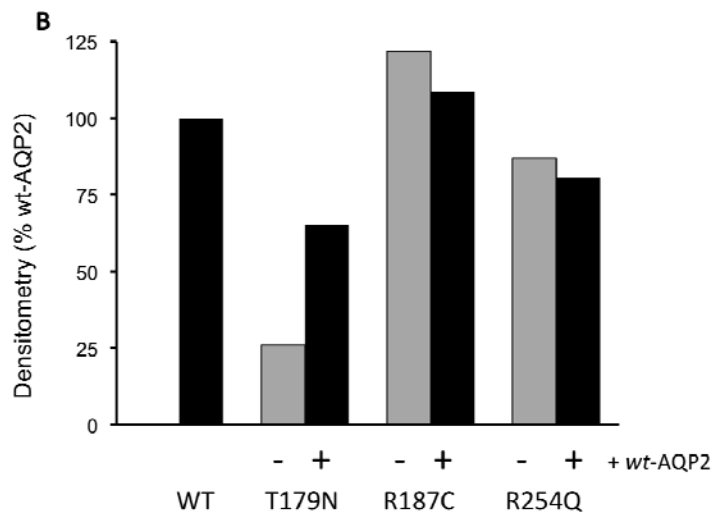
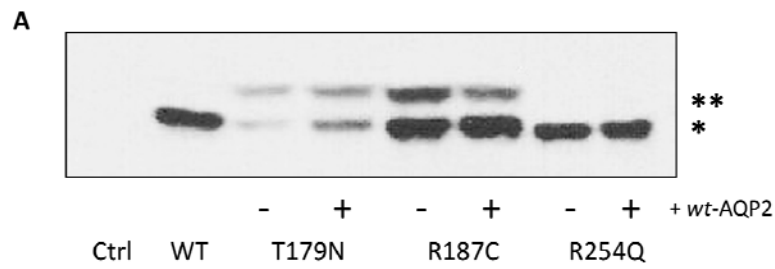


FIGURE 4

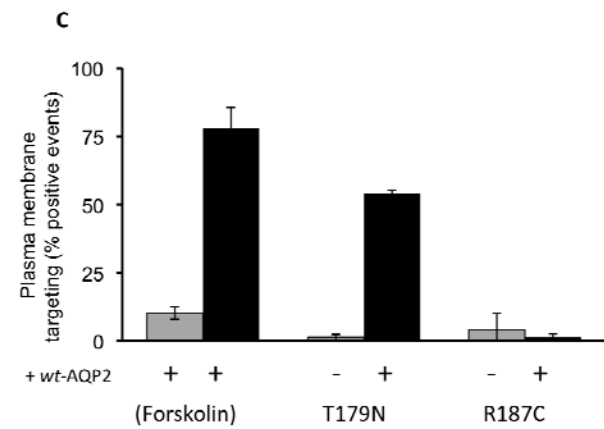
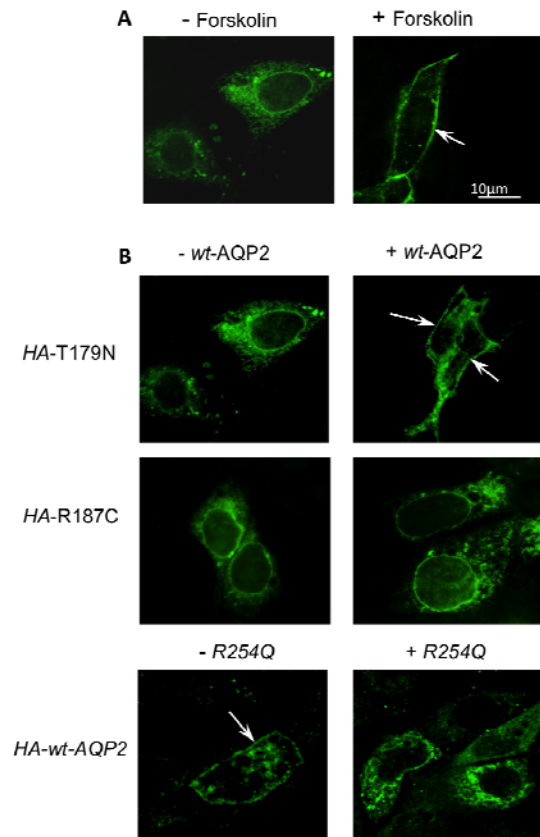


FIGURE 5

4. Discussion

La mutation T179N se retrouve chez un patient obèse manifestant un DIN sévère (résistance au dDAVP, urine diluée (100 à 300 mOsm/kg) et prise de 15 à 20 L d'eau par jour), et souffrant de diabète type II et d'hypothyroïdie. En absence d'historique familial connu, les tests de séquençage démontrent la mutation T179N sur un seul allèle et la présence de deux polymorphismes bénins, ce qui suggère sa nature dominante.

L'intérêt particulier à ce nouveau mutant réside dans sa localisation extracytoplasmique, normalement destinée aux mutations récessives. En effet, les mutations dominantes, qui, à ce jour, sont toutes retrouvées dans la queue C-terminale intracytoplasmique, génèrent des protéines bien structurées capables de s'associer à leurs pairs sauvages. Ceci entraîne la séquestration de la protéine dans les compartiments cellulaires et induit un DIN même chez les hétérozygotes par un effet de dominance négative (Marr, Bichet et al. 2002, Leduc-Nadeau, Lussier et al. 2010, Moeller, Rittig et al. 2013). À l'opposé, les mutations récessives disséminées sur toute la structure membranaire du canal produisent des monomères AQP2-*mut* non fonctionnels. Chez les homozygotes *mut / mut*, seuls les monomères d'AQP2 non fonctionnels sont exprimés (**Fig. 19 en page 44**), lesquels sont condamnés à être séquestrés dans le RE puis dégradés (Moeller, Rittig et al. 2013). Chez les porteurs hétérozygotes non-symptomatiques, la présence de AQP2-*wt* produisant les tétramères fonctionnels assure la fonction.

De par ces prémices, nous avons mené une caractérisation comparative de la mutation T179N à l'égard de deux mutations types déjà répertoriées dans la littérature, soit R187C (forme récessive) et R254Q (forme dominante).

4.1 Caractérisation fonctionnelle du mutant T179N en ovocytes

D'emblée, la caractérisation du profil sauvage versus le mutant T179N demande la comparaison des paramètres de fonctionnalité (P_f) et d'expression biochimique. Comme le montre l'analyse par immunobuvardage (**Fig. 1-B en page 66**), l'expression de la forme sauvage est adéquate et directement corrélée aux quantités d'ARNm injectées (0.5 à 3 ng). À

l'opposé, l'ovocyte produit nettement moins de protéines mutées pour les mêmes quantités d'ARNm injectées ($23 \pm 6\%$ de la forme sauvage en analyse densitométrique). Ceci revient possiblement à un faible taux de synthèse ou à la nature instable du mutant qui se traduirait par une réduction de sa demi-vie (Tamarappoo and Verkman 1998). De même, on remarque que seule l'AQP2-*wt* est présente à la membrane plasmique (**Fig. 1-C en page 66**). Ceci traduit la séquestration de la protéine mutée T179N à l'intérieur de l'ovocyte, soit un phénotype courant à l'égard des mutations récessives pour l'AQP2 (Leduc-Nadeau, Lussier et al. 2010). Le profil à double bande mis en évidence pour T179N et qui indique une forme non-glycosylée à 29 kDa et une forme « core-glycosylated » à 31 kDa, est aussi caractéristique des formes mutantes récessives. Cette forme glycosylée traduit généralement un problème de maturation de la protéine et implique souvent sa séquestration dans le RE. En comparaison, les protéines sauvages d'AQP2 nouvellement synthétisées subissent un processus de maturation rapide qui, en passant par le complexe golgien, génère un mélange de formes non-glycosylées et à glycosylation complexe de 40-45 kDa (Kamsteeg and Deen 2000, Buck, Eledge et al. 2004). L'absence de trace dans la piste contrôle, correspondant à des ovocytes injectés à l'eau, indique l'absence de bruit de fond et souligne la qualité de détection. De plus, le taux d'expression en ovocyte n'est pas toujours constant et dépend de plusieurs facteurs, dont l'état des ovocytes eux-mêmes, la qualité de l'ARNm ainsi que la qualité d'injection. L'analyse de la perméabilité à l'eau (**Fig. 1-A en page 66**) démontre que pour les mêmes quantités d'ARNm injectées, seule l'AQP2-*wt* présente une fonctionnalité spécifique variant de (≈ 3 à $16 \text{ cm} \times 10^{-4}/\text{s}$) alors que le mutant T179N est sans activité avec une P_f similaire au contrôle ($\approx 2 \text{ cm} \times 10^{-4}/\text{s}$) et ce, même à quantité élevée d'ARNm injectée (3 ng). Bien que ceci soit en accord avec l'incapacité du mutant à se rendre à la membrane plasmique, nous ne pouvons toutefois spéculer sur la fonctionnalité réelle du mutant puisqu'au-delà de sa rétention, il est tout à fait envisageable que celui-ci soit néanmoins fonctionnel.

4.2 Comparaison du mutant T179N au modèle dominant prévalent

En tant que forme dominante, la protéine mutée T179N devrait démontrer une capacité d'association avec la forme sauvage, ce qui fut évalué dans un test de co-immunoprécipitation (**Fig. 2-B en page 67**) comparatif incluant, outre la forme sauvage et le mutant T179N, des

représentants classiques de formes récessives et dominantes, soit R187C et R254Q. L'analyse montre qu'à l'instar des variantes sauvage et dominante, T179N peut aussi s'associer à la forme sauvage pour générer une forme hétéromérique *wt/mut*. La suite attendue de ce processus devrait donc démontrer un comportement *dominant négatif* où la fonction globale serait réduite ou même abolie par défaut d'adressage (rétention des hétéromères dans la cellule). Or, il semble que la dominance négative n'est pas la seule issue possible et qu'à l'inverse, une récupération de la forme mutante puisse être observée.

4.3 Récupération fonctionnelle de mutants récessifs

Dernièrement, certaines études ont démontré un degré de fonctionnalité pour certaines mutations d'AQP2 en ovocytes allant de partiel (V24A, D150E, K228E) (Guyon, Lussier et al. 2009, Leduc-Nadeau, Lussier et al. 2010) à complet (P262L) (de Mattia, Savelkoul et al. 2004). Ainsi, il semblerait que certaines mutations récessives peuvent également générer des canaux à eau fonctionnels avec adressage membranaire effectif. Plus encore, ces formes semblent aussi pouvoir s'associer à la variante sauvage et, de ce fait, récupérer leur fonction. C'est dans cette perspective que nous avons effectué un test de récupération fonctionnelle (**Fig. 3-A, B, et C en page 68**) qui, à l'égard de T179N, démontre une capacité très élevée; alors qu'initialement totalement inactif, le mutant T179N démontre une forte capacité de récupération de fonction ($83\pm 7\%$ AQP2-*wt*) une fois coexprimé avec la forme sauvage. À l'inverse, et tel qu'attendu, le mutant dominant R254Q présente une capacité d'inhibition ($-45\pm 13\%$), qui traduit l'entrave de l'activité de l'AQP2-*wt*. Pour mettre au clair ces observations, un test de stabilité (**Fig. 4 en page 69**) a de plus démontré une augmentation de la densité de T179N lorsqu'en présence de l'AQP2-*wt*, à l'opposé de celle des mutants R187C et R254Q qui est fléchie. Ce comportement inattendu pour T179N le classe parmi cette nouvelle catégorie de mutations récessives susceptibles à la récupération en condition hétérozygote (Leduc-Nadeau, Lussier et al. 2010).

Ainsi, si les mutations récessives sont capables de multimériser, la possibilité d'obtenir des hétéromères *wt/mut* devient tout autant possible, sinon plus, alors que la forme sauvage pourrait agir en tant que chaperonne pour récupérer la forme mutée.

4.4 Détermination des propriétés de T179N dans les cellules mpkCCDc14

Les ovocytes de grenouille *Xenopus laevis* constituent un modèle d'expression efficace et fiable pour démontrer la fonctionnalité des canaux membranaires (Bissonnette, Noël et al. 1999, Leduc-Nadeau, Lussier et al. 2010). Il n'empêche que ce système d'expression ne reflète pas la réalité physiologique formelle. La nature dominante du mutant T179N est mise en évidence de par son association à l'AQP2-*wt* dans l'expérience de co-IP en ovocytes (**Fig. 2 en page 67**), pour ensuite être réfutée par la mise en évidence d'une récupération fonctionnelle (**Fig. 3 en page 68**) dans le même système. Les cellules mpkCCDc14 sont une lignée cellulaire qui conservent la plupart des grandes propriétés qui caractérisent les cellules principales du canal collecteur, pouvant même exprimer nativement l'AQP2 lorsque qu'induites de façon appropriée (Umenishi, Narikiyo et al. 2006). Pour corroborer les résultats obtenus en ovocytes, la propriété de récupération fonctionnelle de T179N a été évaluée dans cette lignée cellulaire en évaluant spécifiquement ses propriétés de ciblage membranaire comme élément clé. À cet égard, le ciblage adéquat de la forme sauvage telle qu'induite par la forskoline (**Fig. 5-A, B en page 70**) est retrouvé pour T179N seulement lorsque celui-ci est en présence d'AQP2-*wt* ($54\pm 6\%$). Le mutant R187C reste quant à lui insensible à la présence d'AQP2-*wt* et demeure séquestré à l'intérieur de la cellule. Par ailleurs, le mutant R254Q manifeste quant à lui son effet de dominance négative en séquestrant l'AQP2-*wt* à l'intérieur de la cellule. Ainsi, tout comme le démontrent les tests de récupération en ovocytes, le mutant T179N réussit à échapper au sort des mutants récessifs typiques en s'associant à l'AQP2-*wt*.

5. Conclusions

La littérature présente deux formes de mutations autosomiques à l'égard du DIN : les mutations dominantes, capables de multimériser et séquestrer la variante sauvage dans les compartiments intracellulaires, et les mutations récessives monomériques destinées à rester au RE et à être dégradées. Or, on assiste aujourd'hui à la naissance d'une nouvelle classe de mutants; des formes récessives, capables de s'associer à la variante sauvage et dont la fonction puisse être restituée. Au final, il s'agit ici de savoir qui, entre le sauvage et le mutant, aura le plus de poids; le mutant dominant qui inhibe la fonction de l'hétéromère, ou alors le récessif qui est entraîné dans sa fonction par son association à la sous-unité sauvage.

La mutation T179N demeure ambiguë. Le phénotype de DIN sévère chez le patient et l'hétérozygotie de la mutation soulignent un caractère dominant, bien que sa localisation extracytoplasmique et nos résultats expérimentaux démontrent le contraire. En ovocytes, les tests ont non seulement démontré sa capacité d'association avec la variante sauvage mais aussi la possibilité de regagner sa fonction par cette même association. Dans les cellules aussi, la récupération du mutant T179N à la membrane plasmique est mise en évidence par la présence de l'AQP2-*wt* à l'inverse de la mutation R187C, qui est typiquement récessive et de R254Q, qui présente les traits précis des mutations dominantes. Donc on conclut que la mutation T179N est récessive et disposée à regagner sa fonction.

Alors que le génotype (hétérozygote) et le phénotype (dominant) du patient semblent *a priori* clairs, il n'en demeure pas moins que les analyses démontrent une capacité de récupération fonctionnelle évidente pour cette mutation, ce qui n'est pas étrange vu la position extracytoplasmique de celle-ci. Aussi, la raison derrière le DIN sévère du patient demeure-t-elle obscure. Bien que le patient présente certaines conditions pathophysiologiques, il semble peu probable que ni le diabète type II ni l'hypothyroïdie puissent contribuer à la condition DIN. Aussi un séquençage exhaustif des introns pourrait révéler des informations importantes, alors que certaines observations récentes démontrent qu'il existerait une association entre les introns et les ARN non-codants qui peut être impliquée dans la régulation des profils d'expression des gènes dans le génome entier (Rearick, Prakash et al. 2011). Les

dernières études vont jusqu'à révéler la possibilité de gain d'introns dans une protéine codante par un mécanisme de duplication intragénique (Hellsten, Aspden et al. 2011). L'épissage des exons serait aussi révélateur sur l'existence d'autres mutations. Bien sûr, le dépistage d'un éventuel DIN chez des membres de la famille du patient contribuerait à valider hors de tout doute la nature dominante du phénotype, ce qui manque malheureusement pour le moment à cette étude.

Il va sans dire que cette nouvelle classe de mutations récessives est encore à son stade de développement. En effet, ce n'est que le début de toute une liste de mutations à découvrir et à caractériser, et c'est dans ce sens qu'il faut pousser les études pour mettre au clair les mécanismes sous-jacents à la récupération fonctionnelle. Aussi, il serait pertinent d'explorer ce mécanisme dans d'autres systèmes d'expression telles les levures par exemple, et tenter de comprendre les modalités qui régissent le principe de récupération fonctionnelle.

Cette nouvelle classe de mutations récessives est une lueur d'espoir aux patients atteints de DIN. Non seulement elle mettrait au clair les différentes protéines et chemins intracellulaires impliqués dans le DIN, mais elle ouvrirait une nouvelle avenue qui permettrait de développer des traitements qui pourraient significativement améliorer la vie des patients. D'où l'importance de poursuivre la caractérisation des mutants AQP2 car, outre leur impact évolutif et thérapeutique, ils constituent un modèle d'étude pour les protéines multimériques et permettent de démêler la relation entre les sous-unités sauvages et mutantes.

Bibliographie

Abascal, F., et al. (2013). "Diversity and evolution of membrane intrinsic proteins." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects.

Agre, P., et al. (2002). "Aquaporin water channels—from atomic structure to clinical medicine." J Physiol **542**(1): 3-16.

Agre, P. and D. Kozono (2003). "Aquaporin water channels: molecular mechanisms for human diseases." FEBS Lett **555**(1): 72-78.

Agre, P., et al. (1987). "Purification and partial characterization of the Mr 30,000 integral membrane protein associated with the erythrocyte Rh (D) antigen." Journal of Biological Chemistry **262**(36): 17497-17503.

Agre, P., et al. (1993). "Aquaporins: a family of water channel proteins." American Journal of Physiology-Renal Physiology **265**(3): F461-F461.

ARTHUS, M.-F., et al. (2000). "Report of 33 novel AVPR2 mutations and analysis of 117 families with X-linked nephrogenic diabetes insipidus." Journal of the American Society of Nephrology **11**(6): 1044-1054.

Babey, M., et al. (2011). "Familial forms of diabetes insipidus: clinical and molecular characteristics." Nature Reviews Endocrinology **7**(12): 701-714.

Badaut, J., et al. (2002). "Aquaporins in Brain: Distribution, Physiology, and Pathophysiology." Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism **22**(4): 367-378.

Bagnis, C., et al. (2000). "Syndrome polyuro-polydipsique: diabète insipide." Médecine thérapeutique **6**(6): 458-465.

Baylis, P. H. and T. Cheetham (1998). "Diabetes insipidus." Archives of disease in childhood **79**(1): 84-89.

Bens, M., et al. (1999). "Corticosteroid-dependent sodium transport in a novel immortalized mouse collecting duct principal cell line." Journal of the American Society of Nephrology **10**(5): 923-934.

Bichet, D. (1997). "Les diabètes insipides néphrogéniques héréditaires."

Bichet, D. (2005). "PHARMACOLOGIE CLINIQUE DE L'ARGININE-VASOPRESSINE." Actualités néphrologiques Jean Hamburger: 81-89.

- Bichet, D. G. (1998). "Nephrogenic diabetes insipidus." The American Journal of Medicine **105**(5): 431-442.
- Bichet, D. G. (2006). "Diabète insipides néphrogéniques." Nephrol Ther **2**(6): 387-404.
- Bichet, D. G., et al. (2012). "Aquaporin-2: new mutations responsible for autosomal-recessive nephrogenic diabetes insipidus—update and epidemiology." Clinical kidney journal **5**(3): 195-202.
- Birnbaumer, M. (2000). "Vasopressin receptors." Trends in Endocrinology & Metabolism **11**(10): 406-410.
- Bissonnette, P., et al. (1999). "Functional expression of tagged human Na⁺—glucose cotransporter in *Xenopus laevis* oocytes." J Physiol **520**(2): 359-371.
- Bouley, R., et al. (2005). "Stimulation of AQP2 membrane insertion in renal epithelial cells in vitro and in vivo by the cGMP phosphodiesterase inhibitor sildenafil citrate (Viagra)." American Journal of Physiology-Renal Physiology **288**(6): F1103-F1112.
- Brown, D. (2003). "The ins and outs of aquaporin-2 trafficking." American Journal of Physiology-Renal Physiology **284**(5): F893-F901.
- Brown, D., et al. (2008). "Phosphorylation events and the modulation of aquaporin 2 cell surface expression." Current opinion in nephrology and hypertension **17**(5): 491.
- Brown, D. D. (2004). "A tribute to the *Xenopus laevis* oocyte and egg." Journal of Biological Chemistry **279**(44): 45291-45299.
- Buck, T. M., et al. (2004). "Evidence for stabilization of aquaporin-2 folding mutants by N-linked glycosylation in endoplasmic reticulum." American Journal of Physiology-Cell Physiology **287**(5): C1292-C1299.
- Campbell, N. A. and R. Mathieu (1995). Biologie: Manuel: 1995, Editions du Renouveau Pédagogique, Incorporated.
- Canfield, M. C., et al. (1997). "Identification and characterization of aquaporin-2 water channel mutations causing nephrogenic diabetes insipidus with partial vasopressin response." Hum Mol Genet **6**(11): 1865-1871.
- Carbrey, J. M. and P. Agre (2009). Discovery of the aquaporins and development of the field. Aquaporins, Springer: 3-28.
- Cheng, A., et al. (1997). "Three-dimensional organization of a human water channel." Nature **387**(6633): 627-629.

Daudin, F. M. (1802). Histoire naturelle des Rainettes des grenouilles et des crapauds, Levrault.

Day, R. E., et al. (2013). "Human aquaporins: Regulators of transcellular water flow." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects.

De Groot, B. L., et al. (2003). "The mechanism of proton exclusion in the aquaporin-1 water channel." J Mol Biol **333**(2): 279-293.

de Groot, B. L. and H. Grubmüller (2001). "Water permeation across biological membranes: mechanism and dynamics of aquaporin-1 and GlpF." Science **294**(5550): 2353-2357.

de Mattia, F., et al. (2004). "A novel mechanism in recessive nephrogenic diabetes insipidus: wild-type aquaporin-2 rescues the apical membrane expression of intracellularly retained AQP2-P262L." Hum Mol Genet **13**(24): 3045-3056.

de Mattia, F., et al. (2005). "Lack of arginine vasopressin-induced phosphorylation of aquaporin-2 mutant AQP2-R254L explains dominant nephrogenic diabetes insipidus." Journal of the American Society of Nephrology **16**(10): 2872-2880.

Deen, P., et al. (1997). "Aquaporin-2 transfection of Madin-Darby canine kidney cells reconstitutes vasopressin-regulated transcellular osmotic water transport." Journal of the American Society of Nephrology **8**(10): 1493-1501.

Deen, P., et al. (1994). "Requirement of human renal water channel aquaporin-2 for vasopressin-dependent concentration of urine." Science **264**(5155): 92-95.

Delmas, A., et al. (2003). Place de la vasopressine chez les patients en choc septique. Annales francaises d'anesthesie et de reanimation, Elsevier.

Dumont, J. N. (1972). "Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals." Journal of Morphology **136**(2): 153-179.

Ecelbarger, C. A., et al. (1995). "Aquaporin-3 water channel localization and regulation in rat kidney." American Journal of Physiology-Renal Physiology **269**(5): F663-F672.

Echevarria, M., et al. (1994). "Cloning and expression of AQP3, a water channel from the medullary collecting duct of rat kidney." Proceedings of the National Academy of Sciences **91**(23): 10997-11001.

Elkjær, M.-L., et al. (2001). "Immunolocalization of aquaporin-8 in rat kidney, gastrointestinal tract, testis, and airways." American Journal of Physiology-Renal Physiology **281**(6): F1047-F1057.

Fenton, R. A., et al. (2008). "Acute regulation of aquaporin-2 phosphorylation at Ser-264 by vasopressin." Proceedings of the National Academy of Sciences **105**(8): 3134-3139.

- Fenton, R. A., et al. (2010). "A plate reader-based method for cell water permeability measurement." American Journal of Physiology-Renal Physiology **298**(1): F224-F230.
- Frick, A., et al. (2014). "X-ray structure of human aquaporin 2 and its implications for nephrogenic diabetes insipidus and trafficking." Proceedings of the National Academy of Sciences **111**(17): 6305-6310.
- Frigeri, A., et al. (1995). "Immunolocalization of the mercurial-insensitive water channel and glycerol intrinsic protein in epithelial cell plasma membranes." Proceedings of the National Academy of Sciences **92**(10): 4328-4331.
- Fu, D., et al. (2000). "Structure of a glycerol-conducting channel and the basis for its selectivity." Science **290**(5491): 481-486.
- Fushimi, K., et al. (1993). "Cloning and expression of apical membrane water channel of rat kidney collecting tubule." Nature **361**(6412): 549-552.
- Garvey, N. (2000). "Xenopus laevis" (On-line). Animal Diversity Web. http://animaldiversity.ummz.umich.edu/accounts/Xenopus_laevis/
- Gorelick, D. A., et al. (2006). "Aquaporin-11: a channel protein lacking apparent transport function expressed in brain." BMC biochemistry **7**(1): 14.
- Gorshkov, A., et al. (2009). "Arginine-vasopressin-induced structural alterations in MDCK cells." Cell and Tissue Biology **3**(2): 130-142.
- Gougoux, A. (2005). Physiologie des reins et des liquides corporels, Éditions MultiMondes.
- Gouraud, S., et al. (2002). "Functional involvement of VAMP/synaptobrevin-2 in cAMP-stimulated aquaporin 2 translocation in renal collecting duct cells." J Cell Sci **115**(18): 3667-3674.
- Graham, F., et al. (1977). "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5." Journal of General Virology **36**(1): 59-72.
- Gueutin, V., et al. (2012). "Physiologie rénale." Bulletin du Cancer **99**(3): 237-249.
- Gurdon, J. (1971). "Use of Frog Eggs and Oocytes for the Study of Messenger RNA and its Translation." Nature **233**: 177.
- Gurdon, J. B. (2013). "The egg and the nucleus: a battle for supremacy." Development **140**(12): 2449-2456.

Gurdon, J. B. and N. Hopwood (2000). "The introduction of *Xenopus laevis* into developmental biology: of empire, pregnancy testing and ribosomal genes." International Journal of Developmental Biology **44**(1): 43-50.

Guyon, C., et al. (2009). "Characterization of D150E and G196D aquaporin-2 mutations responsible for nephrogenic diabetes insipidus: importance of a mild phenotype." American Journal of Physiology-Renal Physiology **297**(2): F489-F498.

Hachez, C. and F. Chaumont (2010). Aquaporins: a family of highly regulated multifunctional channels. MIPs and their Role in the Exchange of Metalloids, Springer: 1-17.

Hasler, U., et al. (2002). "Long term regulation of aquaporin-2 expression in vasopressin-responsive renal collecting duct principal cells." Journal of Biological Chemistry **277**(12): 10379-10386.

Hebert, T. E., et al. (1996). "A peptide derived from a β 2-adrenergic receptor transmembrane domain inhibits both receptor dimerization and activation." Journal of Biological Chemistry **271**(27): 16384-16392.

Hellsten, U., et al. (2011). "A segmental genomic duplication generates a functional intron." Nature communications **2**: 454.

Hoffert, J. D., et al. (2008). "Vasopressin-stimulated increase in phosphorylation at Ser269 potentiates plasma membrane retention of aquaporin-2." Journal of Biological Chemistry **283**(36): 24617-24627.

Holmes, C. L., et al. (2001). "Physiology of vasopressin relevant to management of septic shock." CHEST Journal **120**(3): 989-1002.

Inoue, T., et al. (1998). "SNAP-23 in rat kidney: colocalization with aquaporin-2 in collecting duct vesicles." American Journal of Physiology-Renal Physiology **275**(5): F752-F760.

Ishibashi, K. (2009). New Members of Mammalian Aquaporins: AQP10–AQP12. Aquaporins. E. Beitz, Springer Berlin Heidelberg. **190**: 251-262.

Ishibashi, K., et al. (2009). "Aquaporin water channels in mammals." Clinical and Experimental Nephrology **13**(2): 107-117.

Ishibashi, K., et al. (2009). "The role of a group III AQP, AQP11 in intracellular organelle homeostasis." J Med Invest **56**: 312-317.

Ishibashi, K., et al. (1998). "Cloning and functional expression of a new aquaporin (AQP9) abundantly expressed in the peripheral leukocytes permeable to water and urea, but not to glycerol." Biochem Biophys Res Commun **244**(1): 268-274.

- Ishibashi, K., et al. (1994). "Molecular cloning and expression of a member of the aquaporin family with permeability to glycerol and urea in addition to water expressed at the basolateral membrane of kidney collecting duct cells." Proceedings of the National Academy of Sciences **91**(14): 6269-6273.
- Itoh, T., et al. (2005). "Identification of a novel aquaporin, AQP12, expressed in pancreatic acinar cells." Biochem Biophys Res Commun **330**(3): 832-838.
- Jung, J. S., et al. (1994). "Molecular structure of the water channel through aquaporin CHIP. The hourglass model." Journal of Biological Chemistry **269**(20): 14648-14654.
- Kamsteeg, E.-J., et al. (2003). "Reversed polarized delivery of an aquaporin-2 mutant causes dominant nephrogenic diabetes insipidus." J Cell Biol **163**(5): 1099-1109.
- Kamsteeg, E.-J., et al. (2006). "Short-chain ubiquitination mediates the regulated endocytosis of the aquaporin-2 water channel." Proceedings of the National Academy of Sciences **103**(48): 18344-18349.
- Kamsteeg, E.-J., et al. (1999). "An impaired routing of wild-type aquaporin-2 after tetramerization with an aquaporin-2 mutant explains dominant nephrogenic diabetes insipidus." The EMBO Journal **18**(9): 2394-2400.
- Kamsteeg, E. and P. Deen (2000). "Importance of aquaporin-2 expression levels in genotype-phenotype studies in nephrogenic diabetes insipidus." American Journal of Physiology-Renal Physiology **279**(4): F778-F784.
- King, L. S., et al. (2004). "From structure to disease: the evolving tale of aquaporin biology." Nature Reviews Molecular Cell Biology **5**(9): 687-698.
- King, L. S., et al. (2000). "Aquaporins in health and disease." Molecular Medicine Today **6**(2): 60-65.
- Klussmann, E., et al. (2001). "An inhibitory role of Rho in the vasopressin-mediated translocation of aquaporin-2 into cell membranes of renal principal cells." Journal of Biological Chemistry **276**(23): 20451-20457.
- Kozono, D., et al. (2002). "Aquaporin water channels: atomic structure molecular dynamics meet clinical medicine." Journal of Clinical Investigation **109**(11): 1395-1399.
- Lacour, B. (2013). "Physiologie du rein et bases physiopathologiques des maladies rénales." Revue Francophone des Laboratoires **2013**(451): 25-37.
- Leduc-Nadeau, A. (2010). "Analyse fonctionnelle de deux nouvelles mutations récessives de l'AQP2 impliquées dans le diabète insipide néphrogénique par expression dans les ovocytes de *Xenopus laevis*."

Leduc-Nadeau, A., et al. (2007). "Elaboration of a novel technique for purification of plasma membranes from *Xenopus laevis* oocytes." American Journal of Physiology-Cell Physiology **292**(3): C1132-C1136.

Leduc-Nadeau, A., et al. (2010). "New autosomal recessive mutations in aquaporin-2 causing nephrogenic diabetes insipidus through deficient targeting display normal expression in *Xenopus* oocytes." J Physiol **588**(12): 2205-2218.

Li, H., et al. (1997). "Molecular design of aquaporin-1 water channel as revealed by electron crystallography." Nature structural biology **4**(4): 263-265.

Lin, S.-H., et al. (2002). "Two novel aquaporin-2 mutations responsible for congenital nephrogenic diabetes insipidus in Chinese families." Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **87**(6): 2694-2700.

Lolait, S. J., et al. (1992). "Cloning and characterization of a vasopressin V2 receptor and possible link to nephrogenic diabetes insipidus."

Lolait, S. J., et al. (1995). "Molecular biology of vasopressin receptors." Annals of the New York Academy of Sciences **771**(1): 273-292.

Lorenz, D., et al. (2003). "Cyclic AMP is sufficient for triggering the exocytic recruitment of aquaporin-2 in renal epithelial cells." EMBO Rep **4**(1): 88-93.

Lu, H. A., et al. (2007). "Heat shock protein 70 interacts with aquaporin-2 and regulates its trafficking." Journal of Biological Chemistry **282**(39): 28721-28732.

Ma, T., et al. (1996). "cDNA Cloning and Gene Structure of a Novel Water Channel Expressed Exclusively in Human Kidney: Evidence for a Gene Cluster of Aquaporins at Chromosome Locus 12q13." Genomics **35**(3): 543-550.

Ma, T., et al. (1997). "Closely spaced tandem arrangement of AQP2, AQP5, and AQP6 genes in a 27-kilobase segment at chromosome locus 12q13." Genomics **43**(3): 387-389.

Maeda, Y., et al. (1993). "Vasopressin and oxytocin receptors coupled to Ca²⁺ mobilization in rat inner medullary collecting duct." Am J Physiol **265**(1 Pt 2): F15-25.

Maghnie, M., et al. (2000). "Central Diabetes Insipidus in Children and Young Adults." New England Journal of Medicine **343**(14): 998-1007.

Makaryus, A. N. and S. I. McFarlane (2006). "Diabetes insipidus: diagnosis and treatment of a complex disease." Cleveland Clinic journal of medicine **73**(1): 65-71.

Marieb, E. N. and R. Lachaine (1999). Anatomie et physiologie humaines, Editions du Renouveau Pedagogique, Incorporated.

- Marples, D., et al. (1995). "Lithium-induced downregulation of aquaporin-2 water channel expression in rat kidney medulla." Journal of Clinical Investigation **95**(4): 1838.
- Marples, D., et al. (1996). "Hypokalemia-induced downregulation of aquaporin-2 water channel expression in rat kidney medulla and cortex." Journal of Clinical Investigation **97**(8): 1960.
- Marples, D., et al. (1999). "Long-term regulation of aquaporins in the kidney." American Journal of Physiology-Renal Physiology **276**(3): F331-F339.
- Marr, N., et al. (2002). "Cell-biologic and functional analyses of five new aquaporin-2 missense mutations that cause recessive nephrogenic diabetes insipidus." Journal of the American Society of Nephrology **13**(9): 2267-2277.
- Marr, N., et al. (2002). "Heteroligomerization of an aquaporin-2 mutant with wild-type aquaporin-2 and their misrouting to late endosomes/lysosomes explains dominant nephrogenic diabetes insipidus." Hum Mol Genet **11**(7): 779-789.
- Marr, N., et al. (2001). "Functionality of aquaporin-2 missense mutants in recessive nephrogenic diabetes insipidus." Pflügers Archiv **442**(1): 73-77.
- Martin, N. P., et al. (2003). "Regulation of V2 vasopressin receptor degradation by agonist-promoted ubiquitination." Journal of Biological Chemistry **278**(46): 45954-45959.
- Moeller, H. B., et al. (2013). "Nephrogenic diabetes insipidus: essential insights into the molecular background and potential therapies for treatment." Endocrine reviews **34**(2): 278-301.
- Morello, J.-P. and D. G. Bichet (2001). "Nephrogenic diabetes insipidus." Annual review of physiology **63**(1): 607-630.
- Mulders, S., et al. (1996). "Physiology and pathophysiology of aquaporins." European journal of clinical investigation **26**(12): 1041-1050.
- Mulders, S. M., et al. (1998). "An aquaporin-2 water channel mutant which causes autosomal dominant nephrogenic diabetes insipidus is retained in the Golgi complex." Journal of Clinical Investigation **102**(1): 57.
- Mulders, S. M., et al. (1995). "Water channel properties of major intrinsic protein of lens." Journal of Biological Chemistry **270**(15): 9010-9016.
- Murata, K., et al. (2000). "Structural determinants of water permeation through aquaporin-1." Nature **407**(6804): 599-605.

Nedvetsky, P. I., et al. (2010). "Reciprocal regulation of aquaporin-2 abundance and degradation by protein kinase A and p38-MAP kinase." Journal of the American Society of Nephrology **21**(10): 1645-1656.

Nedvetsky, P. I., et al. (2009). Regulation of aquaporin-2 trafficking. Aquaporins, Springer: 133-157.

Nielsen, S., et al. (2002). "Aquaporins in the kidney: from molecules to medicine." Physiological reviews **82**(1): 205-244.

Nielsen, S., et al. (1997). "Aquaporins in complex tissues. II. Subcellular distribution in respiratory and glandular tissues of rat." American Journal of Physiology-Cell Physiology **273**(5): C1549-C1561.

Nielsen, S., et al. (1999). "Physiology and pathophysiology of renal aquaporins." Journal of the American Society of Nephrology **10**(3): 647-663.

Nielsen, S., et al. (1995). "Expression of VAMP-2-like protein in kidney collecting duct intracellular vesicles. Colocalization with Aquaporin-2 water channels." Journal of Clinical Investigation **96**(4): 1834.

Noda, Y., et al. (2004). "Aquaporin-2 trafficking is regulated by PDZ-domain containing protein SPA-1." FEBS Lett **568**(1): 139-145.

Noda, Y., et al. (2004). "Water channel aquaporin-2 directly binds to actin." Biochem Biophys Res Commun **322**(3): 740-745.

Noda, Y. and S. Sasaki (2005). "Trafficking mechanism of water channel aquaporin-2." Biology of the Cell **97**(12): 885-892.

Noda, Y., et al. (2010). "Aquaporins in kidney pathophysiology." Nature Reviews Nephrology **6**(3): 168-178.

Oakley, R. H., et al. (1999). "Association of β -arrestin with G protein-coupled receptors during clathrin-mediated endocytosis dictates the profile of receptor resensitization." Journal of Biological Chemistry **274**(45): 32248-32257.

Oakley, R. H., et al. (2001). "Molecular determinants underlying the formation of stable intracellular G protein-coupled receptor- β -arrestin complexes after receptor endocytosis*." Journal of Biological Chemistry **276**(22): 19452-19460.

Papadopoulos, M. C. and A. S. Verkman (2007). "Aquaporin-4 and brain edema." Pediatric nephrology **22**(6): 778-784.

Pisitkun, T., et al. (2006). "High-throughput identification of IMCD proteins using LC-MS/MS." Physiological genomics **25**(2): 263.

- Pisitkun, T., et al. (2004). "Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(36): 13368-13373.
- Preston, G. M. and P. Agre (1991). "Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 kilodaltons: member of an ancient channel family." Proceedings of the National Academy of Sciences **88**(24): 11110-11114.
- Preston, G. M., et al. (1992). "Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein." Science **256**(5055): 385-387.
- Preston, G. M., et al. (1993). "The mercury-sensitive residue at cysteine 189 in the CHIP28 water channel." Journal of Biological Chemistry **268**(1): 17-20.
- Preston, G. M., et al. (1994). "Membrane topology of aquaporin CHIP. Analysis of functional epitope-scanning mutants by vectorial proteolysis." Journal of Biological Chemistry **269**(3): 1668-1673.
- Rauchman, M. I., et al. (1993). "An osmotically tolerant inner medullary collecting duct cell line from an SV40 transgenic mouse." American Journal of Physiology-Renal Physiology **265**(3): F416-F424.
- Rearick, D., et al. (2011). "Critical association of ncRNA with introns." Nucleic acids research **39**(6): 2357-2366.
- Robben, J. H., et al. (2006). "Cell biological aspects of the vasopressin type-2 receptor and aquaporin 2 water channel in nephrogenic diabetes insipidus." American Journal of Physiology-Renal Physiology **291**(2): F257-F270.
- Robert-Nicoud, M., et al. (2001). "Transcriptome of a mouse kidney cortical collecting duct cell line: effects of aldosterone and vasopressin." Proceedings of the National Academy of Sciences **98**(5): 2712-2716.
- Robinson, A. G. (1976). "DDAVP in the treatment of central diabetes insipidus." New England Journal of Medicine **294**(10): 507-511.
- Rojek, A., et al. (2008). "A current view of the mammalian aquaglyceroporins." Annu. Rev. Physiol. **70**: 301-327.
- Rojek, A. M., et al. (2007). "Defective glycerol metabolism in aquaporin 9 (AQP9) knockout mice." Proceedings of the National Academy of Sciences **104**(9): 3609-3614.
- Saadoun, S., et al. (2005). "Impairment of angiogenesis and cell migration by targeted aquaporin-1 gene disruption." Nature **434**(7034): 786-792.

Sands, J. M. and D. G. Bichet (2006). "Nephrogenic diabetes insipidus." Annals of Internal Medicine **144**(3): 186-194.

Sasaki, S. (2012). "Aquaporin 2: from its discovery to molecular structure and medical implications." Molecular aspects of medicine **33**(5): 535-546.

Sasaki, S. (2012). "Aquaporin 2: From its discovery to molecular structure and medical implications." Molecular aspects of medicine **33**(5-6): 535-546.

Sasaki, S., et al. (1994). "Cloning, characterization, and chromosomal mapping of human aquaporin of collecting duct." Journal of Clinical Investigation **93**(3): 1250.

Sasaki, S. and Y. Noda (2007). "Aquaporin-2 protein dynamics within the cell." Current opinion in nephrology and hypertension **16**(4): 348-352.

Savelkoul, P. J. M., et al. (2009). "p.R254Q mutation in the aquaporin-2 water channel causing dominant nephrogenic diabetes insipidus is due to a lack of arginine vasopressin-induced phosphorylation." Hum Mutat **30**(10): E891-E903.

Schenk, A. D., et al. (2005). "The 4.5Å Structure of Human AQP2." J Mol Biol **350**(2): 278-289.

Schrier, R. W. and M. A. Cadnapaphornchai (2003). "Renal aquaporin water channels: from molecules to human disease." Progress in Biophysics and Molecular Biology **81**(2): 117-131.

Smith, B. L. and P. Agre (1991). "Erythrocyte Mr 28,000 transmembrane protein exists as a multisubunit oligomer similar to channel proteins." Journal of Biological Chemistry **266**(10): 6407-6415.

Soloff, M. S. and Y.-J. Jeng (2003). Oxytocin/Vasopressin Receptor Signaling. Encyclopedia of Hormones. L. H. Editors-in-Chief: Helen and W. N. Anthony. New York, Academic Press: 122-131.

Tajika, Y., et al. (2005). "Differential regulation of AQP2 trafficking in endosomes by microtubules and actin filaments." Histochem Cell Biol **124**(1): 1-12.

Tajika, Y., et al. (2004). "Aquaporin-2 is retrieved to the apical storage compartment via early endosomes and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway." Endocrinology **145**(9): 4375-4383.

Tajkhorshid, E., et al. (2002). "Control of the selectivity of the aquaporin water channel family by global orientational tuning." Science **296**(5567): 525-530.

Tamarappoo, B. and A. Verkman (1998). "Defective aquaporin-2 trafficking in nephrogenic diabetes insipidus and correction by chemical chaperones." Journal of Clinical Investigation **101**(10): 2257.

- Tsukaguchi, H., et al. (1995). "Binding-, intracellular transport-, and biosynthesis-defective mutants of vasopressin type 2 receptor in patients with X-linked nephrogenic diabetes insipidus." Journal of Clinical Investigation **96**(4): 2043.
- Tsukaguchi, H., et al. (1998). "Molecular characterization of a broad selectivity neutral solute channel." Journal of Biological Chemistry **273**(38): 24737-24743.
- Uawithya, P., et al. (2008). "Transcriptional profiling of native inner medullary collecting duct cells from rat kidney." Physiological genomics **32**(2): 229.
- Umenishi, F., et al. (2006). "cAMP regulates vasopressin-induced AQP2 expression via protein kinase A-independent pathway." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes **1758**(8): 1100-1105.
- Van Balkom, B. W., et al. (2002). "The role of putative phosphorylation sites in the targeting and shuttling of the aquaporin-2 water channel." Journal of Biological Chemistry **277**(44): 41473-41479.
- van den Ouweland, A. M., et al. (1992). "Mutations in the vasopressin type 2 receptor gene (AVPR2) associated with nephrogenic diabetes insipidus." Nature genetics **2**(2): 99-102.
- Verbalis, J. G. (2009). 49 - Vasopressin Receptors. Hormones, Brain and Behavior (Second Edition). W. P. Editors-in-Chief: Donald, P. A. Arthur, E. F. Susan et al. San Diego, Academic Press: 1599-1610.
- Verkman, A. (2008). "Mammalian aquaporins: diverse physiological roles and potential clinical significance." Expert Rev Mol Med **10**: e13.
- Verkman, A., et al. (2006). "Three distinct roles of aquaporin-4 in brain function revealed by knockout mice." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes **1758**(8): 1085-1093.
- Walz, T., et al. (1997). "The three-dimensional structure of aquaporin-1." Nature **387**(6633): 624-626.
- Wang, W., et al. (2003). "Aquaporin expression in developing human teeth and selected orofacial tissues." Calcified tissue international **72**(3): 222-227.
- Wheater, P. R., et al. (2001). Histologie fonctionnelle. Paris, De Boeck Université.
- Wheater, P. R., et al. (2001). Histologie fonctionnelle, De Boeck Supérieur.
- Wilson, J. L., et al. (2013). "Vasopressin and the regulation of aquaporin-2." Clinical and Experimental Nephrology **17**(6): 751-764.

Yang, B., et al. (2005). "Phenotype analysis of aquaporin-8 null mice." American Journal of Physiology-Cell Physiology **288**(5): C1161-C1170.

Yasui, M., et al. (1999). "Rapid gating and anion permeability of an intracellular aquaporin." Nature **402**(6758): 184-187.

Yasui, M., et al. (1999). "Aquaporin-6: an intracellular vesicle water channel protein in renal epithelia." Proceedings of the National Academy of Sciences **96**(10): 5808-5813.

Yip, K. P. (2002). "Coupling of vasopressin-induced intracellular Ca²⁺ mobilization and apical exocytosis in perfused rat kidney collecting duct." J Physiol **538**(3): 891-899.

Zeidel, M. L., et al. (1992). "Reconstitution of functional water channels in liposomes containing purified red cell CHIP28 protein." Biochemistry **31**(33): 7436-7440.