



Les caractéristiques cinétiques du transport ionique par les différents variants du cotransporteur NKCC2

Mémoire

Laurence Tremblay

Maîtrise en sciences cliniques et biomédicales - avec mémoire
Maître ès sciences (M. Sc.)

Québec, Canada

Les caractéristiques cinétiques du transport ionique par les différents variants du cotransporteur NKCC2

Mémoire

Laurence Tremblay

Sous la direction de :

Paul Isenring, directeur de recherche

Résumé

Le cotransporteur $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$ de type 2 (NKCC2) appartient à la famille des cotransporteurs cation- Cl^- (CCC). Il existe en tant que trois variants d'épissage, appelés A, B et F, qui ne diffèrent entre eux que de 32 acides aminés et qui sont tous localisés sur la membrane apicale de l'anse ascendante de Henle (AAH) à l'état homodimérique. Ils sont cependant exprimés de façon différentielle : NKCC2F se retrouve à la partie initiale de l'AAH où il assure une réabsorption importante du NaCl pour le maintien du volume extracellulaire alors que NKCC2A et NKCC2B se retrouvent à la partie distale de l'AAH et dans la macula densa où ils assurent une réabsorption plus modeste du NaCl pour aider au maintien du volume extracellulaire et soutenir la rétroaction tubuloglomérulaire. Comme « A » et « B » se retrouvent dans des types cellulaires communs, nous nous sommes demandé : 1) s'ils pouvaient former des hétérodimères AB dont les caractéristiques de transport ionique différaient de AA et BB et 2) si les quantités relatives de AA, AB et BB pouvaient être régulés pour permettre à l'AAH distale et à la macula densa d'opérer adéquatement à l'intérieur d'un éventail de concentrations ioniques plus large. L'objectif de recherche a donc été de générer des constructions d'ADNc où deux variants sont connectés entre eux par un « linker » inerte pour forcer la formation de dimères AA, AB ou BB, d'exprimer le produit de ces constructions dans des ovocytes de *Xenopus laevis* et d'en caractériser la cinétique de transport. Nous avons trouvé que des hétérodimères déployaient des caractéristiques fonctionnelles uniques (différentes par rapport à AA ou BB). Les vitesses maximales de transport atteintes par l'hétérodimère AB étaient beaucoup plus élevées que les homodimères AA et BB. Nos données suggèrent ainsi que les sous-unités assemblées coopèrent entre elles durant le processus de transport. Nos données ouvrent aussi la voie sur la possibilité que la quantité d'hétérodimères formés puisse être régulée de manière à permettre un spectre de réponses en fonction des besoins à combler.

Abstract

The Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransporter type 2 (NKCC2) belongs to the cation-Cl⁻ cotransporter (CCC) family. It exists as three splice variants called A, B and F that differ among each other by 32 residues and that are all localized on the apical membrane of the thick ascending loop of Henle (TALH) as homodimers. However, they are differentially distributed along this nephron segment: NKCC2F is localized in the initial part of the TALH where it ensures substantial NaCl reabsorption to maintain the extracellular fluid volume and NKCC2A and NKCC2B are localized in the distal part of the TALH where it ensure more modest NaCl reabsorption to help in the maintenance of the extracellular fluid volume and support the tubuloglomerular feedback. As “A” and “B” are localized in the same cellular types, we asked ourselves: 1) whether they could form AB heterodimers with transport characteristics that differ from AA and BB and 2) whether the relative quantities of AA, AB and BB formed could be regulated to allow the distal TALH and macula densa to operate adequately within a wider range of ionic concentrations. My research objective was thus to generate cDNA constructs in which the A and/or B variants are connected to each other by an inert “*linker*” to force the formation of AA, AB or BB by proximity, to express the product of these cDNA constructs in *Xenopus laevis* oocytes and to characterize the transport kinetics of the NKCC2 produced. We found that AB heterodimers exhibited unique functional characteristics (relative to AA or BB). In particular, maximal transport rates were much higher for the AB heterodimers than for the AA and BB homodimers. Our data therefore suggest that the assembled subunits cooperate with each other during the transport cycle. Our data also pave the way towards the possibility that the quantity of AB heterodimers formed is regulated such that an array of responses are allowed as a function of the needs to be met.

Table des matières

Résumé	ii
Abstract.....	iii
Table des matières	iv
Liste des figures.....	vi
Liste des tableaux.....	viii
Liste des abréviations	ix
Remerciements.....	xi
Introduction	1
1. Le rein	1
1.1. Anatomie et physiologie	1
1.2. Régulation du débit de filtration glomérulaire	2
2. Le transport membranaire	3
2.1. La membrane cellulaire.....	3
2.2. Les protéines membranaires de transport.....	4
2.3. La famille des <i>solute carriers</i>	5
3. Les cotransporteurs cation-chlore	5
3.1. Les cotransporteurs NKCC.....	7
3.1.1. NKCC1.....	8
3.1.2. NKCC2.....	10
3.1.2.1. Distribution	10
3.1.2.2. Structure.....	10
3.1.2.3. Variants d'épissage	10
3.1.2.4. Physiologie	11
3.1.2.5. Rôles	12
3.1.2.6. Régulation	13
3.1.2.7. Physiopathologie	13
3.2. Le cotransporteur NCC	14
3.3. Les cotransporteurs KCC	15
4. Le processus de dimérisation.....	16
4.1. Préambule	16
4.2. Principes de base.....	16
4.3. Oligomérisation chez les CCC	17
4.3.1. Démonstration et processus de la dimérisation chez les CCC	17
4.3.2. Hétérodimérisation chez les CCC.....	18

4.3.3. Rôle de la dimérisation chez les CCC	18
4.3.4. Structure 3D.....	19
5. Hypothèses et objectifs	20
Chapitre 1. Matériels et méthodes	21
1. Vecteur Pol1	21
2. Clonage des variants de NKCC2.....	21
3. Design des constructions d'ADNc	21
3.1. Préparation du vecteur	22
3.2. Insertion de la séquence <i>linker</i>	22
3.3. Préparation et ajout des gènes d'intérêt dans les sites d'insertion du vecteur	24
3.4. Vérification et validation de la séquence des constructions obtenues	25
4. Expression dans les ovocytes de <i>Xenopus laevis</i>	25
4.1. Techniques de <i>Western blot</i> et de co-immunoprécipitations.....	26
4.2. Immunofluorescence	27
5. Études de transport	28
6. Statistiques.....	30
Chapitre 2. Résultats	31
1. <i>Western blot</i> et co-immunoprécipitations.....	31
1.1. Constructions simples	31
1.2. Constructions doubles.....	31
2. Immunofluorescence	36
2.1. Constructions simples	36
2.2. Constructions doubles.....	36
3. Études de transport	43
3.1. Constructions simples	43
3.2. Constructions doubles.....	46
Chapitre 3. Discussion	51
1. Expression de NKCC2 dans les ovocytes	51
1.1. Constructions simples	51
1.2. Constructions doubles.....	53
2. Cinétiques de transport de NKCC2	54
2.1. Constructions simples	54
2.2. Constructions doubles.....	55
3. Contextualisation des résultats.....	55
Conclusion	57
Bibliographie	58

Liste des figures

Introduction

Figure 1. Le néphron.....	2
Figure 2. Perméabilité de la membrane	4
Figure 3. Le transport membranaire.....	5
Figure 4. Exemple de la structure hydrophatique des membres de la famille des CCC.	6
Figure 5. Phylogénie de la famille des CCC.....	7
Figure 6. Les changements du volume cellulaire activent certains CCC pour le retour à un volume cellulaire normal.....	9
Figure 7. Alignement d'une portion des séquences de NKCC2A, NKCC2B et NKCC2F de lapin.	11

Chapitre 1. Matériels et méthodes

Figure 8. Constructions d'ADNc mettant en relation les variants A et B du cotransporteur NKCC2 selon toutes les combinaisons possibles dans le vecteur Pol1	22
Figure 9. Préparation du vecteur par l'ajout de sites de restriction uniques pour créer les sites d'insertion des variants du cotransporteur NKCC2	23
Figure 10. Représentation de la séquence du <i>linker</i> reliant les deux sites d'insertion dans le vecteur Pol1....	24

Chapitre 2. Résultats

Figure 11. Western blot et co-immunoprécipitations entre les constructions simples myc-NKCC2A et NKCC2B-flag et détection de la membrane par l'anticorps anti-myc.....	33
Figure 12. Western blot et co-immunoprécipitations entre les constructions simples myc-NKCC2A et NKCC2B-flag et détection de la membrane par l'anticorps anti-flag.....	34
Figure 13. Western blot des protéines AA, BB et AB et détection de la membrane par l'anticorps anti-myc...	35
Figure 14. Immunofluorescences de la construction simple myc-NKCC2A injectée seule dans les ovocytes.	37
Figure 15. Immunofluorescences de la construction simple NKCC2B-flag injectée seule dans les ovocytes..	38
Figure 16. Immunofluorescences des constructions simples myc-NKCC2A et NKCC2B-flag coinjectées dans les mêmes ovocytes.	39
Figure 17. Immunofluorescences de l'homodimère AA.....	40
Figure 18. Immunofluorescences de l'homodimère BB.....	41
Figure 19. Immunofluorescences de l'hétérodimère AB	42
Figure 20. Effet du changement de la concentration extracellulaire de $^{85}\text{Rb}^+$ après une préincubation en milieu isotonique (200 mOsm) sur les caractéristiques de transport des cotransporteurs myc-NKCC2A et NKCC2B-flag coinjectés sous la forme de constructions simples dans les ovocytes.....	44
Figure 21. Effet du changement de la concentration extracellulaire de $^{85}\text{Rb}^+$ après une préincubation en milieu hypertonique (285 mOsm) sur les caractéristiques de transport des cotransporteurs myc-NKCC2A et NKCC2B-flag coinjectés sous la forme de constructions simples dans les ovocytes	45

Figure 22. Effet du changement de la concentration extracellulaire de $^{85}\text{Rb}^+$ après une préincubation en milieu isotonique (200 mOsm) sur les caractéristiques de transport des dimères AA, AB et BB du cotransporteur NKCC2 injectés sous la forme de constructions doubles dans les ovocytes 48

Figure 23. Effet du changement de la concentration extracellulaire de $^{85}\text{Rb}^+$ après une préincubation en milieu hypertonique (285 mOsm) sur les caractéristiques de transport des dimères AA, AB et BB du cotransporteur NKCC2 injectés sous la forme de constructions doubles dans les ovocytes..... 49

Figure 24. Effet de l'ajout de furosémide dans le milieu d'incubation sur l'influx en $^{85}\text{Rb}^+$ par les cotransporteurs NKCC2A et NKCC2B injectés sous la forme de constructions doubles dans les ovocytes..... 50

Liste des tableaux

Introduction

Tableau 1. Moyennes calculées des caractéristiques de la cinétique de transport des variants NKCC2B, NKCC2A et NKCC2F rapportées dans la littérature. 12

Chapitre 1. Matériels et méthodes

Tableau 2. Description des réactions de mutagenèses pour l'insertion de sites de restriction uniques dans le vecteur Pol1..... 23

Tableau 3. Description des réactions de mutagenèses d'insertion pour l'élongation du *linker* dans le vecteur Pol1..... 24

Tableau 4. Description des réactions de PCR pour l'insertion des gènes de NKCC2A et NKCC2B dans le premier site d'insertion du vecteur Pol1 par la technologie In Fusion..... 25

Tableau 5. Séquence des oligonucléotides utilisés à des fins de la validation des constructions obtenues 25

Tableau 6. Composantes du milieu Barth 26

Tableau 7. Composantes du milieu Miki 27

Tableau 8. Composantes des milieux de préincubation pour induire les changements de volume chez les ovocytes..... 29

Tableau 9. Composantes du milieu d'incubation avec rubidium 29

Chapitre 2. Résultats

Tableau 10. Résultats des test de student (*p-values*) pour la comparaison des moyennes des $K_m(\text{Rb}^+)$ et des $V_{\text{max}}(\text{Rb}^+)$ des cotransporteurs NKCC2A et NKCC2B coinjectés sous la forme de constructions simples à la suite de préincubations en milieu isotonique et hypertonique. Les moyennes comparées proviennent de 3-5 expériences. 43

Tableau 11. Résultats des test de student (*p-values*) pour la comparaison des moyennes des $K_m(\text{Rb}^+)$ et des $V_{\text{max}}(\text{Rb}^+)$ des cotransporteurs NKCC2A et NKCC2B injectés sous la forme de constructions doubles à la suite de préincubations en milieu isotonique et hypertonique. Les moyennes comparées proviennent de 4-7 expériences. 47

Liste des abréviations

Å	Ångström
AA	Homodimère formé de NKCC2A et NKCC2A
AAH	Anse ascendante de Henle
AB	Hétérodimère formé de NKCC2A et NKCC2B
ADH	Hormone antidiurétique
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i>
ARN	Acide ribonucléique
ARNc	Acide ribonucléique complémentaire
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine triphosphate
BB	Homodimère formé de NKCC2B et NKCC2B
CCC	Cotransporteur cation-chlore ou <i>cation-chloride cotransporters</i>
CCC8	Cotransporteur cation-Cl ⁻ de type 8
CCC9	Cotransporteur cation-Cl ⁻ de type 9
C-terminal	Carboxyle-terminal
DFG	Débit de filtration glomérulaire
FRET	<i>Fluorescence resonance energy transfert</i>
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
h	Heure
HEK	<i>Human embryonic kidney</i>
HMSN/ACC	<i>Hereditary motor sensory neuropathy with agenesis of the corpus callosum</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
IgG	Immunoglobuline G
IP	Immunoprécipitation
KCC	Cotransporteur K ⁺ -Cl ⁻
KCC1	Cotransporteur K ⁺ -Cl ⁻ de type 1
KCC2	Cotransporteur K ⁺ -Cl ⁻ de type 2
KCC3	Cotransporteur K ⁺ -Cl ⁻ de type 3
KCC4	Cotransporteur K ⁺ -Cl ⁻ de type 4
kDa	Kilodaltons
Km	Constante de Michaelis-Menten
NCC	Cotransporteur Na ⁺ -Cl ⁻
NKCC	Cotransporteur Na ⁺ -K ⁺ -Cl ⁻
NKCC1	Cotransporteur Na ⁺ -K ⁺ -Cl ⁻ de type 1
NKCC2	Cotransporteur Na ⁺ -K ⁺ -Cl ⁻ de type 1
N-terminal	Amino-terminal
o	Ovocyte
OCT	<i>Optimal cutting temperature</i>
OSR1	<i>Oxidative stress-response kinase 1</i>

Pb	Paire de base
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PHAI	Pseudohypoaldostéronisme de type II
PKA	Protéine kinase A
PNF	Pression nette de filtration
PTH	Hormone parathyroïdienne
PVFD	<i>Polyvinylidene difluoride</i>
RVD	<i>Regulatory volume decrease</i>
RVI	<i>Regulatory volume increase</i>
S.E.	<i>Standard error</i>
SLC	<i>Solute carrier</i>
SPAK	<i>Ste20/SPS1-related proline/alanine-rich kinase</i>
SYK	Rate tyrosine kinase
TALH	<i>Thick ascending loop of Henle</i>
TM	Domaine transmembranaire
USP5	<i>Ubiquitin specific peptidase 5</i>
Vmax	Vitesse maximale
Wnk1	<i>With no lysine (k) type 1</i>
Wnk3	<i>With no lysine (k) type 3</i>
Wnk4	<i>With no lysine (k) type 4</i>
3D	Trois dimensions

Remerciements

Tout d'abord, un énorme merci à mon directeur de recherche, Dr. Paul Isenring, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et pour avoir rendu ce projet de maîtrise possible. Merci pour son soutien et son aide, c'est grâce à ses précieux conseils et sa grande patience que j'ai pu entreprendre et terminer ce projet. Merci pour cette chance, j'en serai éternellement reconnaissante!

J'aimerais ensuite remercier avec beaucoup de gratitude toute l'équipe de laboratoire qui m'a épaulée tout au long de mon parcours au laboratoire. Merci à Rachele Frenette-Cotton de m'avoir formée et montré les règles de l'art! Merci de m'avoir enseigné cette précision qui fait de moi aujourd'hui une étudiante très soucieuse des détails! Merci à Andrée-Anne Marcoux de m'avoir aussi entraînée dans ce monde infini qu'est NKCC2 et d'avoir été une source inépuisable d'informations sur le sujet! Merci à Marie-Jeanne Fiola, pour son aide dans les manipulations quand je ne voyais pas la fin. Merci à Salma et Louis-Phillipe pour leur éternel entrain et merci à Ludwig pour sa gentillesse sans limites! Merci à Alexandre pour son humour incroyable!

Finalement, je ne saurais jamais assez remercier Samira Slimani pour son aide plus que précieuse tout au long de cette maîtrise! Sans elle, ce projet n'aurait pas progressé aussi bien. Merci pour tous ces matins où nous sommes levées beaucoup trop tôt pour faire ces interminables flux et pour les avoir rendus plus agréables! Merci à ma collègue de laboratoire, mais aussi à cette amie incroyable que j'ai découverte en elle. Merci à ces interminables soirées, à ces longues journées à toujours jaser des mêmes choses, à ces podcasts qui nous ont rapprochés et à ces nombreux *bubble tea* que nous avons partagés! Merci à elle pour ces deux années précieuses, et pour les prochaines années à venir en sa compagnie!

Un merci sans fin à ma famille, et pour tout l'amour et le soutien qu'ils m'ont apporté pendant mes études. Vous êtes et serez toujours la raison me poussant à me dépasser tous les jours. Je vous aime tous à l'infini. Merci pour m'avoir toujours appuyée et pour m'avoir transmis cette passion qu'est l'école. Puis, un petit mot pour remercier de tout mon cœur ces amis en or que j'ai rencontrés à Québec. Ils ont été le gage de ma réussite et de mon épanouissement dans cette nouvelle ville. Merci à ma *partner in crime*, Mylène, pour avoir vécu toutes ces belles expériences avec moi! Merci à elle et à sa belle pour m'avoir hébergée si chaleureusement dans ces derniers mois de maîtrise! Finalement, merci à mon copain Nicolas d'avoir vécu chaque jour de cette maîtrise avec moi! Merci aussi à sa petite famille, qui m'a toujours supportée dans ce grand projet!

Pour terminer, je suis immensément reconnaissante envers la Société québécoise d'hypertension artérielle et la fondation du CHU de Québec pour leur soutien financier tout au long de cette maîtrise. Je tiens aussi à remercier tout le personnel du centre de recherche, pour avoir toujours eu la réponse à tout et pour m'avoir aidée sans retenue pendant ce projet!

Introduction

Les reins, en plus de permettre l'excrétion des déchets produits par l'organisme, jouent un rôle majeur dans la régulation du volume et de la composition du sang qui parcourt les vaisseaux sanguins. Les reins sont ainsi impliqués dans la régulation de la pression artérielle et peuvent donc influencer l'apparition d'hypertension artérielle chez certains individus. L'hypertension artérielle est un facteur de risque important pour les maladies cardiovasculaires, qui sont une des causes principales de mortalité chez les Canadiens (1). Pour ces raisons, il est important de mieux comprendre la physiologie rénale et les acteurs rénaux qui ont la capacité d'influencer la pression artérielle. NKCC2, étant un cotransporteur rénal des ions $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$, est la cible des diurétiques de l'anse qui sont souvent utilisés en clinique pour réduire le volume extracellulaire (2). Il permet la réabsorption de 30% du NaCl de l'ultrafiltrat par l'anse ascendante de Henle. Il existe trois variants d'épissage du cotransporteur dont les rôles et les fonctions individuels ne sont toujours pas complètement définis. Chacun d'eux est organisé en homodimère à la surface cellulaire et a aussi le potentiel de s'organiser en hétéroooligomère en s'assemblant avec un autre des variants. Ce présent projet de mémoire a pour objectif d'investiguer les caractéristiques fonctionnelles des hétéroooligomères pour déterminer si ce type d'assemblage pourrait jouer un rôle physiologique dans le transport du NaCl par le rein et l'équilibre du volume extracellulaire.

1. Le rein

1.1. Anatomie et physiologie

Chez les mammifères, les reins permettent la filtration du sang et l'excrétion des déchets par le biais de la production de l'urine (3). Les reins permettent aussi une régulation du volume et du contenu du liquide extracellulaire (3). Trois sections principales sont observées dans une coupe coronale de rein. La plus externe se nomme le cortex rénal. Celle en dessous se nomme la médulla et la section la plus interne se nomme le bassinnet, ou le pelvis rénal, dont le rôle est la récolte de l'urine produite (3, 4). L'unité structurale et fonctionnelle des reins est appelée néphron et se retrouve dans le cortex et la médulla (figure 1). Cette structure est composée du corpuscule rénal, qui est constitué à la fois du glomérule et de la capsule de Bowman (3). Le glomérule correspond à un réseau capillaire acheminant le sang vers le néphron et la capsule de Bowman à un espace où est collectée l'urine en formation (3). Les capillaires sont bordés d'une couche de cellules endothéliales qui repose sur une membrane basale, laquelle est entourée de l'autre côté par une couche de cellules épithéliales. La couche endothéliale, la membrane basale et la couche épithéliale forment ensemble la barrière de filtration glomérulaire qui permet le passage de certaines molécules spécifiques entre la circulation sanguine et l'espace de Bowman (3, 5, 6). De cette manière, les ions, les composantes organiques et l'eau sont filtrés alors que les composantes cellulaires du sang demeurent dans la circulation sanguine (5). Les protéines sanguines sont aussi des composantes freinées par la barrière du corpuscule rénal, mais de manière partielle (5).

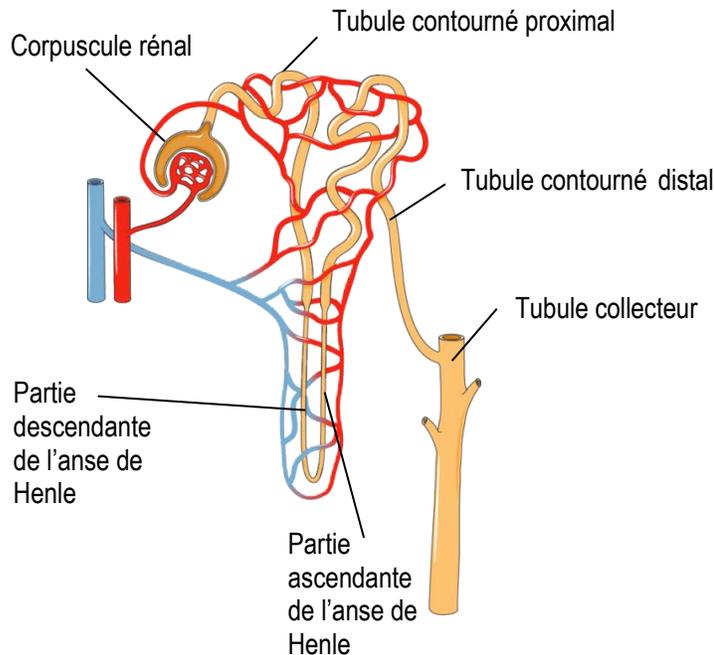


Figure 1. Le néphron. La filtration non sélective du sang se déroule au niveau du glomérule et l'ultrafiltrat ainsi produit parcourt le tubule et subit divers échanges avec la circulation sanguine.

Le produit résultant de la filtration glomérulaire, aussi appelé ultrafiltrat, parcourt le tubule du néphron et subit des échanges avec la circulation sanguine selon les gradients électrochimiques présents. Le tubule du néphron est d'abord composé du tubule contourné proximal, succédant directement la capsule de Bowman (5). Cette composante du néphron assure la réabsorption des ions Na^+ , HCO_3^- , Cl^- , K^+ , Ca^{2+} , PO_4^{3-} , de l'eau, des vitamines, du glucose et des acides aminés vers la circulation sanguine par divers systèmes de transport (7, 8). À la suite du tubule contourné proximal, il y a l'anse de Henle du néphron qui se sépare en deux grandes sections, soit l'anse descendante et l'anse ascendante (AAH) (3, 9). L'anse descendante permet, en outre, une réabsorption de l'eau et l'anse ascendante une réabsorption des sels (9). Il s'y déroule aussi une réabsorption paracellulaire du Ca^{2+} et du Mg^{2+} (9). À la suite de l'anse de Henle, il y a le tubule contourné distal et le tubule collecteur qui jouent des rôles de régulation fine de la réabsorption des sels et de l'eau (3). Le tubule contourné distal participe notamment à la réabsorption des ions Na^+ , Cl^- et Ca^{2+} (10) et le tubule collecteur participe à la réabsorption de l'eau sous l'influence de l'hormone antidiurétique (ADH) (11).

1.2. Régulation du débit de filtration glomérulaire

Le débit de filtration glomérulaire (DFG) correspond au volume de filtrat arrivant dans l'espace de Bowman par unité de temps (6). Le DFG est influencé par a) l'aire totale de filtration, par b) la perméabilité de cette aire et par c) la pression nette de filtration (PNF), qui est elle-même régie par le tonus des artérioles afférentes et efférentes débouchant et ressortant des capillaires glomérulaires (6). De nombreux acteurs extrinsèques sont

impliqués dans la régulation du DFG, incluant le système nerveux périphérique et plusieurs hormones. Par exemple, le système nerveux sympathique, en période de stress, provoque la diminution du DFG par le biais de l'effet vasoconstricteur de la noradrénaline sur les artérioles afférentes via l'activation des récepteurs adrénergiques α (12). Au contraire, le système d'hormones rénine-angiotensine maintient le DFG par la vasoconstriction des artérioles efférentes (13).

Des facteurs intrinsèques permettent aussi la régulation du DFG. Il y a, entre autres, la capacité de l'artériole afférente à changer de tonus devant des variations de la pression artérielle systémique, soit une vasoconstriction associée à une augmentation de la pression artérielle et une vasodilatation associée à une diminution de la pression artérielle. Ces réponses ont pour objectif le maintien d'un débit glomérulaire normal et constant. Finalement, il y a aussi le mécanisme de rétroaction tubuloglomérulaire qui régule aussi le DFG, par les biais de la section de la macula densa (14). Cette dernière consiste en un amoncellement de cellules appartenant à l'anse ascendante de Henle que l'on retrouve à proximité des cellules granulaires des artérioles du glomérule. Les cellules de la macula densa sont sensibles aux mouvements du NaCl dans le filtrat (15). Lorsque le débit de ce filtrat est élevé, les concentrations de NaCl dans la lumière du tubule s'élèvent ce qui entraîne une accumulation de solutés dans la macula densa et la fait se gonfler. Il s'en suit des réactions paracrines en cascade qui se soldent par la production de vasoconstricteurs entraînant une vasoconstriction des artérioles glomérulaires afférentes, et donc une diminution du DFG. Quand le débit du filtrat baisse, la situation inverse prévaut, si bien qu'il y a production de vasodilatateurs qui entraînent une vasodilatation des artérioles glomérulaires afférentes (14).

2. Le transport membranaire

2.1. La membrane cellulaire

La membrane cellulaire est essentielle au fonctionnement des cellules, concédant à ces dernières une barrière physique entre le cytosol et le milieu extérieur. La membrane est formée d'une bicouche lipidique dans laquelle sont insérées de nombreuses protéines, dites membranaires. La bicouche de lipides de la membrane confère à celle-ci un centre hydrophobique et des surfaces hydrophiles, ayant pour effet de limiter le passage de nombreuses molécules (16). Ainsi, les grosses molécules et la plupart des molécules chargées diffusent très lentement au travers la membrane cellulaire, alors que les plus petites molécules non chargées et les gaz diffusent plus facilement (17, 18). La perméabilité de la membrane à différentes molécules est représentée à la figure 2.

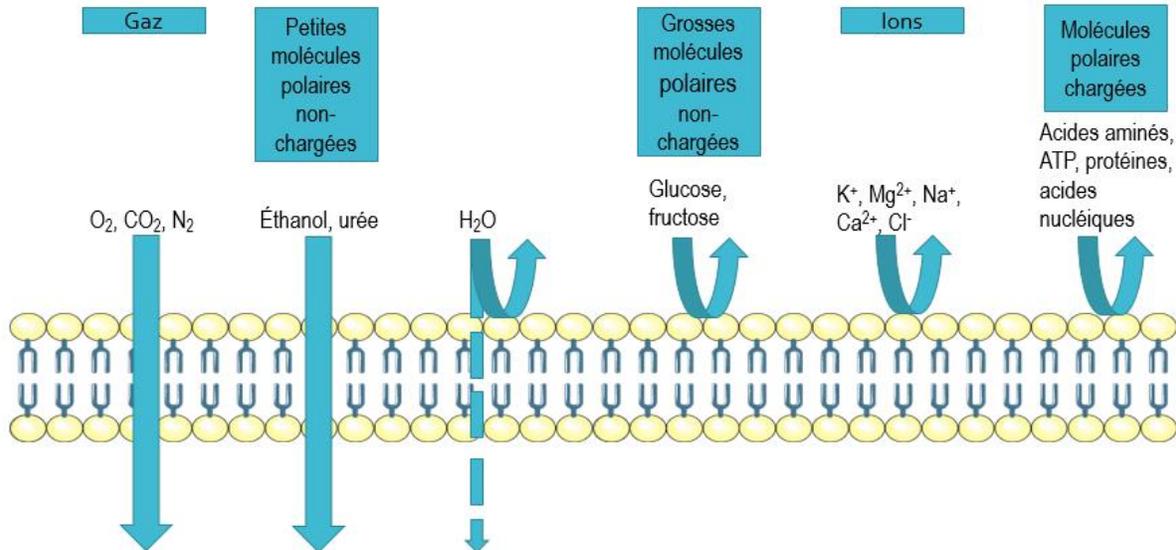


Figure 2. Perméabilité de la membrane. Les petites molécules et les gaz diffusent par eux-mêmes au travers la membrane. Les grosses molécules chargées et les ions ne diffusent pas au travers la membrane. Inspiré de molecular cell biology 6th edition.

2.2. Les protéines membranaires de transport

Les diverses protéines qui sont insérées dans la membrane plasmique possèdent de nombreux rôles et accordent ainsi une multitude de fonctions aux cellules. Par exemple, elles peuvent agir en tant que récepteur et transmettre des signaux de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule. Plusieurs protéines sont aussi spécialisées dans le transport de molécules comme c'est le cas des canaux, des transporteurs et des pompes, illustrés à la figure 3 (19). Les canaux forment des pores aqueux qui laissent passer au travers la membrane les molécules selon leur gradient électrochimique. La taille de l'ouverture des canaux ainsi que les charges retrouvées dans le pore déterminent la nature des molécules qui traversent ces systèmes de transport (19). Les transporteurs, quant à eux, vont plutôt lier la molécule transportée et subir une série de changements de conformation pour acheminer cette dernière vers le côté opposé de la membrane (19). La vitesse de transport au travers les transporteurs est donc plus petite qu'au travers les canaux. Un transporteur peut également acheminer des molécules contre un gradient électrochimique lorsqu'il agit comme symporteur ou antiporteur (figure 3). Finalement, les pompes vont permettre le mouvement des composés contre un gradient électrochimique. Pour se faire, elles vont effectuer un transport actif à l'aide d'une source d'énergie métabolique (19).

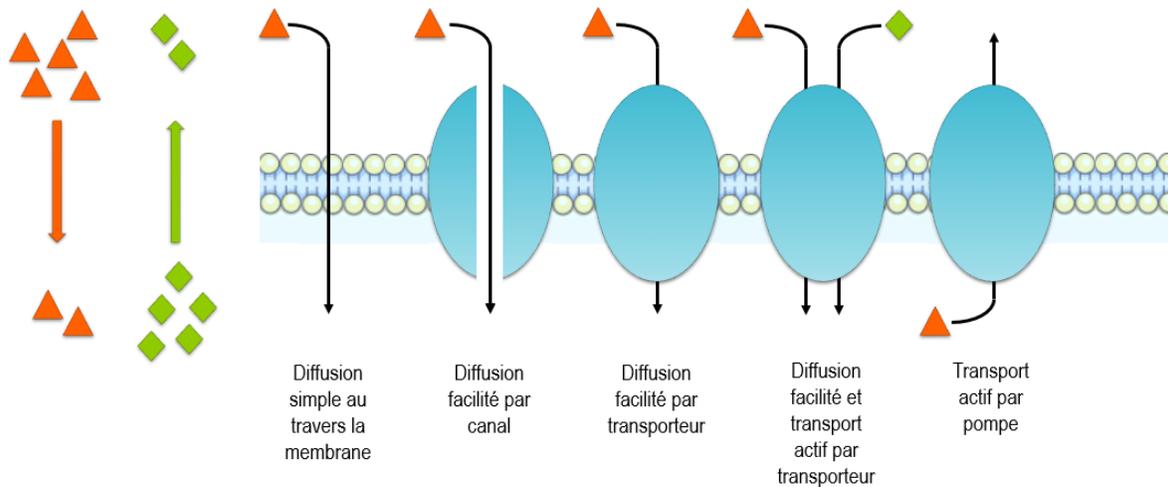


Figure 3. Le transport membranaire. Les différents types de transport selon la protéine impliquée et le sens du mouvement. Lorsqu'une molécule est transportée dans le sens contraire de son gradient électrochimique, il y a dépense d'énergie, il s'agit donc de transport actif.

2.3. La famille des *solute carriers*

La famille des *solute carriers* (SLC) regroupe de nombreuses protéines transmembranaires dont le rôle est le transport de divers composés. Les membres de la famille peuvent ainsi permettre le passage au travers la membrane cellulaire des ions, des acides aminés, des lipides, des purines, des neurotransmetteurs et de plusieurs autres molécules (20-22). La famille SLC est une sous-classe parmi les protéines de transport, au même titre que le sont les canaux ioniques (23, 24), les aquaporines (25), les transporteurs ABC (26) et les pompes (21, 27). Plusieurs modes de transport sont possibles pour les SLC : un transport uniport, un transport couplé de plus d'un composé et un échange entre deux substrats (21, 22). Les SLC comportent plus de 400 membres qui sont regroupés en plus de 60 familles selon l'homologie des séquences et les fonctions attribuées à chacun de ses membres (20, 28). Leur localisation cellulaire est très large et les membres de la famille des SLC sont exprimés dans de nombreux tissus (21). Parmi les sous-familles des SLC, il y a la famille des cotransporteurs cation-chlore (CCC), aussi nommée SLC12. Cette dernière comprend 9 membres, dont la protéine NKCC2, dont il sera question plus en détail à la section 3.1 de l'introduction, puisqu'il s'agit de la protéine à l'étude dans ce présent travail.

3. Les cotransporteurs cation-chlore

La famille des cotransporteurs CCC, soit la famille des *cation-chloride cotransporters*, regroupe des membres dont le rôle commun est le mouvement couplé du chlore (Cl^-) à celui du potassium (K^+) et/ou du sodium (Na^+) au travers la membrane cellulaire (29-32). Les CCC présentent une structure commune (33). Il est ainsi prédit, selon les analyses hydrophatiques, qu'ils sont composés de douze régions transmembranaires bordées de

larges extrémités N-terminale et C-terminale intracellulaires (30, 33). La figure 4 présente un modèle hydrophatique de la structure commune des CCC. Ces protéines partagent un pourcentage d'identité en acides aminés de 25 à 75% (34). Elles peuvent être subdivisées en quatre groupes phylogénétiques, soit a) les transporteurs sodium-dépendants, b) les transporteurs sodium-indépendants, c) CCC8 et d) CCC9 (figure 5). Les transporteurs sodium-dépendants incluent les cotransporteurs NKCC (Na^+ - K^+ - Cl^- cotransporter) et le cotransporteur NCC (Na^+ - Cl^- cotransporter). Les transporteurs sodium-indépendants, quant à eux, incluent les cotransporteurs KCC (K^+ - Cl^- cotransporter). Les cotransporteurs CCC8 et CCC9 ont peu été étudiés à ce jour et ne semblent pas effectuer un transport ionique comme les autres membres de la famille des CCC. Ils seraient plutôt impliqués dans le transport de polyamines et des acides aminés (35).

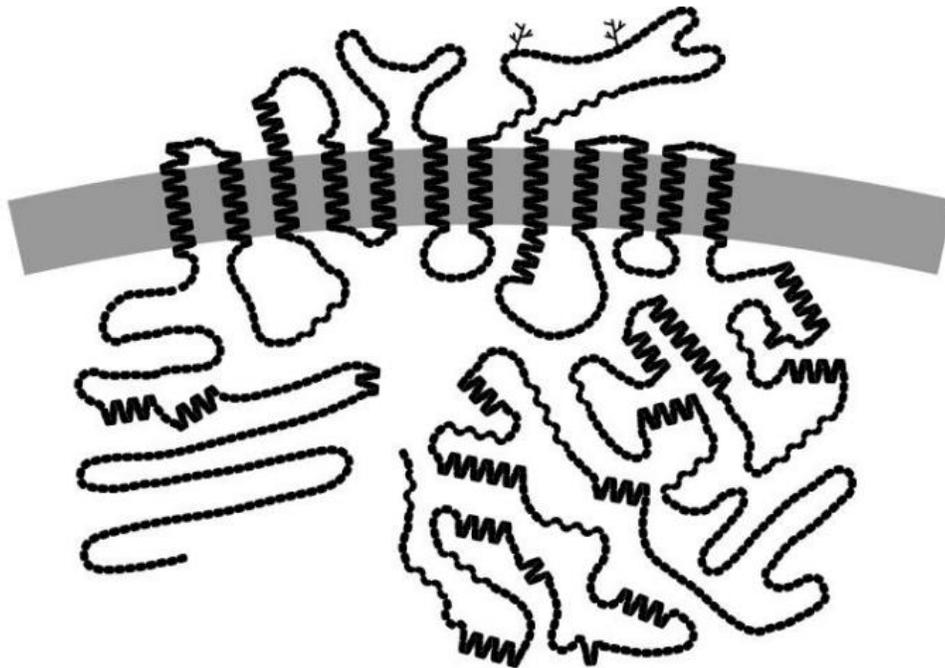


Figure 4. Exemple de la structure hydrophatique des membres de la famille des CCC. Il s'agit du modèle proposé par Biff Forbush (Université de Yale) du cotransporteur NKCC2 (36). L'analyse de la séquence en acide aminé de la protéine a permis de définir deux longues extrémités cytosoliques (N-terminale et C-terminale). La structure des CCC est aussi composée d'un corps hydrophobique formé de douze segments transmembranaires. La membrane est représentée par la bande grise sur la figure. Les sites de glycosylation sont représentés par les arbres présents sur la quatrième boucle extracellulaire, entre les domaines transmembranaires 7 et 8.

Les membres de la famille des cotransporteurs cation-chlore ont aussi été identifiés chez plusieurs espèces autres que l'humain, dont les plantes, les insectes, les cyanobactéries et chez de nombreux mammifères (37-39). L'importance du rôle biologique des cotransporteurs cations-chlore est renforcée par le fait qu'ils sont très conservés entre les espèces et qu'ils sont impliqués dans plusieurs maladies et pathologies humaines.

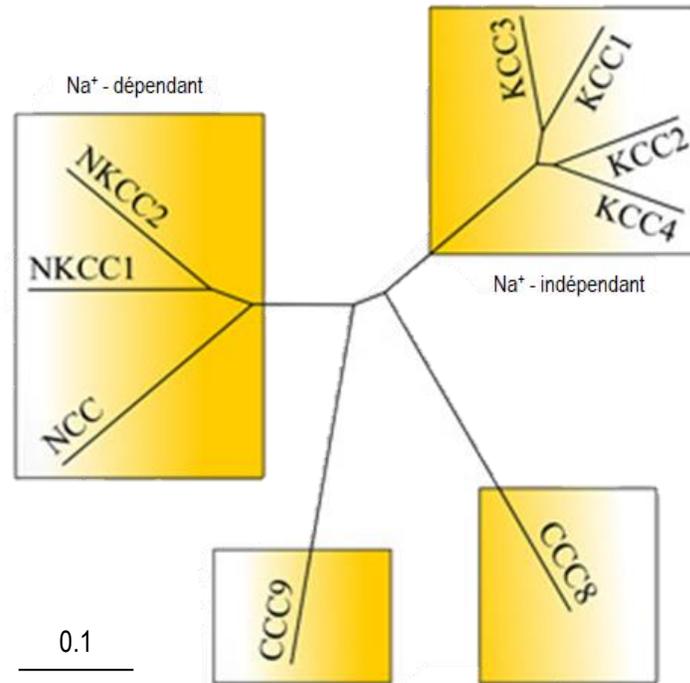


Figure 5. Phylogénie de la famille des CCC. Selon l'homologie des séquences, la famille des CCC est subdivisée en quatre grands groupes. Les membres sodium-dépendants sont NKCC1, NKCC2 et NCC. Les membres sodium-indépendants sont KCC1, KCC2, KCC3 et KCC4. Finalement, CCC8 et CCC9 sont à part. Arbre phylogénétique adapté de Marcoux et al. (40) généré grâce à clustal omega et FigTree V1.4.3.

3.1. Les cotransporteurs NKCC

Les cotransporteurs NKCC permettent le passage du sodium (Na^+), du potassium (K^+) et du chlore (Cl^-) au travers la membrane cellulaire. Deux différentes protéines isoformes ont été identifiées comme étant des cotransporteurs $\text{Na}^+ \text{-K}^+ \text{-Cl}^-$, soit NKCC1 (codé par le gène *SLC12A2*) (41-43) et NKCC2 (codé par le gène *SLC12A1*) (44, 45). NKCC1 et NKCC2 partagent 61% d'identité dans leur séquence nucléique (32). Ce mode de transport a été identifié pour la première fois dans des cellules d'Ehrlich en 1980 par Geck et al (31). Il a ensuite été identifié dans l'anse ascendante du néphron par Greger et al. en 1985 (46). NKCC1 fut le premier à être cloné, en 1994, à partir de la glande rectale du requin (43). Puis, NKCC2 a été cloné à partir du rein chez le rat et la souris entre 1994 et 1995 (45, 47, 48). Il a été décrit que le mouvement des ions $\text{Na}^+ \text{-K}^+ \text{-Cl}^-$ était électroneutre, impliquant donc une absence de mouvement net des charges lors du transport. Le mouvement des ions effectué par les cotransporteurs NKCC s'effectue selon une stœchiométrie de $1\text{Na}^+ : 1\text{K}^+ : 2\text{Cl}^-$ (29, 31, 49). Cependant, il est aujourd'hui connu que cette stœchiométrie peut différer selon les espèces. Par exemple,

l'équipe de Hall *et al.* et J.M. Russel ont identifié une stoechiométrie de $2\text{Na}^+ : 1\text{K}^+ : 3\text{Cl}^-$ dans les globules rouges de furet et l'axone géant de calamar (50, 51).

Les cotransporteurs Na-K-Cl remplissent de nombreuses fonctions physiologiques vitales. Ils permettent ainsi la régulation et le maintien du volume cellulaire et des gradients ioniques (52). Il a aussi été démontré que les cotransporteurs NKCC étaient sensibles aux diurétiques de l'anse, par exemple le furosémide et le bumétanide. Le furosémide inhibe ainsi la fonction des NKCC en se liant aux sites extracellulaires de liaison aux ions (31, 44, 53).

Des différences dans les séquences en acides aminés de NKCC1 et NKCC2 se retrouvent dans l'extrémité N-terminale, où 80 résidus sont tronqués chez NKCC2 (42, 44). Des différences se retrouvent aussi aux positions 350 et 141 de NKCC2, où on observe des insertions de un et de cinq acides aminés, respectivement, et aux positions 456 et 851, où on observe des délétions de un et douze acides aminés, respectivement (44). De façon intéressante, certaines sections dans les séquences de NKCC1 et NKCC2 ont tout de même une identité très élevée entre elles. Les domaines transmembranaires (TM) 1, 3, 6, 8 et 10 ont une identité de ~90% entre les deux séquences. De plus, la boucle reliant les TM2 et 3 et une portion de l'extrémité C-terminale sont très conservées chez les cotransporteurs NKCC (44).

3.1.1. NKCC1

Le cotransporteur NKCC1, comme les autres membres de la famille des CCC, est formé de douze segments transmembranaires et de larges extrémités N- et C-terminales hydrophiles (42). Il est exprimé dans un très grand nombre de tissus, notamment dans les poumons et les glandes salivaires (32, 42, 54), le cerveau, les intestins, le foie et le testicule (43). Il existe plusieurs variants d'épissage de cet isoforme, mais NKCC1A est celui qui a été le plus étudié puisqu'il est plus largement exprimé dans l'organisme (55, 56).

NKCC1 joue plusieurs rôles essentiels dans plusieurs tissus. Dans les cellules épithéliales, il est localisé à la membrane basolatérale (49, 57, 58), lui permettant de participer à la sécrétion de fluides par plusieurs organes comme le tube digestif (59-61), les bronches (62) de même que les glandes salivaires (63), lacrymales (64), pancréatiques (65) et sudoripares (58). En permettant aussi l'accumulation de Cl^- dans les cellules, il influence le potentiel membranaire et la contraction des cellules musculaires lisses par le fait même (58). NKCC1 participe aussi au développement des neurones sensoriels olfactifs (66) et de l'ouïe (67, 68).

NKCC1 est activé par la phosphorylation de certains de ses résidus, deux en particulier (aux positions 206 et 211 dans la séquence de la souris) qui sont présents dans son extrémité N-terminale (69) (70). Les enzymes *STE20/SPS1-related proline/alanine-rich kinase* (SPAK) et *oxidative stress-responsive 1* (OSR1) figurent parmi les acteurs signalétiques qui agissent sur ces résidus (71, 72). Le complexe SPAK/OSR1 est lui-même activé

par phosphorylation grâce aux membres de la famille des *with no lysine kinases* (WNK) qui incluent quatre isoformes (71, 72). La déphosphorylation de NKCC1 produit l'effet contraire, c'est-à-dire qu'elle inhibe son activité (73).

NKCC1 est typiquement activé par le rétrécissement cellulaire et la réduction de la concentration intracellulaire de Cl^- (74, 75). La voie de signalisation WNK/SPAK-OSR1 joue probablement un rôle très important dans cette réponse grâce à la sensibilité des WNK à la tonicité et la concentration intracellulaire de différents ions. En réagissant au rétrécissement des cellules, NKCC1 permet d'en rétablir le volume via l'entrée des ions Na^+ , K^+ et Cl^- qui elle stimule celle de l'eau par osmose. Ce mécanisme de rétablissement du volume s'appelle *Regulatory volume increase* (RVI) (figure 6) (74, 75).

Des mutations dans le gène NKCC1 ont été récemment associées à des maladies chez l'homme, soit une mutation gain de fonction chez un patient souffrant de schizophrénie (76) et une mutation perte de fonction chez un patient souffrant d'intolérance orthostatique et d'un trouble généralisé de la fonction du muscle lisse entraînant notamment de la constipation (77). Les modèles murins dépourvus de NKCC1 sont viables, mais présentent une surdité, des troubles de spermatogenèse et des problèmes d'équilibre (57, 67, 78, 79).

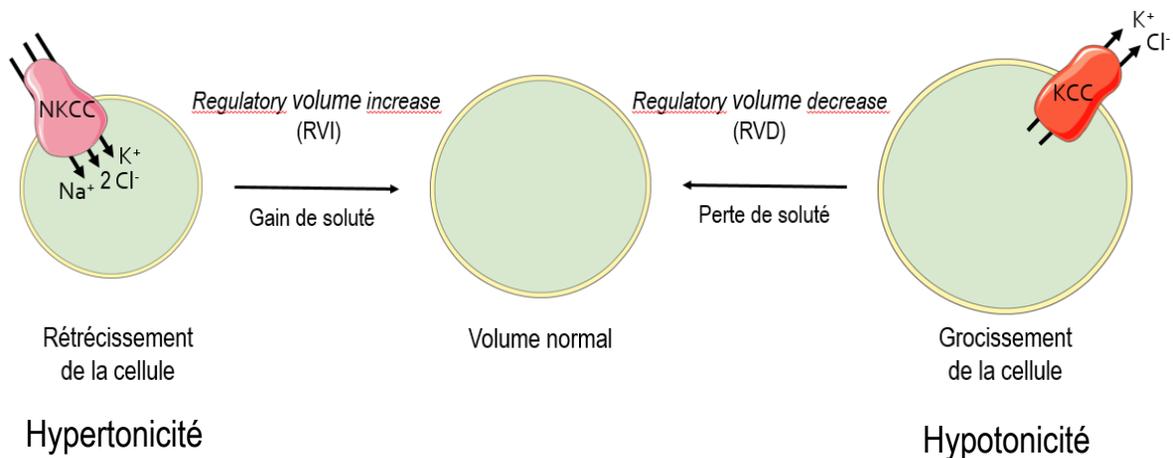


Figure 6. Les changements du volume cellulaire activent certains CCC pour le retour à un volume cellulaire normal. En condition hypertonique, les cotransporteurs NKCC sont activés et engendrent l'entrée des ions Na^+ , K^+ et Cl^- dans la cellule. L'eau suit les ions et pénètre dans la cellule afin de diluer son contenu, permettant le retour à un volume normal de la cellule. C'est ce qu'on appelle la réponse RVI, ou *Regulatory volume increase*. La réponse contraire RVD, ou *Regulatory volume decrease*, est initiée en condition hypotonique. Les cotransporteurs KCC sont activés et engendrent la sortie des ions K^+ et Cl^- de la cellule. La cellule perd certaines quantités d'eau et retrouve un volume normal. Illustration adaptée de T. Kahle et al. (80)

3.1.2. NKCC2

3.1.2.1. Distribution

NKCC2 est fortement exprimé dans les reins, mais l'est aussi en plus faible quantité dans d'autres tissus, comme les cellules β du pancréas de la souris, les épithéliocytes intestinaux et le plexus nerveux des intestins du rat (40, 81-83). Dans le rein, le cotransporteur se situe à la membrane apicale des cellules de l'AAH exclusivement (41, 44, 54, 84), et ce, de la médullaire externe jusqu'au cortex (47). NKCC2 est aussi présent dans les cellules composant la macula densa (15, 85-87). Dans les cellules épithéliales des autres tissus où il a été identifié, il est aussi exprimé dans les membranes apicales, contrairement à NKCC1 (40).

3.1.2.2. Structure

NKCC2 est composé de 1095 à 1099 acides aminés qui sont traduits à partir de 26 exons et qui lui donnent un poids moléculaire d'environ 121 kilodaltons (kDa) (44, 47, 88). Le profil hydrophatique de NKCC2 indique qu'il est similaire à celui de NKCC1, c'est-à-dire qu'il est composé d'une large région centrale hydrophobique divisée en 12 domaines transmembranaires bordée par des extrémités N-terminales et C-terminales hydrophiles (43, 44, 47). Deux sites potentiels de N-glycosylation ont été identifiés entre les segments transmembranaires 7 et 8 (44, 47). La présence de ces sites explique pourquoi la protéine migre à environ 160 kDa sur un gel de polyacrylamide (40, 54, 89). L'extrémité N-terminale du cotransporteur NKCC2 est composée de 174 acides aminés et est de nature hydrophile (47). Cette section de la protéine se distingue par un grand nombre de résidus proline, glutamine, sérine et alanine et par de nombreuses répétitions d'acides aminés (43). À l'instar de NKCC1, cette extrémité N-terminale comprend les sites d'activation par la phosphorylation (90). L'extrémité C-terminale de NKCC2 est composée de 454 acides aminés et est également de nature hydrophile (47). Elle joue un rôle dans la maturation, la dimérisation et le trafic cellulaire du cotransporteur (90).

3.1.2.3. Variants d'épissage

NKCC2 existe en tant que trois variants distincts qui ont été nommés NKCC2B, NKCC2A et NKCC2F. Ils ont été identifiés en 1993 par Payne et Forbush dans des bibliothèques d'ADNc issues du rein du lapin (44). Ces variants distincts du cotransporteur NKCC2 sont produits grâce à un épissage alternatif des exons 4A, 4B et 4F qui comprennent chacun 96 paires de base (pb) et qui codent pour le deuxième domaine transmembranaire (TM2) et une portion de la boucle cytosolique suivante (44). Le TM2 est constitué de 18 acides aminés parmi lesquels dix diffèrent entre les variants et la boucle cytosolique suivante est constituée de 14 acides aminés dont seulement trois diffèrent entre les variants (40). La figure 7 présente l'alignement des acides aminés de la portion divergente entre NKCC2A, NKCC2B et NKCC2F. Un quatrième variant de NKCC2 a aussi été identifié. Ce dernier est constitué de chacune des portions divergentes des exons A et F en tandem et a ainsi été nommé NKCC2AF (44). La fonction de NKCC2AF est encore incertaine, mais il pourrait exercer un effet dominant négatif sur les autres variants de NKCC2 en étant lui-même non fonctionnel (91, 92).

De façon intéressante, tous les variants ne sont pas exprimés aux mêmes endroits le long de l'AAH. Le variant A est exprimé dans l'AAH du cortex, B dans l'AAH du cortex distal et F dans la médulla externe (44, 45, 93). De plus, des études plus précises d'hybridation *in situ* ont révélé la présence des variants NKCC2A et NKCC2B dans la macula densa (45). L'abondance de chacun des variants diffère aussi le long de l'AAH. Plus précisément, le taux d'expression de NKCC2F est environ sept fois plus élevé que celui de NKCC2B et le taux d'expression de NKCC2A est deux fois plus élevé que celui de NKCC2B (94).

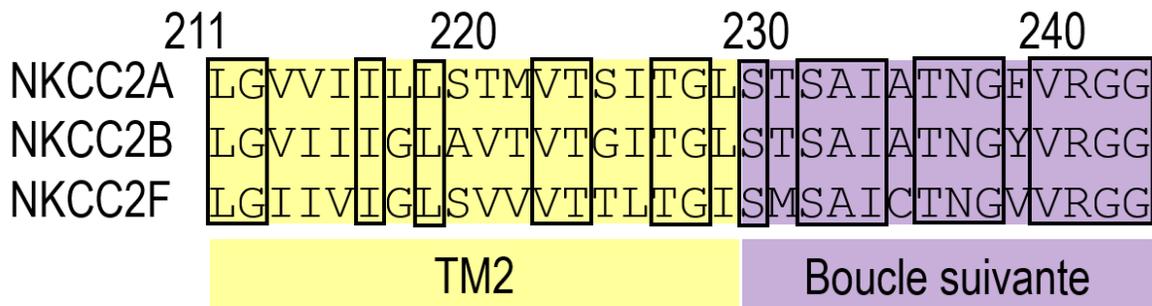


Figure 7. Alignement d'une portion des séquences de NKCC2A, NKCC2B et NKCC2F de lapin. L'alignement correspond à une portion de l'exon 4 qui différencie les variants entre eux. Le TM2 (section beige dans la figure) est constitué de 18 acides aminés dont 10 sont différents entre les variants. La boucle intracellulaire suivant le TM2 (section mauve dans la figure) est constituée de 14 acides aminés dont 3 sont différents entre les variants. Les acides aminés qui sont conservés entre les variants sont encadrés en noir sur la figure.

3.1.2.4. Physiologie

Le transport réalisé par NKCC2 est rendu possible grâce à la participation de plusieurs systèmes de transport ioniques qui créent des gradients ioniques favorables pour l'entrée des ions Na⁺ et Cl⁻ dans les cellules de l'AAH. Par exemple, la pompe Na⁺/K⁺ ATPase, exprimée à la membrane basolatérale de la cellule, engendre la sortie des ions Na⁺ (44, 95), un canal à ions K⁺ (ROMK), situé sur la membrane apicale de la cellule, permet le recyclage des ions K⁺ vers la lumière (30, 96) et le canal à chlore CLCKα/β, situé sur la membrane basolatérale de la cellule, engendre la sortie du Cl⁻ (97).

Les caractéristiques de la cinétique du transport de NKCC2, c'est-à-dire, l'affinité pour les ions (*K_m*) et la vitesse maximale de transport (*V_{max}*), diffèrent parmi les variants. Les études qui ont permis de recenser ces caractéristiques (36, 98-100) ont montré que le variant NKCC2F possède des valeurs de *K_m* pour les ions sodium, chlore et rubidium et des valeurs de *V_{max}* plus élevées que NKCC2A et NKCC2B alors que NKCC2A et NKCC2B partagent des valeurs de *K_m* et de *V_{max}* similaires (40). Le tableau 1 présente les moyennes des *K_m* et des *V_{max}* calculées à partir des résultats obtenus dans plusieurs études (36, 91, 98-103). Les différences

dans la cinétique de transport entre les variants démontrent l'importance de l'exon 4 dans le fonctionnement du transporteur. De fait, il est possible de déduire que les résidus différents entre les variants dans le TM2 et la boucle cytosolique suivante déterminent les caractéristiques de transport par NKCC2. Des analyses par mutagenèses ont d'ailleurs permis de déceler des sites précis pour le transport du sodium, du potassium et du chlore dans le TM2 et un site précis pour le transport du chlore dans la boucle intracellulaire suivante (33, 104). Il est à noter que, comme la plupart des systèmes de transport, les sites de translocation pour les substrats se situent dans les segments transmembranaires (105).

Tableau 1. Moyennes calculées des caractéristiques de la cinétique de transport des variants NKCC2B, NKCC2A et NKCC2F rapportées dans la littérature.

	K_m (mM)			V_{max} (Rb ⁺) (Normalisée)
	Na ⁺	Rb ⁺	Cl ⁻	
NKCC2B	10	2	20	0,5
NKCC2A	10	2	30	0,5
NKCC2F	50	4	70	1,00

3.1.2.5. Rôles

Le cotransporteur NKCC2 permet de réabsorber environ 20 à 30% du Na⁺ filtré par le glomérule (40, 46). Il participe aussi au processus de concentration de l'urine (30), favorise le transport paracellulaire des ions Na⁺, Ca²⁺ et Mg²⁺ (46) et est impliqué dans la rétroaction tubuloglomérulaire (40, 106-108).

Puisque les variants de NKCC2 possèdent des caractéristiques cinétiques de transport qui diffèrent entre eux, des rôles physiologiques propres leur sont attribués. NKCC2F, étant le variant le plus abondant dans l'AAH, ayant une valeur de V_{max} plus élevée que les autres et se retrouvant dans un segment du néphron très riche en Na⁺ du côté luminal, contribue à réabsorber la majorité du Na⁺ qui arrive du tubule proximal (99). NKCC2A, ayant une affinité moins élevée que NKCC2F et étant exprimé tout le long de l'AAH cortical, assure probablement une réabsorption continue du NaCl malgré le travail de NKCC2F et permet d'éviter que la macula densa ne reçoive de trop importantes charges d'ions par son rôle de modulation fine (94, 109). NKCC2B, ayant une affinité aussi élevée que NKCC2A pour les ions et étant localisé dans l'AAH distal et dans les cellules de la macula densa, soutient la rétroaction tubuloglomérulaire (40).

La contribution de NKCC2 à ce processus de rétroaction n'est pourtant pas bien définie. Il a été suggéré que la réabsorption du Na⁺ par NKCC2 provoque un gonflement de la cellule, ce qui induit une cascade de signalisation paracrine se soldant par la formation d'agents vasodilatateurs et une suppression de la rénine (106-108). Le résultat final serait une vasoconstriction des artérioles glomérulaires afférentes par des vasoconstricteurs et une

vasodilatation des artérioles glomérulaires afférentes par des vasodilatateurs pour décélérer ou accélérer le DFG (40).

Finalement, NKCC2 joue aussi un rôle dans l'équilibre acide-base cellulaire et systémique en pouvant lier le NH_4^+ à son site de liaison du K^+ (110, 111). De cette façon, NKCC2 peut modifier le pH intracellulaire et amorcer le processus par lequel le NH_3 gazeux se retrouve dans la lumière du tubule collecteur pour y jouer le rôle de tampon urinaire (112).

3.1.2.6. Régulation

Tout comme NKCC1, NKCC2 est activé par la phosphorylation de résidus clés dans l'extrémité N-terminale, soit T99, T104 et T117 dans la séquence du lapin, et 184, 189 et 202 dans la séquence du requin (69). Ces résidus et positions sont conservés entre NKCC1 et NKCC2 de même que parmi les espèces. (113). Les enzymes SPAK et OSR1 sont aussi celles qui agissent sur ces sites pour les phosphoryler et elles sont elles-mêmes régulées par les WNK, plus précisément WNK1 et WNK3 dans l'AAH (114-119). Il a toutefois été rapporté dans la littérature que la régulation de NKCC2 par la cascade WNK-SPAK/OSR1 diffère d'un variant à l'autre. En outre, WNK3 exerce un effet activateur beaucoup plus prononcé sur NKCC2A et NKCC2B que sur NKCC2F (99). La protéine kinase A (PKA), la *spleen tyrosine kinase* (SYK) et l'*AMP-activated protein kinase* (AMPK) peuvent aussi directement phosphoryler l'extrémité N-terminale de NKCC2 (120-123).

Dans l'AAH, les voies signalétiques dont il a été question et certaines autres sont recrutées par un grand nombre de facteurs ou hormones pour moduler l'activité du cotransporteur. Il en est ainsi de l'AMPc qui permet l'activation de NKCC2 par la vasopressine (44, 122), l'angiotensine II (124), le glucagon (125), les prostaglandines (126), les agonistes des récepteurs β -adrénergiques (127), la PTH et la calcitonine (125). Il existe aussi des hormones qui régulent négativement NKCC2 via l'augmentation du GMPc, dont l'aldostérone (128), les agonistes α -adrénergiques et l'endothéline (129-132).

NKCC2 est lui aussi activé par la réduction du volume cellulaire et la baisse de concentration intracellulaire de Cl^- grâce à la phosphorylation de son extrémité N-terminale (69, 117, 133, 134). Il se produit non seulement un changement de phosphorylation dans ce cadre, mais aussi une augmentation de l'expression du transporteur à la surface membranaire (92, 99, 134-136). Ce faisant, NKCC2 est impliqué, tout comme NKCC1, dans le processus dit de *regulatory volume increase* ou RVI (figure 6) (52, 99).

3.1.2.7. Physiopathologie

Une maladie autosomale récessive est associée à des mutations perte de fonction dans le gène codant pour NKCC2 (88, 137, 138). Cette maladie, aussi nommée le syndrome de Bartter de type I, est caractérisée par une alcalose métabolique, une hypokaliémie, une natriurie excessive et une hypercalciurie (88, 139). L'équipe de

Simon et *al.* a pu identifier le gène en cause en comparant l'ADN génomique d'individus sains avec l'ADN génomique d'individus atteints du syndrome de Bartter à l'intérieur de différentes familles (88). Les mutations retrouvées correspondaient à des insertions ou des délétions dans la séquence, provoquant des décalages dans le cadre de lecture de la protéine NKCC2 (88).

De plus, bien qu'aucune mutation de hausse de fonction chez NKCC2 n'ait été identifiée chez des patients atteints d'hypertension artérielle, le cotransporteur a été lié à des variations de la pression artérielle dans la population (2, 140). Selon l'étude de Herrera et *al.*, les variants d'épissage contribuent à ces variations (141). Par exemple, le ratio entre l'expression de NKCC2A et celle de NKCC2F est plus élevé chez les rats dits sensibles au sel par rapport au ratio mesuré chez les rats insensibles au sel (141). On remarque aussi chez les rats dits sensibles au sel une augmentation de l'expression à la surface du cotransporteur ainsi qu'une hausse de la phosphorylation des résidus phosphoaccepteurs (142-144). Une autre étude montre par ailleurs une augmentation de l'expression de NKCC2 chez des rats hypertendus (145, 146). Chez l'humain, des polymorphismes dans NKCC2 et ses régulateurs ont aussi été relevés dans des cas d'hypertension artérielle (2).

3.2. Le cotransporteur NCC

Tel que mentionné, NCC est un membre de la famille des CCC qui permet le passage électroneutre du sodium (Na^+) et du chlore (Cl^-) au travers la membrane cellulaire. Il ne fera l'objet que d'une brève description puisqu'il n'est pas localisé dans les mêmes types cellulaires que NKCC2.

NCC est le premier membre de la famille des CCC à avoir été identifié après avoir été cloné de la vessie de la plie rouge (30, 147). Il est codé par le gène *SLC12A3* et trois variants produits par épissage alternatif sont connus. Ainsi, les variants 1 et 2, eux-mêmes ne possédant qu'un seul acide aminé de différence entre eux, disposent de 9 acides aminés de plus dans l'exon 20 que le variant 3 (148, 149). Il est exprimé à la membrane apicale du tubule contourné distal du néphron où il réabsorbe 10% du Na^+ filtré (30, 150, 151) et est sensible aux diurétiques thiazidiques (152-154). Il joue aussi un rôle indirect dans la réabsorption du Ca^{2+} et Mg^{2+} filtrés.

Par ailleurs, ce transporteur a été associé à deux maladies héréditaires. Tout d'abord, le syndrome de Gitelman est causé par des mutations perte de fonction dans NCC et se manifeste par une hypocalciurie, une hypomagnésémie, une hypokaliémie, une alcalose métabolique et une résistance à l'hypertension artérielle (155-160). Puis, le pseudohypoaldostéronisme de type II (PHAII), ou syndrome de Gordon, est causé par des mutations gain de fonction dans WNK1 ou WNK4 – lesquels régulent l'activité de NCC à la hausse – et se manifeste par une hypercalciurie, une hyperkaliémie, une acidose métabolique et une hypertension artérielle (154, 161).

3.3. Les cotransporteurs KCC

Tel que leur nom l'indique, les KCC permettent le passage électroneutre des ions potassium (K^+) et chlore (Cl^-) au travers la membrane cellulaire, et ce, en l'absence de sodium (Na^+). Ils feront l'objet d'une description un peu plus étoffée, car ils sont exprimés dans l'AAH tout comme NKCC2 et ils auraient donc la capacité de former des hétérodimères avec celui-ci. Ce point sera davantage discuté à la section 4 de l'introduction.

Le mécanisme de cotransport K^+-Cl^- a été identifié pour la première fois dans les globules rouges de canard par Kregenow *et al.* en 1971 (162), puis dans les globules rouges de mouton et de chèvre par Lauf & Theg en 1980 (163) et dans les globules rouges humains par Dunham *et al.* en 1980 (164). Le mouvement des substrats est couplé dans un ratio stœchiométrique de 1 K^+ : 1 Cl^- et n'induit donc pas de changement de charge de manière intrinsèque (165). Les KCC sont aussi sensibles au furosémide (166-169).

La nature moléculaire des KCC a été formellement identifiée dans les années 1990 par divers groupes de recherche (170-174). Quatre isoformes ont été découverts : KCC1 (*SLC12A4*), KCC2 (*SLC12A5*), KCC3 (*SLC12A6*) et KCC4 (*SLC12A7*) (175). Chacun des isoformes se présente lui-même sous différentes formes par épissage alternatif (variants A à E pour KCC1, A et B pour KCC2, A à E pour KCC3 et A et B pour KCC4). Les cotransporteurs KCC sont exprimés à la membrane basolatérale des cellules épithéliales de nombreux tissus (176). Dans les cellules polarisées du plexus choroïde, KCC4 se retrouve toutefois sur la membrane apicale (177).

Dans le rein, trois des isoformes sont présents. Il s'agit de KCC1, KCC3 et KCC4 (170, 172-174). De manière plus spécifique, KCC1 se retrouve dans le tubule proximal, le tubule distal et le tubule collecteur (178), KCC3 dans le tubule proximal (179, 180) et KCC4 dans le tubule proximal, l'AAH et le tubule collecteur (176, 180-182). Dans cet organe, ils auraient pour principaux rôles de maintenir le volume cellulaire, de favoriser le transport vectoriel du Cl^- et de soutenir les activités de transport générales du néphron (175).

Dans les autres tissus, les KCC participent aussi à la régulation du volume cellulaire en soutenant le *Regulatory volume decrease*, ou RVD, en cas de gonflement cellulaire (figure 6) (170). KCC1 est exprimé dans les ostéoclastes où il joue un rôle dans la sécrétion de protons (183), KCC2 dans le système nerveux (167, 171, 184) où il permet l'hyperpolarisation des neurones en soutenant l'activité GABAergique (185), KCC3 dans le système nerveux (186), le tissu adipeux, le cœur et des vaisseaux sanguins (172-175) où il joue des rôles divers dont le maintien de la pression artérielle pour ne donner qu'un exemple (179, 187, 188) et KCC4 dans l'estomac, la prostate, le cerveau, les intestins, l'oreille interne et le pancréas (177, 189) où il joue aussi de nombreux rôles dont la sécrétion basale de HCl par les cellules pariétales (190) et le recyclage des ions potassium dans l'organe de Corti (181). KCC2 et KCC3 sont aussi impliqués dans le développement du système nerveux (191, 192).

Les cotransporteurs KCC sont eux aussi régulés par la cascade WNK-SPAK/OSR1 (193). Deux sites majeurs phosphoaccepteurs ont été identifiés dans la séquence protéique, soit T926 et T983 chez KCC1, T906 et T1007 chez KCC2, T991 et T1048 chez KCC3 et T926 et T980 chez KCC4 (194). La phosphorylation de ces résidus cause l'inhibition de l'activité de transport (187). Les KCC sont activés par l'augmentation de volume cellulaire et inhibés par de faibles concentrations intracellulaires de Cl⁻ (177), et ils le sont en grande partie via le recrutement de la cascade WNK-SPAK/OSR1. Ainsi, les mêmes enzymes régulatrices exercent des effets opposés sur les KCC par rapport aux NKCC.

À ce jour, les cotransporteurs KCC n'ont pas été associés à une forme mendélienne de maladie rénale (175). Chez la souris, toutefois, l'inactivation de KCC4 cause une acidose tubulaire rénale avec surdité (181). Pour ce qui est des autres KCC, ils ont tout de même été associés à des maladies héréditaires diverses : KCC1, au développement de l'anémie falciforme (195), KCC2, à une forme d'épilepsie compliquée de problèmes neurodéveloppementaux (196), et KCC3, au syndrome d'Andermann aussi appelé *Hereditary Motor Sensory Neuropathy with Agenesis of the Corpus Callosum* (HMSN/ACC). Ce dernier syndrome est transmis de manière autosomique récessive et est très prévalent dans la région du Saguenay-Lac-St-Jean (187, 197, 198).

4. Le processus de dimérisation

4.1. Préambule

Le présent travail de maîtrise avait notamment pour but de déterminer si des hétérodimères formés des variants d'épissage A, B et F de NKCC2 pouvaient jouer des rôles physiologiques dans l'AAH. La section 4 présentée ici sera donc consacrée à la structure quaternaire des CCC.

4.2. Principes de base

La formation d'une protéine fonctionnelle est possible grâce à une série d'étapes finement régulées au sein de la cellule. Une chaîne polypeptidique se replie typiquement à plusieurs endroits pour former diverses conformations 3D, par exemple, des feuillets ou des hélices, selon la nature des résidus en présence. Ces repliements donnent lieu à une structure secondaire (199, 200). La stabilisation d'agencements entre les hélices ou les feuillets de cette structure secondaire mène ensuite à la formation de la structure tertiaire de la protéine. Ultiment, la structure quaternaire d'une protéine est possible lorsqu'une protéine en conformation tertiaire se lie à une ou plusieurs autres protéines, elles aussi en conformation tertiaire. Des sites d'interaction spécifiques sont requis pour permettre un tel assemblage des protéines à l'état d'organisation tertiaire (201, 202).

Chacune des protéines dans un assemblage est appelée sous-unité, monomère ou protomère. Dans la plupart des cas, ce sont les protéines sous la forme quaternaire qui sont soumises à diverses études dans les écrits scientifiques (201, 202). Lorsqu'une protéine est formée de deux, trois ou quatre sous-unités, la structure se

nomme dimère, trimère ou tétramère, respectivement (201, 202). Le terme oligomère est aussi utilisé pour désigner une structure quaternaire qui inclut au moins deux sous-unités. Finalement, les sous-unités composant une protéine de conformation quaternaire peuvent être de même nature et/ou de nature différente (201, 202). Ainsi, il est question d'un homooligomère lorsqu'une protéine est formée de sous-unités identiques et d'un hétérooligomère lorsque les sous-unités sont différentes. Dans le cas d'une protéine comportant deux sous-unités seulement, les termes utilisés sont homodimère et hétérodimère.

La grande majorité des protéines de transport sont formées de plusieurs sous-unités et sont non ou peu fonctionnelles à l'état monomérique. C'est le cas notamment des pompes ATPases H⁺/K⁺ (203), de l'échangeur Na⁺/H⁺ (204) et des aquaporines (205).

4.3. Oligomérisation chez les CCC

Les cotransporteurs cation-chlore forment des dimères à la membrane plasmique. Ils semblent exister typiquement sous forme homodimérique, mais ils ont aussi la capacité de s'assembler sous forme hétérodimérique par l'association de deux isoformes différents. Les mécanismes d'oligomérisation de ces protéines sont encore méconnus. De plus, la nature des interactions qui permet l'oligomérisation ne semble pas être les mêmes pour tous les membres. Par exemple, il a été décrit que KCC2 formait un lien disulfide entre ses sous-unités, ce qui ne semble pas être le cas pour les cotransporteurs NCC et NKCC (206).

4.3.1. Démonstration et processus de la dimérisation chez les CCC

La structure quaternaire des CCC a été élucidée grâce à différents travaux de recherche. Ainsi, grâce à des études de co-immunoprécipitation et de *Western blot*, Moore-Hoone et Turner ont d'abord démontré que les chaînes peptidiques de NKCC1 du rat se liaient ensemble pour former un homodimère à la surface de la membrane. Dans ces études, le groupe de recherche a observé que NKCC1 se liait à une autre protéine ayant un poids moléculaire égal au sien. Cette autre protéine s'est finalement révélée être NKCC1 sur la foi de son profil de glycosylation et son affinité pour un anticorps spécifique (39, 207). De la même façon, il a aussi été confirmé que NKCC2, NCC et les KCC étaient tous exprimés à la membrane en tant qu'homodimères (206, 208-210).

D'autres études ont également exploré la nature des sites d'interaction possibles entre les sous-unités. Puisque l'extrémité C-terminale est très conservée parmi les CCC, il était possible que ce domaine soit impliqué (105). C'est ainsi qu'en 2004, Simard *et al.* ont identifié deux sites d'interaction dans l'extrémité C-terminale de NKCC1 : C1t comprenant les résidus 759 à 923 et C2t comprenant les résidus 994 à 1211 chez l'humain; 769-914 et 1015-1203 chez le rat (211). Il a aussi été observé que l'extrémité N-terminale de la protéine ne semblait pas impliquée dans ce processus (39, 207). Des régions correspondantes impliquées dans la dimérisation ont aussi été identifiées chez NKCC2 (91).

En 2007, l'équipe de Parvin *et al.* confirme elle aussi l'importance de l'extrémité C-terminale de NKCC1 dans la dimérisation du cotransporteur (207). Toutefois, le groupe de recherche infirme le rôle des régions C1t et C2t identifiées par Simard *et al.* (211), leur attribuant plutôt un rôle dans les interactions intramoléculaires (207), et identifie la région située entre les résidus 751 et 998 du rat comme site d'interaction intermoléculaire. Plus précisément, ils identifient la glycine à la position 812 dans la séquence de NKCC1 du rat comme étant un résidu clé à cet égard.

Finalement, des études récentes de structure 3D ont révélé que les CCC étaient organisés à la membrane dans une configuration de type *domain swapping*, définie par un croisement de deux sous-unités autour d'un site d'entrelacement interne avec opposition subséquente des sous-domaines séparés par ce site (212). Les sites d'interaction intramonomériques identifiés correspondaient à ceux prédits par l'équipe de Simard *et al.* en 2004 (211-213).

Pour terminer, la dimérisation de NKCC2 et des autres CCC pourrait se dérouler à la membrane plasmique plutôt qu'en milieu intracellulaire (91). Cette possibilité demeure toutefois à confirmer.

4.3.2. Hétérodimérisation chez les CCC

Grâce à des études de co-immunoprécipitation, l'équipe de Casula *et al.* a démontré que le polypeptide du KCC1 murin sauvage était en mesure de s'associer avec des KCC1 murins mutants et l'équipe de Uvarov *et al.* a démontré que deux variants KCC du même isoforme KCC (KCC2A et KCC2B) pouvaient aussi s'associer entre eux *in vitro* et *in vivo* (214, 215). L'équipe de Simard *et al.* a démontré, de son côté, que des hétérodimères pouvaient aussi être formés entre KCC2 et KCC4, entre KCC4 et NKCC1 et entre KCC1 et KCC3 (216). Finalement, l'équipe de Casula *et al.* a démontré que tous les isoformes des KCC pouvaient se lier entre eux pour former des hétérodimères fonctionnels (215).

Grâce à d'autres expériences de co-immunoprécipitation, Parvin *et al.* ont montré que NKCC1 et NKCC2 ne formaient pas d'hétérodimères ensemble, mais que NKCC1 et NCC en avaient la capacité (207). Toutefois, NKCC1 et NCC n'étant pas exprimés dans les mêmes cellules, il est important de mentionner que la pertinence biologique de dimères NKCC2-NCC est faible (207). Contrairement à ce qu'ont présenté Parvin *et al.*, l'équipe de Brunet *et al.* a observé que des interactions entre NKCC1 et NKCC2 humain étaient possibles (91).

4.3.3. Rôle de la dimérisation chez les CCC

Il existe toutefois peu d'indices à l'heure actuelle sur les raisons qui sous-tendent l'oligodimérisation des CCC. Grâce à des études de transfert d'énergie par résonance de type Förster, Pedersen *et al.* ont montré à cet effet que les NKCC siègent à la membrane plasmique de cellules HEK-293 quasi exclusivement en tant qu'oligomère, mais que cette organisation structurale n'est pas nécessaire à la phosphorylation (217). Ce groupe de recherche

est aussi arrivé à la conclusion que les sous-unités du dimère NKCC2-NKCC2 opèrent indépendamment l'une de l'autre et le groupe de recherche de Moore-Hoone et Turner a supposé (39) qu'il en était de même pour les sous-unités du dimère NKCC1-NKCC1 (39). D'autres groupes ont trouvé au contraire que l'oligomérisation est nécessaire au fonctionnement des CCC. Par exemple, Parvin *et al.* concluent qu'il existe bel et bien une interaction fonctionnelle entre les sous-unités du dimère de NKCC1 (207), Blaesse *et al.* montrent qu'une sous-unité non-dimérisée des cotransporteurs KCC présente à la membrane de la cellule est inactive et qu'elle n'effectue aucun transport d'ions (206). Le même groupe montre que la dimérisation de KCC2 est dépendant du développement neuronal (206). Dans le dernier cas de figure, l'absence d'activité de KCC2 dans des neurones immatures serait associée à la présence d'un cotransporteur à l'état monomérique à la surface plutôt que sous sa forme dimérique.

Pour ce qui est des hétérodimères formés de différents CCC, leurs rôles seraient le plus probablement de diversifier la nature du cotransport cation-Cl en fonction des besoins à combler. À ce jour, toutefois, il existe peu de données quant à la pertinence de ces structures *in vivo*.

4.3.4. Structure 3D

Les premières images 3D à haute résolution de certains membres des CCC ont été rapportées récemment grâce à l'utilisation de la cryomicroscopie électronique. Les observations faites ont permis de confirmer plusieurs hypothèses déjà proposées dans le passé concernant la structure 3D de ces cotransporteurs en plus d'apporter un niveau de précision grandement supérieur.

De cette manière, en 2019, Chew *et al.* (218) ont reporté pour la première fois les images de cryomicroscopie du cotransporteur NKCC1 du poisson-zèbre (*Danio rerio*) à une résolution de 2.9 Å. Les images ainsi obtenues ont confirmé que NKCC1 était organisé en homodimère selon une configuration *domain swapping*, et ce, comme Parvin *et al.* l'avaient supposé en 2011 (213). Le modèle montre de fait que l'extrémité C-terminale de l'une des sous-unités se retrouve près du domaine transmembranaire de la sous-unité opposée. Les images générées ont aussi permis d'identifier des sites d'interactions entre les deux sous-unités incluant 1) les domaines transmembranaires 10, 11 et 12 avec la présence de lipides à l'interface agissant en tant que colle moléculaire, 2) l'hélice $\alpha 3$ et le feuillet $\beta 3$ dans l'extrémité C-terminale et 3) des hélices entrecroisées qui relient les domaines transmembranaires et les extrémités C-terminale de chacune des sous-unités (aussi dites *scissor hélices*) (218). Les résultats obtenus semblent indiquer par ailleurs que l'extrémité N-terminale ne joue pas de rôle dans la structure tridimensionnelle de la protéine et que les poches de translocation des ions sont formées par les TM1, 3, 6 et 8 dans chacune des sous-unités (218). Finalement, des études de cryomicroscopie électronique ayant comme protéine d'intérêt KCC1, KCC2, KCC3, KCC4 et NKCC1 humain ont montré des structures 3D similaires à celle du cotransporteur NKCC1 du poisson-zèbre (219-224).

5. Hypothèses et objectifs

Sachant que a) le cotransporteur NKCC2 forme un oligomère à la membrane plasmique, que b) les variants NKCC2A et NKCC2B sont exprimés dans les mêmes cellules de l'AAH à plusieurs endroits (dans la région corticale et la macula densa notamment), et que c) ils devraient avoir la possibilité de s'assembler entre eux puisqu'ils sont presque identiques sur le plan de la séquence en acides aminés, il est pertinent de s'intéresser à la possibilité pour le cotransporteur de former un hétérodimère composé de NKCC2A et NKCC2B (qui sera dit hétérodimère AB) et qu'il soit utile sur le plan fonctionnel. Nous supposons que cet hétérodimère AB aurait des caractéristiques uniques (différentes de celles des homodimères AA et BB) si les sous-unités coopèrent entre elles plutôt que de transporter les ions indépendamment. Nous supposons aussi qu'un mélange de dimères AA, BB et AB (avec expression modulable de chacune de ces structures) permettrait à la macula densa de déployer des caractéristiques cinétiques du transport en NaCl plus étendue et de jouer un rôle de senseur plus fin dans la rétroaction tubuloglomérulaire.

Le premier objectif de ce projet de recherche est de construire trois plasmides qui contiennent chacun les séquences d'ADNc des deux NKCC2 en tandem (AA, BB ou AB) reliées par un *linker* clivable et d'exprimer ces ADNc dans un système d'expression hétérologue. L'idée derrière ces constructions est de forcer la formation des dimères à étudier par proximité, craignant que la coexpression d'un NKCC2A avec un NKCC2B non reliés entre eux se solde par un mélange de dimères AA, BB et AB. Le deuxième objectif vise à décrire les caractéristiques de la cinétique du transport ionique des dimères AA, BB et AB.

Chapitre 1. Matériels et méthodes

1. Vecteur Pol1

Le vecteur Pol1 a été utilisé pour toutes les constructions produites au laboratoire au cours de ce projet. Ce vecteur permet de produire de l'ARNc qui est ensuite injecté dans les ovocytes de *Xenopus laevis* pour produire des protéines d'intérêt. Le vecteur Pol1, qui est dérivé du vecteur pGEM, contient les séquences suivantes de 5' vers 3' : le promoteur T7, provenant du bactériophage du même nom, pour la transcription en ARN, la séquence non traduite 5' de la β -globine de *Xenopus laevis* (5'UTR), un site de clonage multiple, dans lequel sont insérés les séquences des gènes à l'étude, la séquence non traduite 3' de la β -globine de *Xenopus laevis* (3'UTR), une queue polyA et un site de linéarisation. Le vecteur Pol1 sur lequel les manipulations ont été effectuées possède un épitope Myc (EQKLISEEDL) en 5' du site de clonage multiple.

2. Clonage des variants de NKCC2

Les constructions de NKCC2A et NKCC2B étaient déjà disponibles au laboratoire dans le vecteur Pol1. Les constructions ont été produites par Valérie Montminy en 2001 au sein du laboratoire du Dr. Paul Isenring au centre de recherche L'Hôtel-Dieu de Québec. Ils ont été clonés par PCR à partir d'une banque d'ARN du rein de lapin avant d'être introduits dans le vecteur Pol1. À des fins de comparaisons, les constructions simples de NKCC2A et NKCC2B dans le vecteur Pol1 ont aussi été utilisées pour les expériences de ce projet. La construction NKCC2A possède l'épitope myc en N-terminal de la protéine et la construction NKCC2B possède l'épitope flag (DYKDDDDK) en C-terminal de la protéine. À des fins de simplifications, les constructions de myc-NKCC2A et de NKCC2B-flag seront appelées *constructions simples* pour le reste de ce travail.

3. Design des constructions d'ADNc

L'objectif de cette étude étant la description fonctionnelle d'un hétérodimère entre les variants A et B du cotransporteur NKCC2, il a d'abord fallu générer les plasmides voulus mettant en relation les variants A et B. La figure 8 présente les différentes combinaisons de variants à insérer dans le vecteur Pol1 dans le cadre de ce projet. Chacune des combinaisons représente des *constructions doubles* qui seront utilisées tout au long de ce projet et appelées comme telles pour le reste de ce travail à des fins de simplifications.

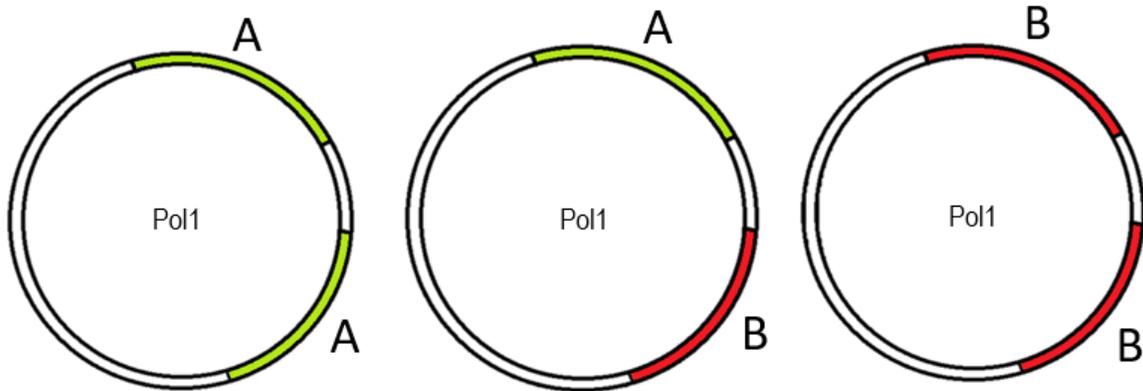


Figure 8. Constructions d'ADNc mettant en relation les variants A et B du cotransporteur NKCC2 selon toutes les combinaisons possibles dans le vecteur Pol1. De gauche à droite, est d'abord représenté le vecteur mettant en relation le variant A afin d'induire la formation d'un homodimère AA. Ensuite est représenté le vecteur mettant en relation le variant A et le variant B afin d'induire la formation d'un hétérodimère AB. Finalement est représenté le vecteur mettant en relation le variant B afin d'induire la formation d'un homodimère BB.

3.1. Préparation du vecteur

Le vecteur Pol1 a dû être modifié de sorte qu'il puisse accueillir deux séquences une à la suite de l'autre séparées d'un *linker* dont le cadre de lecture est en continuité avec chacune d'elles. D'abord, des sites de restrictions uniques ont été introduits par mutagenèse ciblée (à l'aide du Q5® *Site-Directed Mutagenesis Kit* de *New England Biolabs*) dans la séquence du vecteur pour créer les futurs sites d'insertions des variants. Le premier site d'insertion est bordé des sites de restriction uniques Sall et XhoI et le deuxième des sites de restriction uniques PmlI et AvrII (figure 9). Le tableau 2 liste les oligonucléotides utilisés pour générer les mutations.

3.2. Insertion de la séquence *linker*

Pour forcer l'interaction entre deux variants dans l'ovocyte, le *linker* utilisé s'est voulu flexible et a donc compris une séquence codant pour six répétitions des résidus GGGGS (225, 226). Il a été inséré entre les sites XhoI et PmlI tel qu'illustré par l'arc jaune de la figure 9. À l'extrémité 3' du *linker*, un épitope flag a aussi été ajouté afin qu'il soit associé au second site d'insertion. L'épitope Myc, déjà présent dans le vecteur est associé au premier site d'insertion en 5'. Finalement, deux sites protéolytiques ont été greffés au *linker* à chacune de ses extrémités (LRGG – reconnu par la protéase *ubiquitin specific peptidase 5* (USP5)) pour son clivage éventuel. L'insertion de la séquence *linker* entre les deux sites d'insertion s'est effectuée par plusieurs réactions séquentielles de mutagenèse d'insertion ciblée. Le tableau 3 résume la liste des oligonucléotides utilisés pour chacune des réactions d'élongation du *linker*. Le résultat final est représenté à la figure 10.

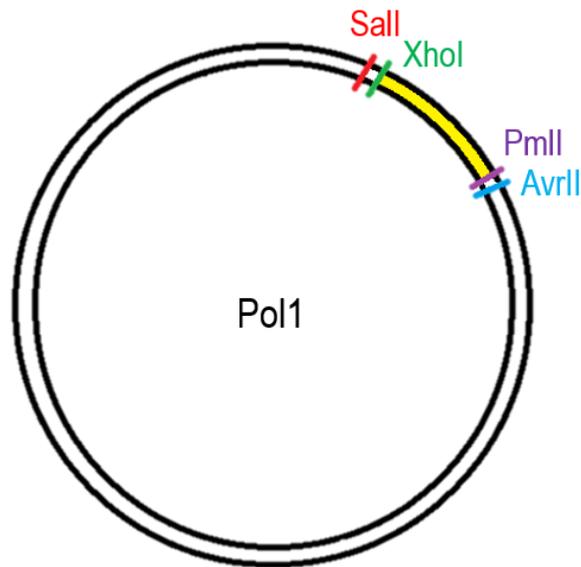


Figure 9. Préparation du vecteur par l'ajout de sites de restriction uniques pour créer les sites d'insertion des variants du cotransporteur NKCC2. Le premier site d'insertion, qui accueillera la séquence du premier variant mis en relation dans le dimère, est bordé des sites de restrictions uniques Sall et XhoI. Le deuxième site d'insertion, qui accueillera la séquence du second variant mis en relation dans le dimère, est bordé des sites de restrictions uniques PmlI et AvrII. La section jaune du vecteur correspond au linker mettant en relation les deux variants.

Tableau 2. Description des réactions de mutagenèses pour l'insertion de sites de restriction uniques dans le vecteur Pol1

Nom	Site	Séquence des oligonucléotides	Température d'hybridation
Sall	GTCGAC	Sens : CTCGAGATGTCACATAAATAACTCTTCC Antisens : GTCGACGAGGTCTTCCTCAGATATC	58 °C
XhoI	CTCGAG	Sens : CTGACATTTTACTCTCTCGAGATGAAAGATTAGAAAAC Antisens : GACATTTTGTGATTTCTCTAACTAGTAAGACAG	58 °C
PmlI	CAGGTG	Sens : GAGCACGTGAAAGATTAGAAAAC Antisens : GAGAGAGTAAAATGTCAGGACATTTTGTG	52 °C
AvrII	CCTAGG	Sens : CACGTGCCTAGGTAGAAAACATATTAATG Antisens : CTCGAGAGAGAGTAAAAGTCAGG	52 °C

Tableau 3. Description des réactions de mutagenèses d'insertion pour l'élongation du *linker* dans le vecteur Pol1

Étape	Composantes	Séquence des oligonucléotides	Température d'hybridation
Élongation 1	Premier site protéolytique (LRGG)	Sens : GCGGTGGTGGTCACGTGCCTAGGTAGAAAAC Antisens : GGAGCTCGAGGTGACGAGCTC	65 °C
Élongation 2	Séquence flexible GGGGS	Sens : TGGTGGTCACGTGCCTAGGTAGAAAACATATTAATGTATG G Antisens : CCACCGGATCCACCACCACCGCGGAGCTC	65 °C
Élongation 3	Séquence flexible GGGGS	Sens : GGGTTCTGGTCACGTGCCTAGGTAGAAAACATATTAATG Antisens : CCGCCACCACTACCACCACCACCGGATCC	67 °C
Élongation 4	Deuxième site protéolytique (LRGG)	Sens : CTTCGTGGTGGTCACGTGCCTAGGTAGAAAACATATTAAT GTATGG Antisens : AGAACCCACCACCACGAAACCCCGCCACC	70 °C
Élongation 5	Épitope Flag	Sens : GATGACGATAAGCACGTGCCTAGGTAGAAAAC Antisens : ATCCTATAATCATCCTTATAATCACCACCACGAAGAGAA CC	65 °C

3.3. Préparation et ajout des gènes d'intérêt dans les sites d'insertion du vecteur

Les manipulations nécessaires à l'insertion des séquences de NKCC2 ont été réalisées avec le vecteur contenant les sites de restrictions uniques et le *linker* (voir sections 3.2 et 3.1). En ce qui concerne le premier site d'insertion, les variants A et B ont tous les deux été insérés dans le vecteur par la technologie *In fusion Cloning* de *Takara*, c'est-à-dire, par recombinaison homologue entre les extrémités des inserts (les variants A et B) et du vecteur (Pol1+*linker*). Les extrémités homologues au vecteur avaient été ajoutées préalablement sur les inserts par des réactions de PCR (voir tableau 4). La séquence codante de NKCC2A a ainsi été insérée dans le premier site d'insertion pour former une première construction et la séquence codante de NKCC2B a été insérée de cette même façon dans le premier site d'insertion pour former une seconde construction.

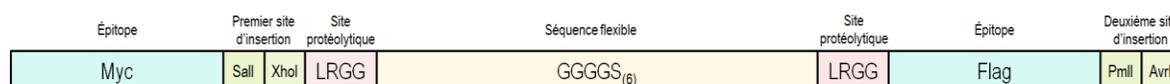


Figure 10. Représentation de la séquence du *linker* reliant les deux sites d'insertion dans le vecteur Pol1. De 5' vers 3', la séquence est composée de l'épitope Myc suivi du premier site d'insertion formé par les sites de restriction Sall et XhoI, du premier site protéolytique LRGG, de la séquence flexible constituée de six répétitions des résidus GGGGS, du second site protéolytique LRGG, de l'épitope Flag et finalement du deuxième site d'insertion formé par les sites de restriction PmlI et AvrII.

Tableau 4. Description des réactions de PCR pour l'insertion des gènes de NKCC2A et NKCC2B dans le premier site d'insertion du vecteur Pol1 par la technologie *In Fusion*

Nom	Gabarit	Séquence des oligonucléotides	Température d'hybridation
NKCC2 in fusion	NKCC2A et NKCC2B	Sens : CTGAGGAAGACCTCGTCGACATGTCACTAAATAACTCTTCCAGTG	52
		Antisens : CACCGCGGAGCTCGAGAGAGTAAATGTCAGGACATTTTTG	

Pour le deuxième site d'insertion, nous avons fait appel à la compagnie *Twist Bioscience* située à San Francisco. Grâce à une *high-throughput silicon platform*, les membres de l'équipe y ont cloné les séquences des gènes de NKCC2A et NKCC2B de sorte que trois vecteurs différents ont été produits, soit les combinaisons AA, BB et AB (figure 8). Nous avons eu recours à l'aide de *Twist Bioscience* puisque ces dernières étapes d'insertion avaient échoué à plusieurs reprises au laboratoire malgré de nombreuses tentatives.

3.4. Vérification et validation de la séquence des constructions obtenues

Toutes les séquences des constructions obtenues (AA, BB et AB) ont été vérifiées par *Twist Bioscience* et par séquençage de type Sanger grâce à la plateforme du CHU de Québec. Les oligonucléotides utilisés pour séquencer chacune des constructions au complet sont listés dans le tableau 5.

Tableau 5. Séquence des oligonucléotides utilisés à des fins de la validation des constructions obtenues

Nom	Séquence	Position dans la séquence (pb)
Seq1	TGAGATTCACGAGCAACTGG	680
Seq2	CCACTGGGATACTTGCTGGT	1459
Seq3	ACCAGACCTGCTCTTTGGA	2364
Seq4	CAGATGCAGAACTGGAAGCA	3352
Seq5	GTCGAACTTGCCGGTAACTC	3383
Seq6	TCCCTGGAGACTGTCCTACC	3681
Seq7	TGTGAAATGGAAATGCTTGC	4547
Seq8	GGCACAATTGATGTTTGGTG	3012

4. Expression dans les ovocytes de *Xenopus laevis*

L'insert de chacune des constructions est rétrotranscrit par la polymérase T7 du kit *mMessage-mMachine transcription* de *Invitrogen* après linéarisation du plasmide à l'extrémité distale de la région 3' non traduite du gène de la β -globine. Ces ARNc sont ensuite directement injectés dans des ovocytes de *Xenopus laevis*

défolliculés de stade V-VI grâce à un système de pression à micro-injection. Chaque ovocyte reçoit 17,5 ng du matériel.

Pour les expériences, nous avons étudié les constructions simples exprimées ensemble (myc-NKCC2A + myc-NKCC2A, NKCC2B-flag + NKCC2B-flag ou myc-NKCC2A + NKCC2B-flag) et les constructions doubles séparément (AA, AB ou BB) (figure 8). Pour chacune des expériences, des ovocytes sont aussi injectés avec de l'eau dans l'objectif d'obtenir des valeurs contrôles.

Les ovocytes injectés sont par la suite incubés dans une solution Barth avec 0,25 mM de furosémide à 18 °C pour trois jours afin de permettre l'expression des protéines. Le tableau 6 résume les composantes du milieu Barth. La présence du furosémide est importante pour l'inhibition du cotransporteur NKCC2 puisque les ovocytes possèdent peu de tolérance pour l'activité hétérologue du cotransporteur pendant cette période de 72 heures. L'expression des protéines traduites dans les ovocytes est validée ultimement par des expériences de type *Western blot* et d'immunofluorescence.

Tableau 6. Composantes du milieu Barth

Composante	Concentration finale (mM)
Na ⁺	97,00
Cl ⁻	86,00
K ⁺	1,00
Ca ²⁺	0,74
Mg ²⁺	0,82
SO ₄ ²⁻	0,82
Hepes	10,00
NO ₃ ⁻	0,66
HCO ₃ ⁻	2,40
Osmolarité finale de la solution	200

4.1. Techniques de *Western blot* et de co-immunoprécipitations

Les ovocytes sont d'abord soumis à une préincubation d'une heure dans un milieu activant le transport de NKCC2, soit un milieu hypertonique (285 mOsm) (47), pour ensuite être lysés dans une solution dite de Miki (dont les composantes sont indiquées dans le tableau 7). Le matériel obtenu est ensuite centrifugé et c'est le surnageant (lysat) qui est conservé pour les expériences.

Une immunoprécipitation (IP) est effectuée à partir du lysat par l'utilisation d'anticorps spécifiques aux épitopes insérés dans les protéines d'intérêt, c'est-à-dire, un anti-myc (1/100, fournisseur : *Sigma*) ou un anti-flag (1/100,

fournisseur : *Sigma*), et l'utilisation de billes magnétiques couplées à la protéine G (*Thermo Fisher Scientific*). Le reste du lysat est utilisé pour mesurer le taux d'expression totale des protéines. Les échantillons ainsi préparés sont par la suite dilués dans un tampon Laemmli (20% glycérol, 10% 2-mercaptoéthanol, 4% SDS, 0,004% bleu de bromophénol et 0,125 M Tris HCl) et analysés par immunobuvardage de type *Western blot* (en utilisant un gel d'acrylamide 7.5% et une membrane de PVDF pour le transfert). La détection des protéines est faite avec les anticorps primaires anti-myc (1/500, fournisseur : *Sigma*) et anti-flag (1/500, fournisseur : *Sigma*) et les anticorps secondaires anti-IgG de souris produit dans le mouton et couplé à la HRP (1/5000).

Tableau 7. Composantes du milieu Miki

Composante	Concentration finale
Tris pH 8.0	20,0 mM
MgCl ₂	1,0 mM
EDTA	0,1 mM
Phénylméthylsulfonyl fluoride (PMSF)	1,0 mM
Glycérol	10%
Triton-X	1%
Complete Mini (Cocktail d'inhibiteurs de protéases)	1 comprimé/10 mL de Miki

Des expériences de co-immunoprécipitation peuvent aussi être faites pour déterminer s'il y a interaction entre des NKCC2 exprimés dans les mêmes ovocytes, comme ce fut le cas pour les ovocytes qui ont été injectés avec les constructions simples myc-NKCC2A et NKCC2B-flag. Dans cet exemple, un anticorps anti-myc (1/100, fournisseur : *Sigma*) sera utilisé pour immunoprécipiter myc-NKCC2A et un anticorps anti-flag (1/100, fournisseur : *Sigma*) pour détecter NKCC2B-flag par *Western blot*. Le contraire, soit une immunoprécipitation de NKCC2B-flag par un anticorps anti-flag et une détection de myc-NKCC2A par un anticorps anti-myc, est aussi possible. Le traitement des échantillons à la suite de l'immunoprécipitation est identique à celui décrit plus haut.

4.2. Immunofluorescence

Après l'injection de l'ARNc et une incubation dans un milieu isotonique (200 mOsm) et un milieu hypertonique (285 mOsm), les ovocytes sont cryogénisés à l'azote liquide dans un milieu OCT (fournisseur : *Fisher*), coupés en fines tranches de 10 µm et trempées 30 minutes dans le paraformaldéhyde 4% pour fixer les protéines. NKCC2 est ensuite détecté avec les anticorps primaires anti-myc (1/100, fournisseur : *Sigma*) ou anti-flag (1/100, fournisseur : *Sigma*) et un anticorps secondaire, soit un IgG de souris couplé à l'Alexa Fluor 488 (1/500,

fournisseur : *Invitrogen*) pour être visualisé sur lame à l'aide d'un microscope confocal (Olympus FV-1000). Des contrôles négatifs sont produits en soumettant des ovocytes injectés avec de l'eau au même traitement et/ou en omettant l'anticorps primaire.

5. Études de transport

Les ovocytes sont soumis à des incubations séquentielles à 22 °C. Les ovocytes sont incubés : 1) 20 minutes dans une solution de Barth sans furosémide pour retirer l'inhibiteur, 2) 60 minutes dans un milieu isotonique contrôle (200 mOsm) ou un milieu hypertonique activateur (285 mOsm), 3) 45 minutes dans un milieu isotonique contenant 90 mM Cl⁻, 10 mM de ouabaine et entre 0,1 et 20 mM de rubidium (⁸⁵Rb⁺) pour permettre le transport de cet ion et 4) environ 1 minute (sous de lavages répétés) dans un milieu glacé contenant 10 mM de ouabaine, 0,25 mM de furosémide, 0,05 mM de bumétanide et 74 mM de K⁺ pour éviter que le rubidium ne s'échappe des ovocytes. Le tableau 8 résume les composantes des milieux de préincubation isotonique (200 mOsm) et hypertonique (285 mOsm).

Le rubidium est utilisé dans le milieu d'incubation servant à mesurer le transport puisqu'il partage avec le potassium le même rayon moléculaire et de ce fait, peut emprunter le site de translocation de ce dernier substrat chez NKCC2 (189). L'utilisation du rubidium est largement répandue pour caractériser le transport des CCC (189) et facilite aussi les expériences puisqu'il est présent en bien moins grande quantité dans les environnements extracellulaire et intracellulaire que le potassium. Les solutions contenant du rubidium possèdent par ailleurs une concentration de Cl⁻ faible et constante (5mM) pour éviter l'influence des changements de concentration de cet anion sur le transport. Le tableau 9 résume les composantes du milieu d'incubation avec le rubidium. Par défaut, l'étape d'influx se déroule dans une solution contenant 7 mM de ⁸⁵Rb⁺. Cependant, des concentrations qui varient entre 0,1 et 20 mM de ⁸⁵Rb⁺ sont aussi utilisées pour étudier la cinétique de transport de NKCC2. Cette incubation se fait en présence ou en l'absence de 0,25 mM de furosémide dans le but d'obtenir une activité de transport furosémide-sensible.

Après les quatre incubations, chaque ovocyte est distribué dans un microtube et solubilisé dans 25 µL d'acide nitrique 70%. Les échantillons sont par la suite mis à 80 °C pour 100 minutes et les lyophilisats ainsi obtenus sont resuspendus dans 1 mL d'eau. Le contenu en rubidium de chaque échantillon est déterminé grâce à un spectrophotomètre d'absorption atomique. Cet appareil permet une mesure très précise (dans l'ordre du picomolaire) et spécifique pour une grande variété de cations, incluant la majorité des cations monovalents ou divalents connus.

Tableau 8. Composantes des milieux de préincubation pour induire les changements de volume chez les ovocytes.

Composante	Concentration finale (mM)	
	Milieu isotonique	Milieu hypertonique
Na ⁺	55,00	55,00
Cl ⁻	5,00	5,00
K ⁺	4,400	4,40
Ca ²⁺	1,25	1,25
Mg ²⁺	1,25	1,25
HPO ₄ ⁻	0,63	0,63
SO ₄ ²⁻	0,63	0,63
Hepes	6,25	6,25
Gluc	50,60	50,60
Suc	75,00	160,00
Osmolarité finale de la solution	200	285

Tableau 9. Composantes du milieu d'incubation avec rubidium

Composante	Concentration finale (mM)
Na ⁺	78,00
Cl ⁻	83,00
K ⁺	0,00
Ca ²⁺	1,00
Mg ²⁺	1
SO ₄ ²⁻	1
Hepes	15,00
HPO ₄ ⁻	1,00
NMG	0,00 - 14,95
Gluc	0,00 - 4,95
⁸⁶ Rb ⁺	0,10 - 20,00
Osmolarité finale de la solution	200

6. Statistiques

En ce qui concerne la taille d'échantillon, nous avons établi que chaque grenouille équivaut à $n=1$ et que pour chaque condition testée, il faut un minimum de quatre ovocytes. Pour chacune des conditions testées, l'expérience doit aussi être répétée au moins 4 fois ($n=4$), donc les ovocytes de quatre grenouilles différentes doivent recevoir les traitements. Cette taille d'échantillon de $n=4$ a été préétablie par des expériences ultérieures semblables réalisées au laboratoire et confirmée par un calcul de taille d'échantillon (99% de puissance pour $n=4$).

Les données obtenues par spectrophotométrie d'absorption atomique sont présentées sous la forme de moyennes \pm les écarts-types provenant des expériences répétées. Elles sont sujettes à une analyse inférentielle bivariée, soit de leur relation associative en tant que variables continues (les moyennes calculées par spectrophotométrie) avec des variables catégoriques (la nature de l'ARNc injecté dans les ovocytes étudiés). Puisque les données obtenues sont distribuées normalement, la validité des résultats est testée en analysant les différences entre deux groupes par le test de student bidirectionnel. L'analyse d'égalité des variances est aussi effectuée, grâce au test de Bartlett. Enfin, les résultats sont considérés significatifs à un seuil de p -value $< 0,05$.

Chapitre 2. Résultats

1. *Western blot* et co-immunoprécipitations

1.1. Constructions simples

Les résultats de *Western blot* confirment que les protéines myc-NKCC2A et NKCC2B-flag sont bien exprimées dans les ovocytes (figures 11 et 12). Lorsque myc-NKCC2A est immunoprécipité avec l'anticorps anti-myc et qu'il y a détection avec l'anticorps anti-myc, les deux bandes caractéristiques de la protéine, correspondant à la forme glycosylée à 160 kDa et la forme non glycosylée à 110 kDa, sont observées (figure 11A). Il en est de même pour NKCC2B-flag dont les bandes caractéristiques de la protéine sont observées après immunoprécipitation avec l'anticorps anti-flag et détection avec l'anticorps anti-flag (figure 12B). Cependant, lorsque myc-NKCC2A est immunoprécipité avec l'anticorps anti-myc et détecté avec l'anticorps anti-flag (figure 12A) ou lorsque NKCC2B-flag est immunoprécipité avec l'anti-flag et détecté avec l'anti-myc, (figure 11B), il n'y a aucun signal. Ces résultats pourraient suggérer que NKCC2A et NKCC2B n'interagissent pas entre eux dans les ovocytes.

Lorsqu'il n'y a pas d'immunoprécipitation préalable avec les anticorps anti-myc ou anti-flag, la détection des protéines myc-NKCC2A et flag-NKCC2B est tout de même possible (protéines totales). On observe en effet la présence de myc-NKCC2A dans les échantillons totaux avec l'anticorps anti-myc (figure 11A et B) et de NKCC2B-flag avec l'anticorps anti-flag (figure 12A et B). Tel qu'attendu, l'intensité des signaux pour les échantillons qui ont préalablement subi une immunoprécipitation est plus élevée.

Les résultats aux figures 11 et 12 proviennent d'une seule expérience, mais celle-ci a été choisie parmi trois autres. On observe les mêmes résultats pour les quatre expériences, soit l'absence de signal lors de la co-immunoprécipitation entre myc-NKCC2A et NKCC2B-flag. Finalement, aucun signal n'est ou n'a été détecté pour les contrôles négatifs, c'est-à-dire pour les ovocytes injectés d'eau.

1.2. Constructions doubles

Les résultats de *Western blot* montrent que les protéines NKCC2 sont bien exprimées dans les ovocytes. La figure 13 permet d'observer les bandes caractéristiques du cotransporteur pour chacune des constructions doubles (AA, BB et AB). Toutefois, les bandes se retrouvent à des hauteurs de 160 et 110 kDa, et non 320 et 220 kDa comme l'on s'attendait pour les protéines de fusion produites par les constructions doubles. Ce point sera traité plus en détail au chapitre 3.

Les signaux observés à la figure 13A sont obtenus à la suite d'une immunoprécipitation préalable avec l'anticorps anti-myc et une détection avec l'anticorps anti-myc. À la figure 13B, toutefois, il n'y a plus de signaux

observables lorsqu'il y a une immunoprécipitation avec l'anti-myc et une détection avec l'anti-flag. Nous arrivons au même constat lorsqu'il y a immunoprécipitation avec l'anti-flag et détection avec l'anti-flag ou l'anti-myc (résultats non présentés ici). Ainsi, les résultats sont partiellement concordants avec ceux présentés aux figures 11 et 12. Des signaux auraient dû être observés dans les conditions où l'immunoprécipitation s'est faite avec l'anti-flag et la détection avec l'anti-flag. Ces données seront également discutées plus en détail au chapitre 3.

Lorsqu'il n'y a pas d'immunoprécipitation préalable avec les anticorps anti-myc ou anti-flag, la détection des protéines est tout de même possible (protéines totales) avec l'anti-myc (figure 13A et B), mais impossible avec l'anti-flag (résultats non présentés ici). L'intensité du signal des bandes pour les échantillons qui ont préalablement subi une immunoprécipitation avec l'anti-myc est encore une fois plus élevée que pour les protéines détectées dans les échantillons totaux sans immunoprécipitation préalable.

À la figure 13 est représentée une seule expérience, mais celle-ci a été effectuée parmi trois autres expériences. On observe les mêmes résultats pour les quatre expériences. Finalement, aucun signal n'est ou n'a été détecté pour les contrôles négatifs, c'est-à-dire pour les ovocytes injectés d'eau.

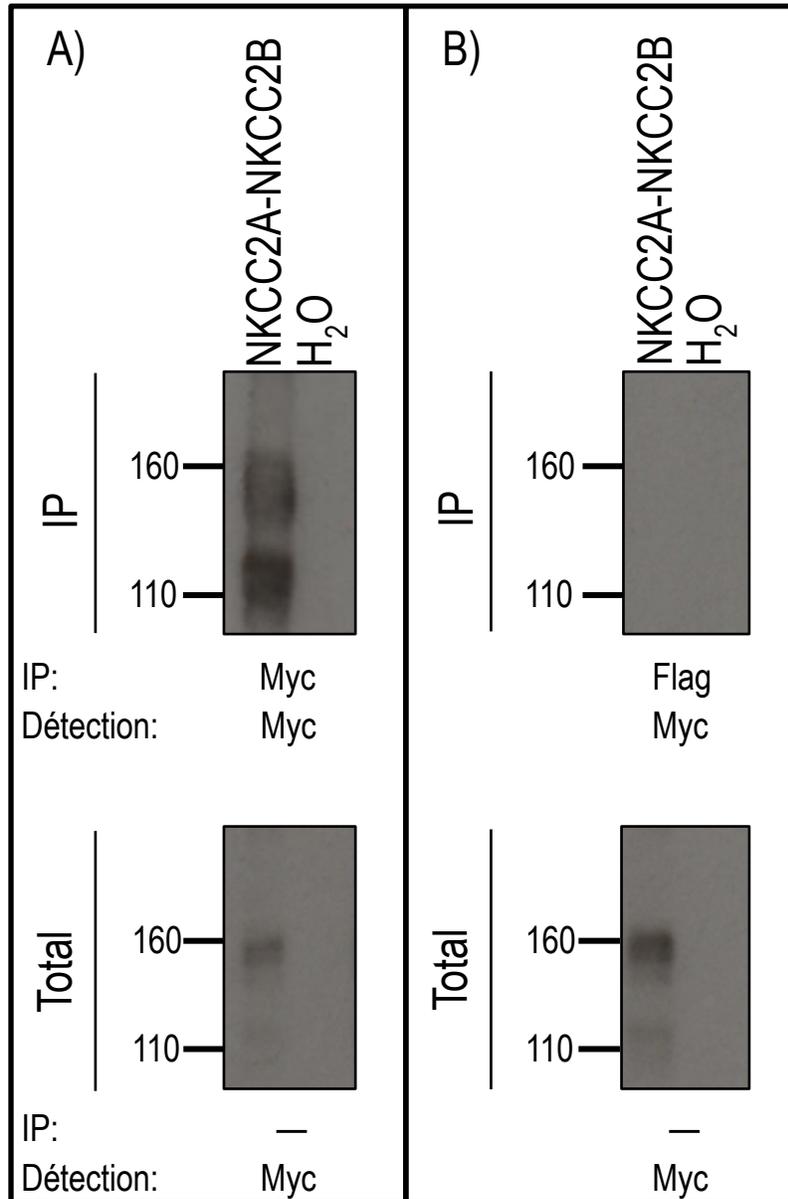


Figure 11. Western blot et co-immunoprécipitations entre les constructions simples myc-NKCC2A et NKCC2B-flag et détection de la membrane par l'anticorps anti-myc A) IP préalable avec l'anticorps anti-myc et B) IP préalable avec l'anticorps anti-flag. L'immunodétection sur membrane de PVFD a été réalisée avec l'anticorps anti-myc. Les conditions NKCC2A+NKCC2B sont possibles grâce à des injections dans les mêmes ovocytes des constructions simples myc-NKCC2A et NKCC2B-flag. Les ovocytes exprimant les cotransporteurs NKCC2A et NKCC2B ont subi une préincubation d'une heure dans un milieu hypertonique (285 mOsm). Les IP sont en haut de la figure et les résultats des protéines totales sont en bas de la figure.

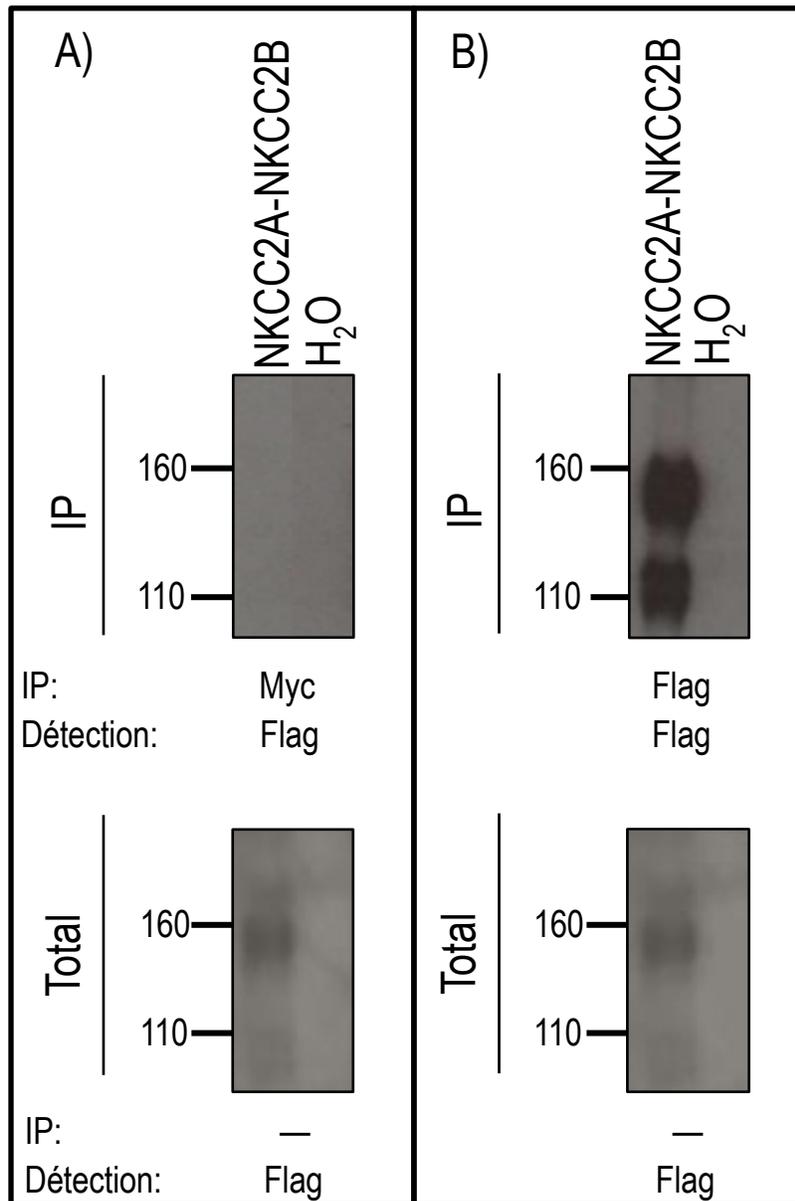


Figure 12. Western blot et co-immunoprécipitations entre les constructions simples myc-NKCC2A et NKCC2B-flag et détection de la membrane par l'anticorps anti-flag A) IP préalable avec l'anticorps anti-myc et B) IP préalable avec l'anticorps anti-flag. L'immunodétection sur membrane de PVFD a été réalisée avec l'anticorps anti-flag. Les conditions NKCC2A+NKCC2B sont possibles grâce à des injections dans les mêmes ovocytes des constructions simples myc-NKCC2A et NKCC2B-flag. Les ovocytes exprimant les cotransporteurs NKCC2A et NKCC2B ont subi une préincubation d'une heure dans un milieu hypertonique (285 mOsm). Les IP sont en haut de la figure et les résultats des protéines totales sont en bas de la figure.

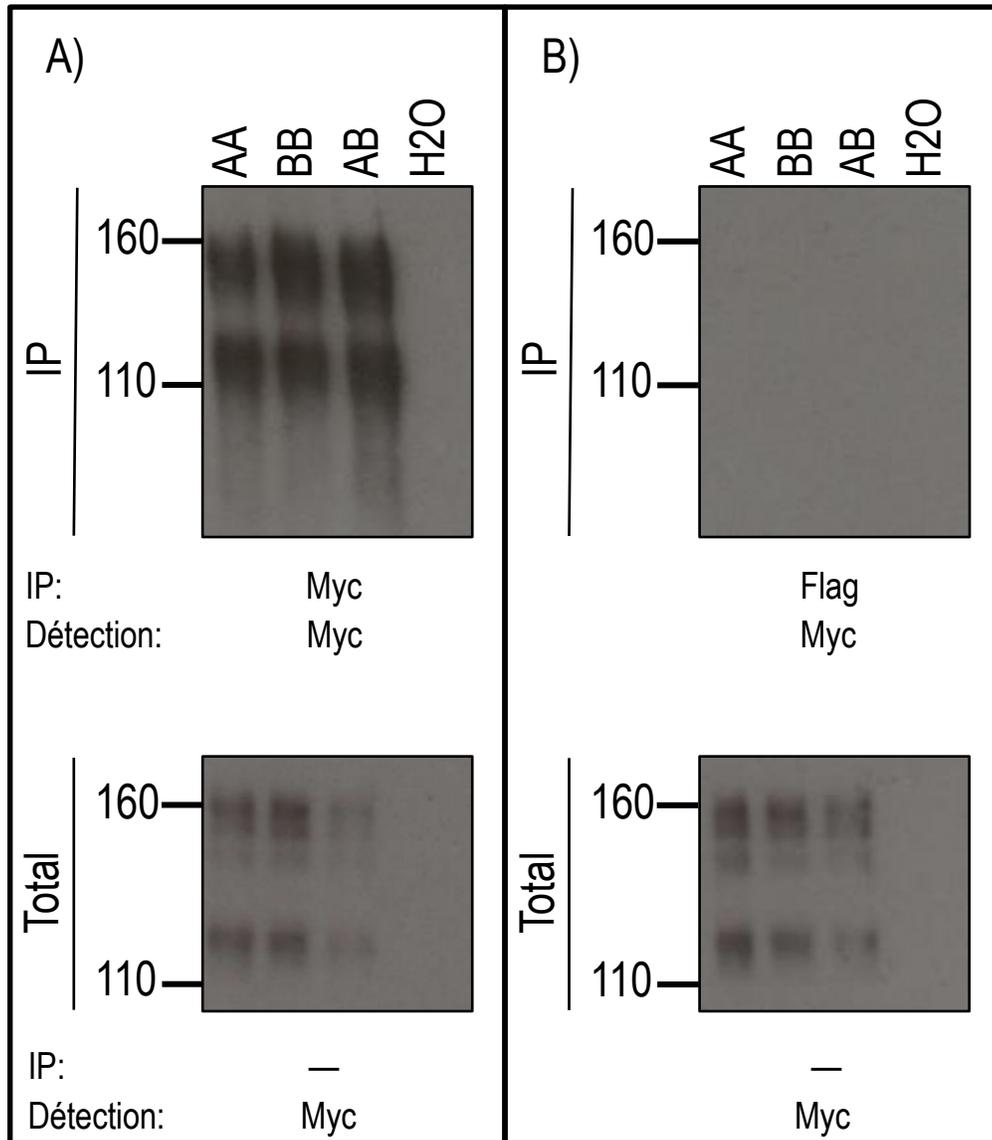


Figure 13. Western blot des protéines AA, BB et AB et détection de la membrane par l'anticorps anti-myc A) IP préalable avec l'anticorps anti-myc et B) IP préalable avec l'anticorps anti-flag. L'immunodétection sur membrane de PVFD a été réalisée avec l'anticorps anti-myc. Les conditions AA, BB et AB sont possibles grâce aux injections des constructions doubles. Les ovocytes exprimant les cotransporteurs AA, BB et AB ont subi une préincubation d'une heure dans un milieu hypertonique (285 mOsm). Les IP sont en haut de la figure et les résultats des protéines totales sont en bas de la figure.

2. Immunofluorescence

2.1. Constructions simples

Pour les constructions simples myc-NKCC2A et NKCC2B-flag injectées dans différents ovocytes, un signal fluorescent fort est obtenu à la membrane plasmique, et ce pour toutes les conditions de préincubations (isotonique et hypertonique), avec les anticorps primaires anti-myc et anti-flag (figures 14 et 15). Pour les contrôles négatifs, aucun signal n'est observé. Pour les constructions simples myc-NKCC2A et NKCC2B-flag coinjectées dans les mêmes ovocytes, un résultat analogue est obtenu avec l'un ou l'autre des anticorps (figure 16) tandis que pour les contrôles négatifs, il n'y a toujours pas de signal. Enfin, aucun signal n'est détecté pour les ovocytes injectés d'eau (résultats non présentés ici). À noter, toutefois, que l'intensité du signal à la membrane est plus forte en condition hypertonique.

2.2. Constructions doubles

Pour les constructions doubles (AA, BB et AB) injectées dans différents ovocytes, un signal fluorescent fort est obtenu à la membrane plasmique avec les anticorps primaires anti-myc et anti-flag, et ce, pour toutes les conditions de préincubations (isotonique et hypertonique) (figures 17, 18 et 19). Pour les contrôles négatifs, aucun signal n'est observé. La fluorescence observée à la suite d'une détection avec l'anticorps anti-flag (figures 17, 18 et 19) est toutefois plus diffuse et moins intense lorsqu'on la compare à la fluorescence émise à la suite de la détection avec l'anticorps anti-myc. Ces résultats montrent ainsi que les protéines de fusion sont exprimées correctement. Toutefois, l'intensité des signaux en milieu hypertonique n'est pas supérieure dans ces conditions. Enfin, aucun signal n'est détecté pour les ovocytes injectés d'eau (résultats non présentés ici).

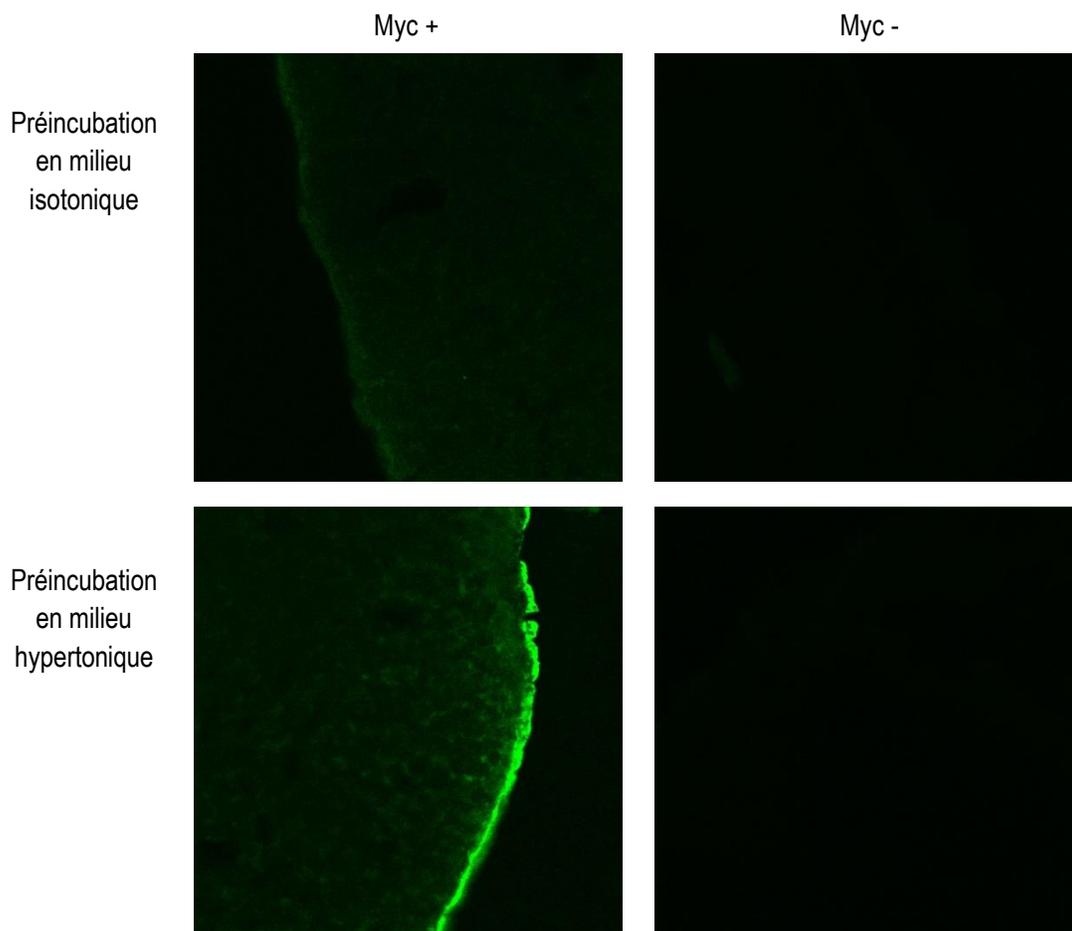


Figure 14. Immunofluorescences de la construction simple myc-NKCC2A injectée seule dans les ovocytes. À gauche sont représentés les ovocytes détectés avec l'anticorps primaire anti-myc. L'anticorps anti-myc permet la détection de myc-NKCC2A, qui possède l'épitope myc en N-terminal de la construction plasmidique. À droite sont représentés les contrôles négatifs pour chacune des conditions, où aucun anticorps primaire n'a été appliqué aux échantillons. Tous les ovocytes exprimant le cotransporteur NKCC2A ont subi une préincubation d'une heure dans un milieu isotonique (200 mOsm) ou dans un milieu hypertonique (285 mOsm).

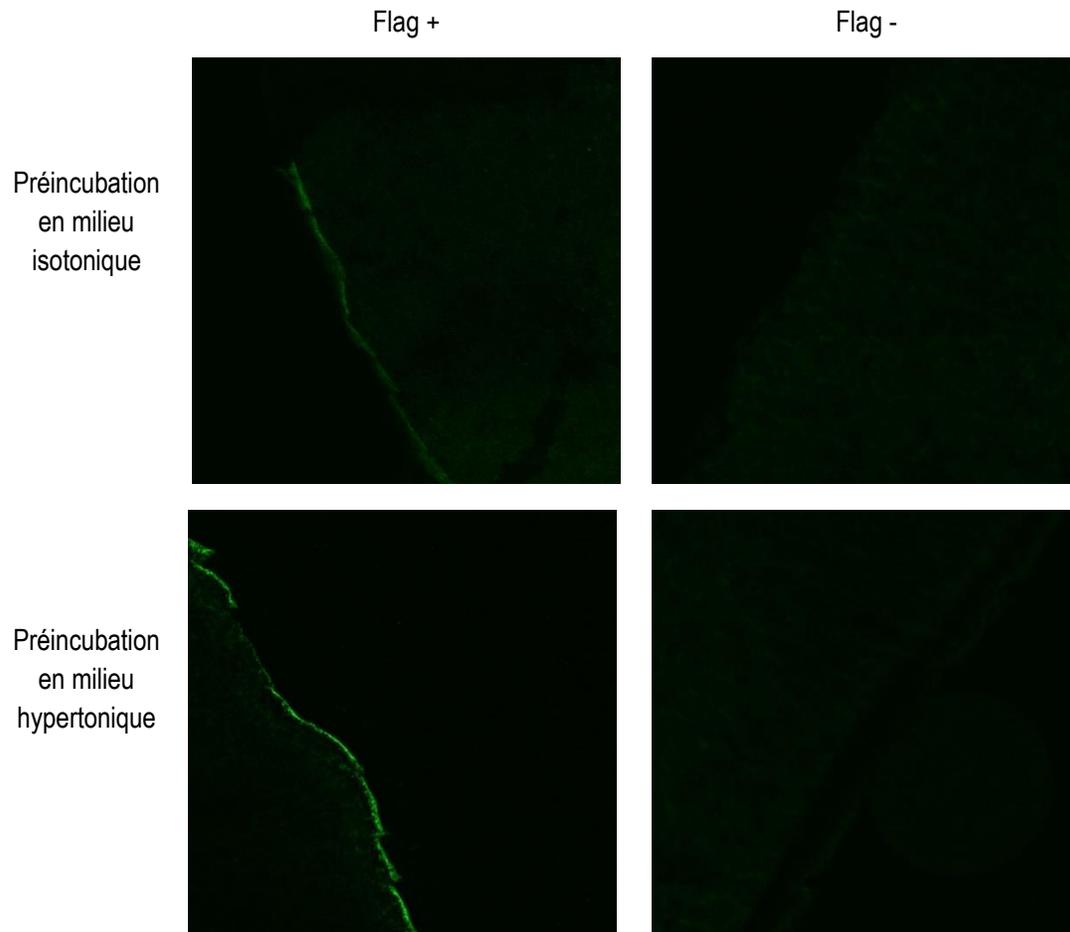


Figure 15. Immunofluorescences de la construction simple NKCC2B-flag injectée seule dans les ovocytes. À gauche sont représentés les ovocytes détectés avec l'anticorps primaire anti-flag. L'anticorps anti-flag permet la détection de NKCC2B-flag, qui possède l'épitope flag en C-terminal de la construction plasmidique. À droite sont représentés les contrôles négatifs pour chacune des conditions, où aucun anticorps primaire n'a été appliqué aux échantillons. Tous les ovocytes exprimant le cotransporteur NKCC2B ont subi une préincubation d'une heure dans un milieu isotonique (200 mOsm) ou dans un milieu hypertonique (285 mOsm).

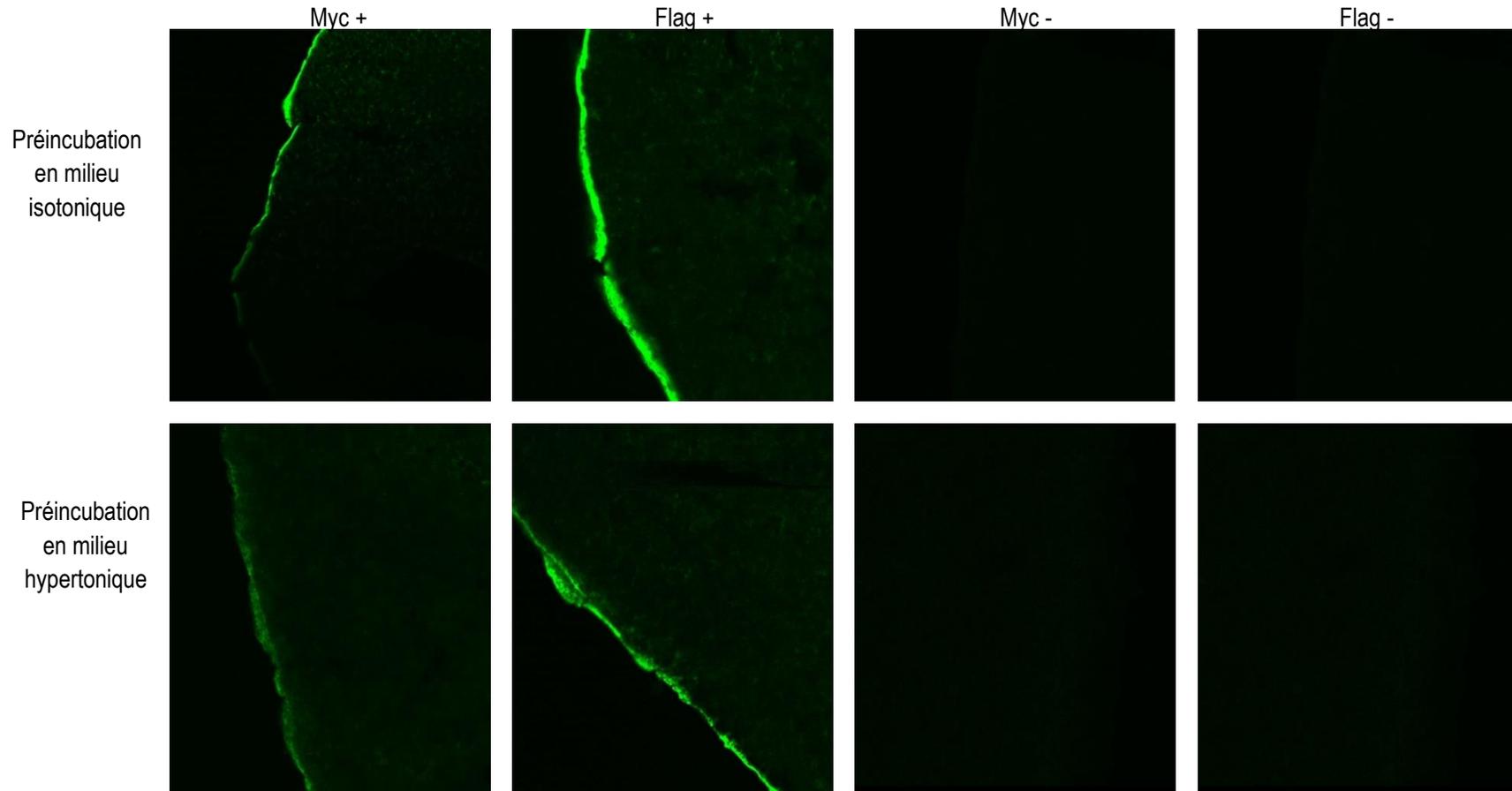


Figure 16. Immunofluorescences des constructions simples myc-NKCC2A et NKCC2B-flag coinjectées dans les mêmes ovocytes. À gauche sont représentés les ovocytes détectés avec les anticorps primaires anti-myc et anti-flag. L'anticorps myc permet la détection de myc-NKCC2A, qui possède l'épitope myc en N-terminal de la construction plasmidique. L'anticorps flag permet la détection de NKCC2B-flag, qui possède l'épitope flag en C-terminal de la construction plasmidique. À droite sont représentés les contrôles négatifs pour chacune des conditions, où aucun anticorps primaire n'a été appliqué aux échantillons. Les conditions myc-NKCC2A+NKCC2B-flag sont possibles grâce à des coinjections dans les mêmes ovocytes des constructions simples myc-NKCC2A et de NKCC2B-flag. Tous les ovocytes exprimant les cotransporteurs NKCC2A et NKCC2B ont subi une préincubation d'une heure dans un milieu isotonique (200 mOsm) ou dans un milieu hypertonique (285 mOsm).

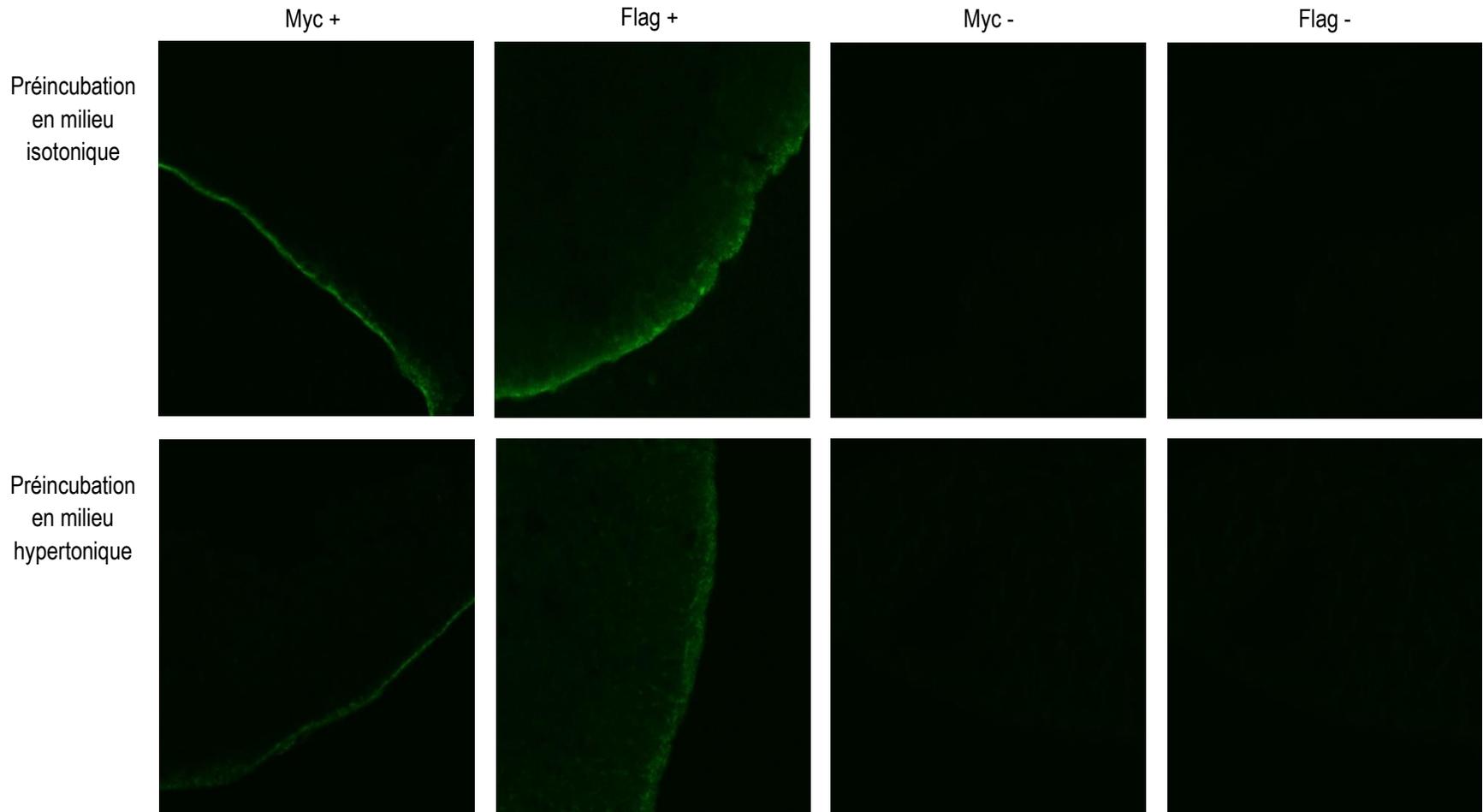


Figure 17. Immunofluorescences de l'homodimère AA. À gauche sont représentés les ovocytes détectés avec les anticorps primaires anti-myc et anti-flag. Les anticorps anti-myc et anti-flag permettent la détection de l'homodimère AA du cotransporteur NKCC2. L'épitope myc se retrouve en position N-terminale de la construction double. L'épitope flag se retrouve au niveau du *linker* de la construction double. À droite sont représentés les contrôles négatifs pour chacune des conditions, où aucun anticorps primaire n'a été appliqué aux échantillons. Tous les ovocytes exprimant le dimère AA du cotransporteur NKCC2 ont subi une préincubation d'une heure dans un milieu isotonique (200 mOsm) ou dans un milieu hypertonique (285 mOsm).

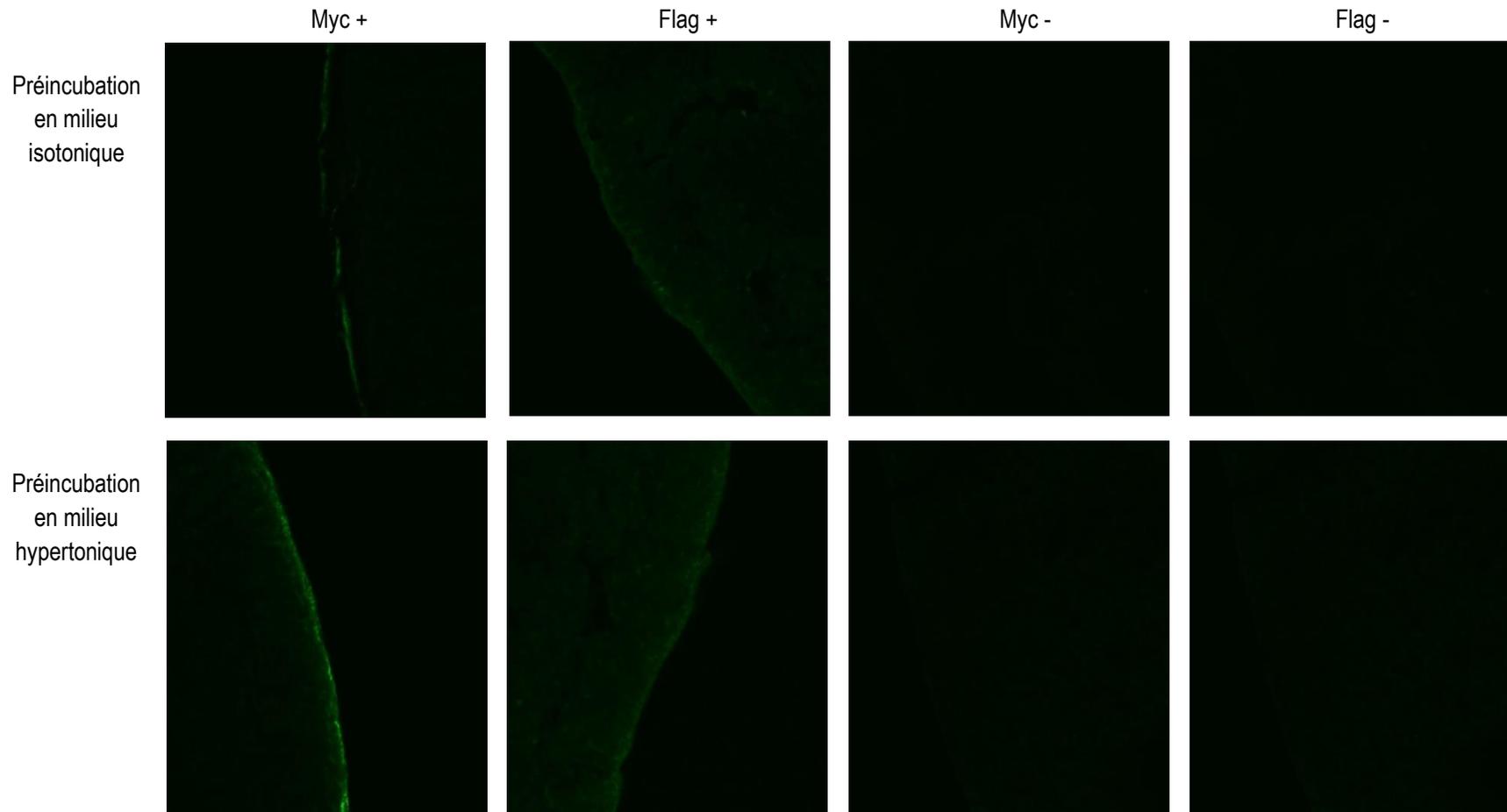


Figure 18. Immunofluorescences de l'homodimère BB. À gauche sont représentés les ovocytes détectés avec les anticorps primaires anti-myc et anti-flag. Les anticorps anti-myc et anti-flag permettent la détection de l'homodimère BB du cotransporteur NKCC2. L'épitope myc se retrouve en position N-terminale de la construction double. L'épitope flag se retrouve au niveau du *linker* de la construction double. À droite sont représentés les contrôles négatifs pour chacune des conditions, où aucun anticorps primaire n'a été appliqué aux échantillons. Tous les ovocytes exprimant le dimère BB du cotransporteur NKCC2 ont subi une préincubation d'une heure dans un milieu isotonique (200 mOsm) ou dans un milieu hypertonique (285 mOsm).

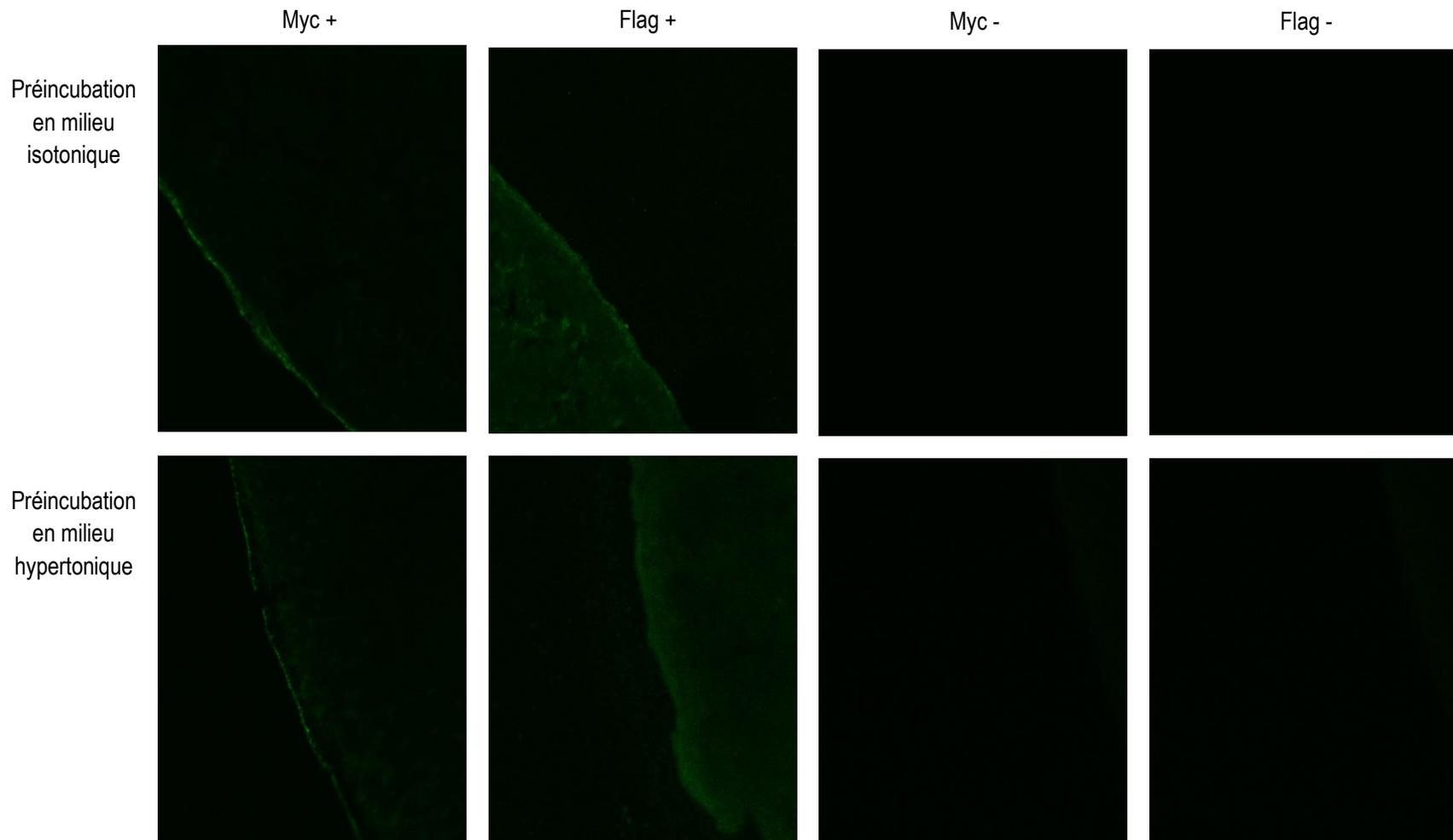


Figure 19. Immunofluorescences de l'hétérodimère AB. À gauche sont représentés les ovocytes détectés avec les anticorps primaires anti-myc et anti-flag. Les anticorps anti-myc et anti-flag permettent la détection de l'hétérodimère AB du cotransporteur NKCC2. L'épitope myc se retrouve en position N-terminale de la construction double. L'épitope flag se retrouve au niveau du *linker* de la construction double. À droite sont représentés les contrôles négatifs pour chacune des conditions, où aucun anticorps primaire n'a été appliqué aux échantillons. Tous les ovocytes exprimant le dimère AB du cotransporteur NKCC2 ont subi une préincubation d'une heure dans un milieu isotonique (200 mOsm) ou dans un milieu hypertonique (285 mOsm).

3. Études de transport

3.1. Constructions simples

Lorsque les constructions simples sont coinjectées dans les mêmes ovocytes, il n'y a pas de différences statistiquement significatives entre les moyennes des $Km(Rb^+)$ et des $Vmax(Rb^+)$ calculées pour les préincubations en milieu isotonique. De fait, les $Km(Rb^+)$ pour NKCC2A+NKCC2A, NKCC2B+NKCC2B et NKCC2A+NKCC2B sont, respectivement, $4,13\pm 1,21$, $2,58\pm 0,88$ et $5,21\pm 2,02$ mM et les $Vmax(Rb^+)$ sont de $4,59\pm 1,21$, $4,31\pm 1,26$ et $3,95\pm 0,82$ nmol/ovocyte/h (figure 20). Les p -values calculées grâce au test statistique de *Student* sont résumées dans le tableau 10. Il en va de même pour les préincubations en milieu hypertonique : les valeurs de $Km(Rb^+)$ sont respectivement de $4,26\pm 0,85$, $3,61\pm 0,41$ et $5,05\pm 0,94$ mM et les valeurs de $Vmax(Rb^+)$ sont de $9,70\pm 2,71$, $9,14\pm 3,55$ et $7,37\pm 2,38$ nmol/ovocytes/h (figure 21). Les p -values calculées grâce au test statistique de *Student* sont résumées dans le tableau 10.

Tableau 10. Résultats des test de student (p -values) pour la comparaison des moyennes des $Km(Rb^+)$ et des $Vmax(Rb^+)$ des cotransporteurs NKCC2A et NKCC2B coinjectés sous la forme de constructions simples à la suite de préincubations en milieu isotonique et hypertonique. Les moyennes comparées proviennent de 3-5 expériences.

Conditions comparées	p -values	
	$Km(Rb^+)$	$Vmax(Rb^+)$
Préincubation en milieu isotonique		
AA vs. BB	0,334032	0,879075
AA vs. AB	0,644673	0,690815
BB vs. AB	0,237421	0,825748
Préincubation en milieu hypertonique		
AA vs. BB	0,527643	0,903521
AA vs. AB	0,545275	0,535521
BB vs. AB	0,221009	0,689043

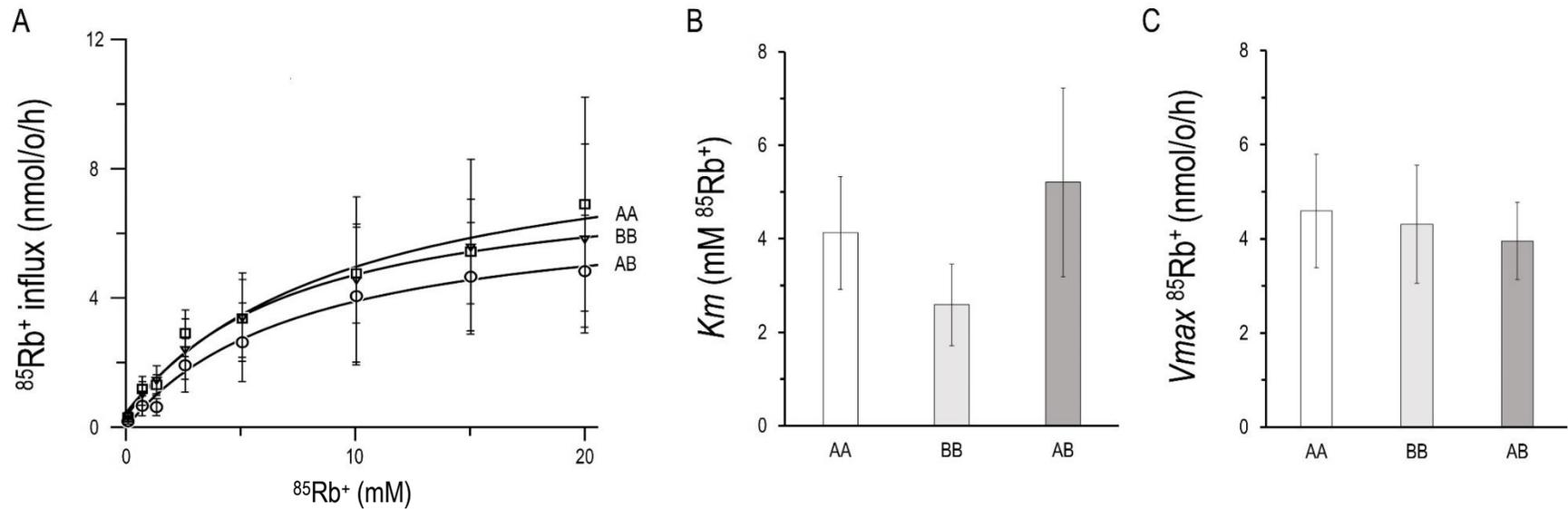


Figure 20. Effet du changement de la concentration extracellulaire de $^{85}\text{Rb}^+$ après une préincubation en milieu isotonique (200 mOsm) sur les caractéristiques de transport des cotransporteurs myc-NKCC2A et NKCC2B-flag coinjectés sous la forme de constructions simples dans les ovocytes. L'influx de $^{85}\text{Rb}^+$ a été mesuré à des concentrations extracellulaires croissantes de $^{85}\text{Rb}^+$ à la suite d'une préincubation d'une heure dans un milieu isotonique (200 mOsm). Chacune des courbes correspond à des ovocytes injectés de la construction simple myc-NKCC2A (AA sur la figure), des constructions simples myc-NKCC2A et NKCC2B-flag (AB sur la figure) et de la construction simple NKCC2B-flag (BB sur la figure). Le panneau A présente les données sous forme de moyennes \pm S.E. auxquelles ont été soustraites les moyennes obtenues pour les ovocytes injectés avec de l'eau. Les courbes obtenues dans le panneau A ont été calculées grâce à l'équation de Michaelis-Menten. Les panneaux B et C présentent respectivement les caractéristiques de transport de la $K_m(\text{Rb}^+)$ et de la $V_{\text{max}}(\text{Rb}^+)$ exprimées sous la forme de moyennes \pm S.E. aussi calculées grâce à l'équation de Michaelis-Menten. Les moyennes proviennent de 3-5 expériences.

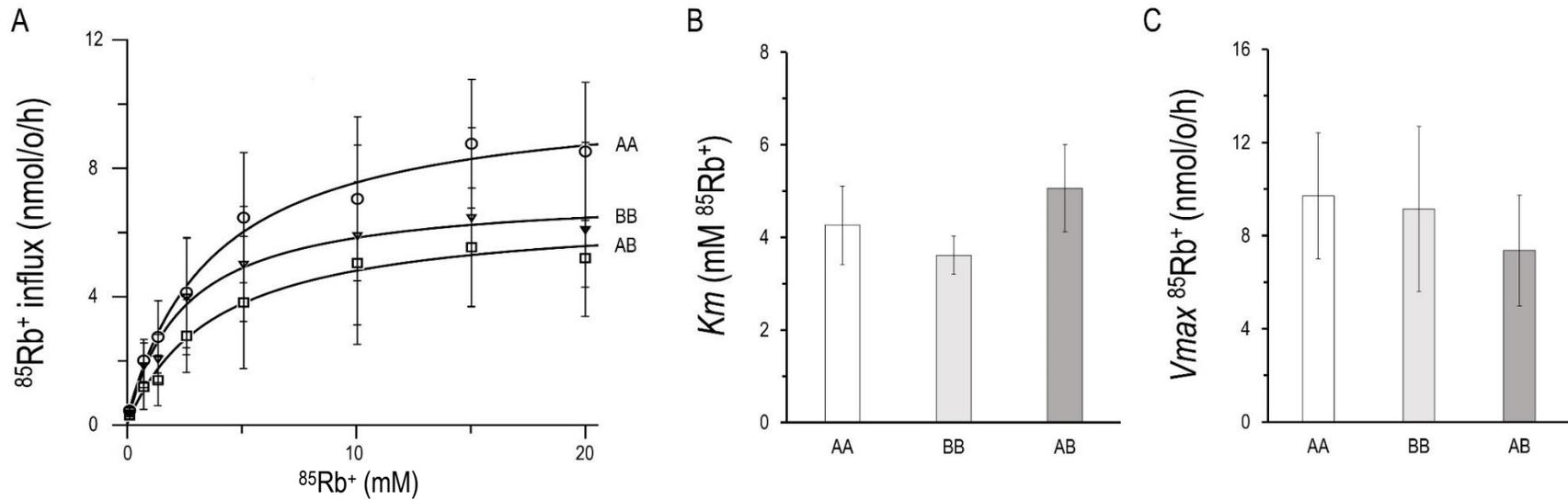


Figure 21. Effet du changement de la concentration extracellulaire de $^{85}\text{Rb}^+$ après une préincubation en milieu hypertonique (285 mOsm) sur les caractéristiques de transport des cotransporteurs myc-NKCC2A et NKCC2B-flag coinjectés sous la forme de constructions simples dans les ovocytes. L'influx de $^{85}\text{Rb}^+$ a été mesuré à des concentrations extracellulaires croissantes de $^{85}\text{Rb}^+$ à la suite d'une préincubation d'une heure dans un milieu hypertonique (285 mOsm). Chacune des courbes correspond à des ovocytes injectés de la construction simple myc-NKCC2A (AA sur la figure), des constructions simples myc-NKCC2A et NKCC2B-flag (AB sur la figure) et de la construction simple NKCC2B-flag (BB sur la figure). Le panneau A présente les données sous forme de moyennes \pm S.E auxquelles ont été soustraites les moyennes obtenues pour les ovocytes injectés avec de l'eau. Les courbes obtenues dans le panneau A ont été calculées grâce à l'équation de Michaelis-Menten. Les panneaux B et C présentent respectivement les caractéristiques de transport de la $K_m(\text{Rb}^+)$ et de la $V_{\text{max}}(\text{Rb}^+)$ exprimées sous la forme de moyennes \pm S.E. aussi calculées grâce à l'équation de Michaelis-Menten. Les moyennes proviennent de 3-5 expériences.

3.2. Constructions doubles

Lorsque les variants sont exprimés sous forme de protéines de fusion (AA, BB et AB), on observe des différences statistiquement significatives entre les moyennes des $V_{max}(Rb^+)$ de AB par rapport à AA et BB en milieu isotonique (200 mOsm). Les valeurs de $V_{max}(Rb^+)$ sont de $1,72 \pm 0,18$ pour AA, $2,33 \pm 0,21$ pour BB et $3,72 \pm 0,43$ nmol/ovocyte/h pour AB (figure 22). Il n'existe cependant aucune différence significative en ce qui concerne les moyennes des $K_m(Rb^+)$ pour les préincubations en milieu isotonique (200 mOsm). Respectivement, les $K_m(Rb^+)$ calculées pour les conditions injectées AA, BB et AB sont : $2,49 \pm 0,50$, $2,77 \pm 0,73$ et $3,30 \pm 1,17$ mM (figure 22). Les *p-values* calculées grâce au test statistique de Student sont résumées dans le tableau 11.

De la même façon, il existe des différences statistiquement significatives pour les moyennes de $V_{max}(Rb^+)$ de AB par rapport à AA et BB en milieu hypertonique (285 mOsm), soit $5,36 \pm 0,63$ pour AA, $6,68 \pm 0,93$ pour BB et $10,36 \pm 1,12$ nmol/ovocyte/h pour AB, et non pour les moyennes de $K_m(Rb^+)$, soit $1,91 \pm 0,47$ pour AA, $1,36 \pm 0,42$ pour BB et $3,05 \pm 1,09$ mM pour AB (figure 23). Les *p-values* calculées grâce au test statistique de Student sont résumées dans le tableau 11.

Pour tous les dimères, une sensibilité importante au furosémide a été notée autant en milieu isotonique qu'en milieu hypertonique (figure 24). Les cotransporteurs produits dans l'ovocyte avaient donc un comportement normal.

En ce qui concerne l'homodimère AA, la moyenne mesurée de l'influx de $^{85}Rb^+$ en milieu isotonique est de $2,81 \pm 0,58$ nmol/ovocyte/h sans furosémide et de $0,135 \pm 0,08$ nmol/ovocyte/h avec furosémide (figure 24A), ce qui se traduit en une différence très significative (*p-value* de 0,005374). Pour ce qui est de la moyenne mesurée de l'influx de $^{85}Rb^+$ en milieu hypertonique, elle est de $5,88 \pm 1,27$ nmol/ovocyte/h sans furosémide et de $0,133 \pm 0,05$ nmol/ovocyte/h avec furosémide (figure 24A), ce qui se traduit aussi en une différence très significative (*p-value* de 0,006133).

Tableau 11. Résultats des tests de student (*p-values*) pour la comparaison des moyennes des $Km(Rb^+)$ et des $Vmax(Rb^+)$ des cotransporteurs NKCC2A et NKCC2B injectés sous la forme de constructions doubles à la suite de préincubations en milieu isotonique et hypertonique. Les moyennes comparées proviennent de 4-7 expériences.

Conditions comparées	<i>p-values</i>	
	$Km(Rb^+)$	$Vmax(Rb^+)$
Préincubation en milieu isotonique		
AA vs. BB	0,747983	0,066589
AA vs. AB	0,494562	0,006621 ^b
BB vs. AB	0,702416	0,027951 ^a
Préincubation en milieu hypertonique		
AA vs. BB	0,410001	0,251979
AA vs. AB	0,332739	0,004702 ^b
BB vs. AB	0,178426	0,030684 ^a

^a*p-value* < 0,05

^b*p-value* < 0,01

Un constat similaire s'impose en ce qui concerne l'homodimère BB. L'influx de $^{85}Rb^+$ en milieu isotonique est de $2,85 \pm 0,79$ nmol/ovocyte/h sans furosémide et de $0,229 \pm 0,07$ nmol/ovocyte/h avec furosémide (figure 24B) tandis qu'en milieu hypertonique, il est de $7,44 \pm 1,75$ sans furosémide et de $0,213 \pm 0,06$ nmol/ovocyte/h avec furosémide (figure 24B). Dans les deux cas, les différences étaient statistiquement très significatives (*p-values* de 0,003213 et de 0,008974, respectivement).

Finalement, le constat est aussi identique pour l'hétérodimère AB. Les valeurs obtenues en milieu isotonique sont de $6,224 \pm 1,20$ nmol/ovocyte/h sans furosémide et de $0,143 \pm 0,04$ nmol/ovocyte/h avec furosémide (*p-value* de 0,007156; figure 24C) alors qu'il est de $9,02 \pm 1,16$ nmol/ovocyte/h sans furosémide et de $0,170 \pm 0,09$ avec furosémide en milieu hypertonique (*p-value* de 0,000014; figure 24C).

Pour terminer, les niveaux atteints d'influx en présence de furosémide sont similaires parmi les trois dimères. Les hétérodimères AB ont donc le même comportement que les homodimères AA et BB à cet égard.

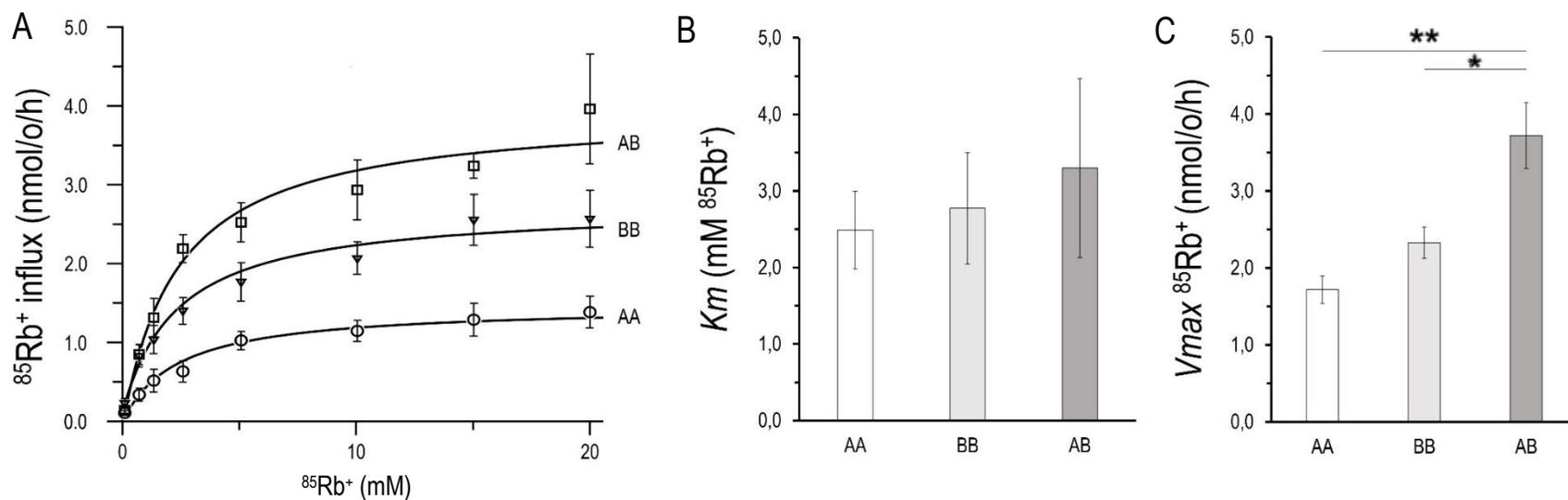


Figure 22. Effet du changement de la concentration extracellulaire de $^{85}\text{Rb}^+$ après une préincubation en milieu isotonique (200 mOsm) sur les caractéristiques de transport des dimères AA, AB et BB du cotransporteur NKCC2 injectés sous la forme de constructions doubles dans les ovocytes. L'influx de $^{85}\text{Rb}^+$ a été mesuré à des concentrations extracellulaires croissantes de $^{85}\text{Rb}^+$ à la suite d'une préincubation d'une heure dans un milieu isotonique (200 mOsm). Chacune des courbes correspond à des ovocytes injectés des constructions doubles produisant la protéine de fusion NKCC2A+NKCC2A (AA dans la figure), des constructions doubles produisant la protéine de fusion NKCC2A+NKCC2B (AB dans la figure) et des constructions doubles produisant la protéine de fusion NKCC2B+NKCC2B (BB dans la figure). Le panneau A présente les données sous forme de moyennes \pm S.E auxquelles ont été soustraites les moyennes obtenues pour les ovocytes injectés avec de l'eau. Les courbes obtenues dans le panneau A ont été calculées grâce à l'équation de Michaelis-Menten. Les panneaux B et C présentent respectivement les caractéristiques de transport de la $K_m(\text{Rb}^+)$ et de la $V_{max}(\text{Rb}^+)$ exprimées sous la forme de moyennes \pm S.E. aussi calculées grâce à l'équation de Michaelis-Menten. Les moyennes proviennent de 4-7 expériences. * : *p-value* < 0,05 et ** : *p-value* < 0,01.

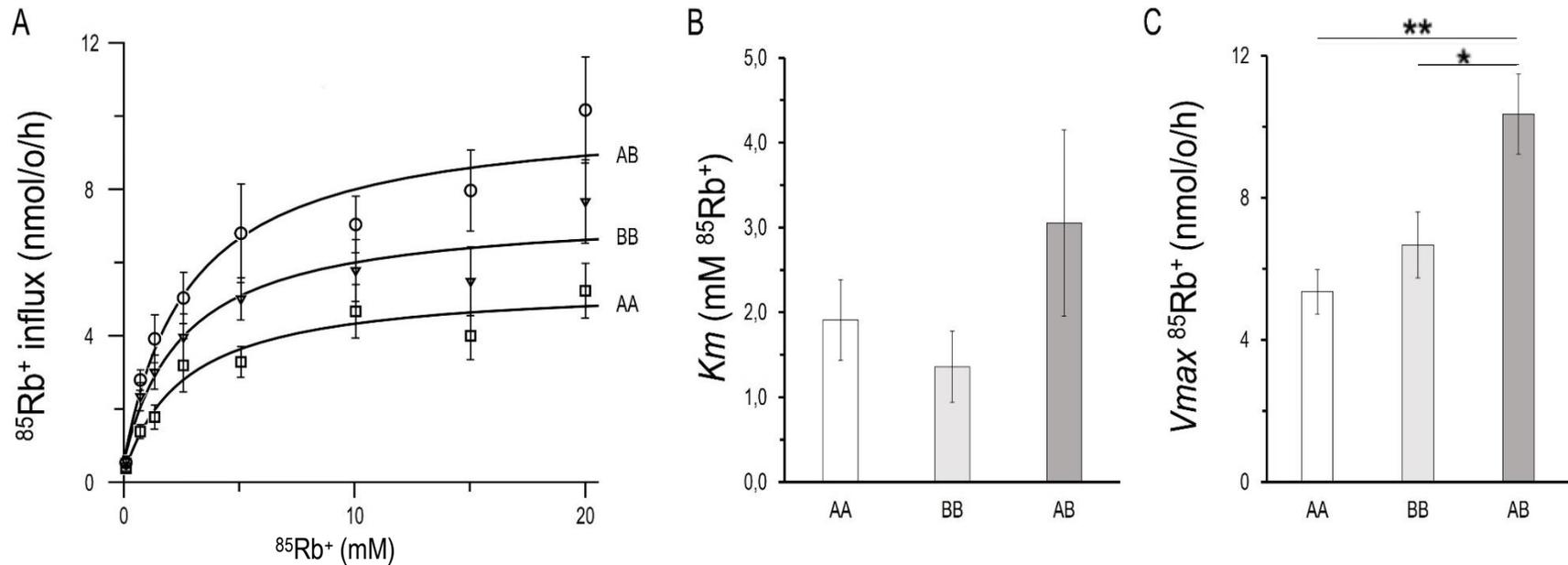


Figure 23. Effet du changement de la concentration extracellulaire de $^{85}\text{Rb}^+$ après une préincubation en milieu hypertonique (285 mOsm) sur les caractéristiques de transport des dimères AA, AB et BB du cotransporteur NKCC2 injectés sous la forme de constructions doubles dans les ovocytes. L'influx de $^{85}\text{Rb}^+$ a été mesuré à des concentrations extracellulaires croissantes de $^{85}\text{Rb}^+$ à la suite d'une préincubation d'une heure dans un milieu hypertonique (285 mOsm). Chacune des courbes correspond à des ovocytes injectés des constructions doubles produisant la protéine de fusion NKCC2A+NKCC2A (AA dans la figure), des constructions doubles produisant la protéine de fusion NKCC2A+NKCC2B (AB dans la figure) et des constructions doubles produisant la protéine de fusion NKCC2B+NKCC2B (BB dans la figure). Le panneau A présente les données sous forme de moyennes \pm S.E auxquelles ont été soustraites les moyennes obtenues pour les ovocytes injectés avec de l'eau. Les courbes obtenues dans le panneau A ont été calculées grâce à l'équation de Michaelis-Menten. Les panneaux B et C présentent respectivement les caractéristiques de transport de la $K_m(\text{Rb}^+)$ et de la $V_{\text{max}}(\text{Rb}^+)$ exprimées sous la forme de moyennes \pm S.E. aussi calculées grâce à l'équation de Michaelis-Menten. Les moyennes proviennent de 4-7 expériences. * : p -value < 0,05 et ** : p -value < 0,01.

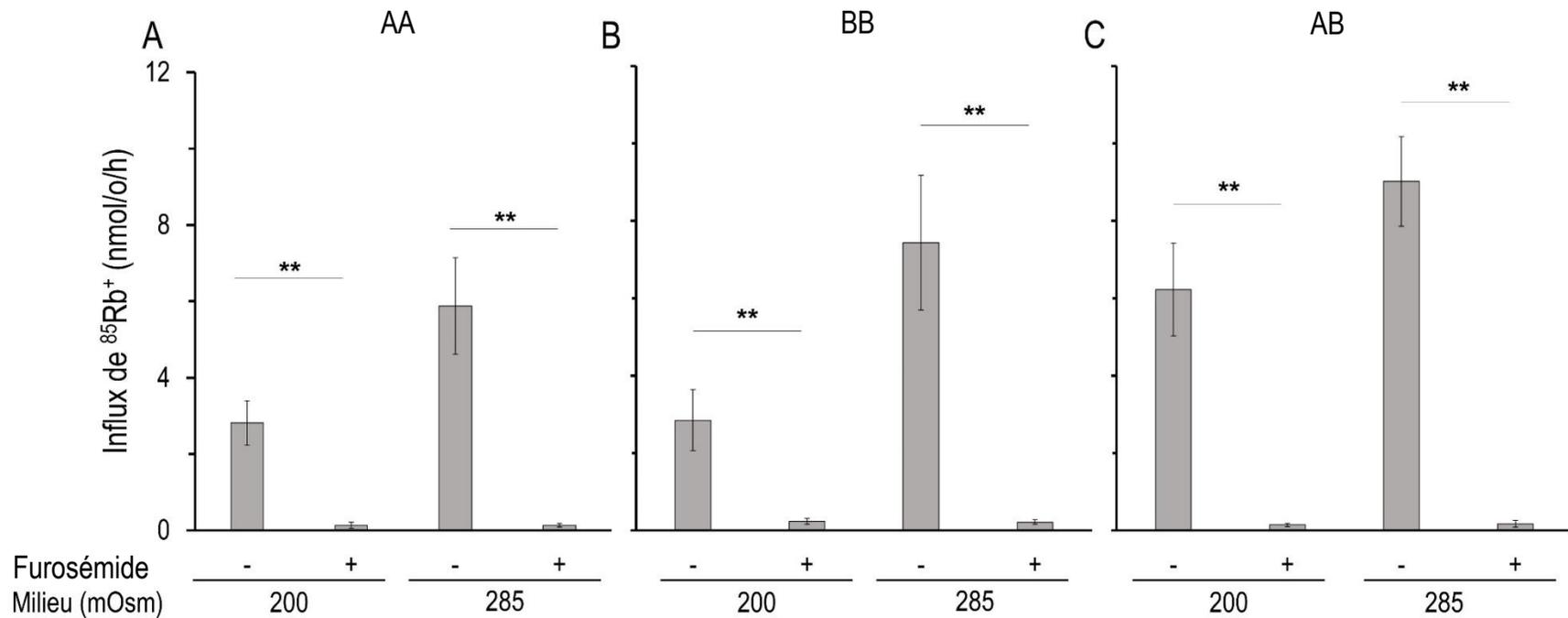


Figure 24. Effet de l'ajout de furosémide dans le milieu d'incubation sur l'influx en $^{85}\text{Rb}^+$ par les cotransporteurs NKCC2A et NKCC2B injectés sous la forme de constructions doubles dans les ovocytes. L'influx de $^{85}\text{Rb}^+$ a été mesuré à une concentration extracellulaire de 7mM de $^{85}\text{Rb}^+$ en présence (+) ou non (-) de 0,25 mM de furosémide. Des préincubations d'une heure en milieu isotonique (200 mOsm) et en milieu hypertonique (285 mOsm) ont été effectuées. Le panneau A correspond aux influx mesurés chez les ovocytes dont l'ARNc de la protéine de fusion NKCC2A-NKCC2A (AA) a été injecté. Le panneau B correspond aux influx mesurés chez les ovocytes dont l'ARNc de la protéine de fusion NKCC2B-NKCC2B (BB) a été injecté. Le panneau C correspond aux influx mesurés chez les ovocytes dont l'ARNc de la protéine de fusion NKCC2A-NKCC2B (AB) a été injecté. Toutes les données sont présentées sous la forme de moyenne \pm S.E. auxquelles ont été soustraites les moyennes obtenues pour les ovocytes injectés avec de l'eau. Les moyennes proviennent de 4-6 expériences. * : *p-value* < 0,05 et ** : *p-value* < 0,01.

Chapitre 3. Discussion

1. Expression de NKCC2 dans les ovocytes

Des analyses de *Western blot* et d'immunofluorescences ont été utilisées dans ce travail pour confirmer l'expression des protéines à l'étude avant d'en tester la fonction, soit de comparer la cinétique de transport parmi des NKCC2 produits à partir de constructions simples et doubles. Ces expériences n'avaient pour pas objectif immédiat de comparer les niveaux d'expressions entre les NKCC2 dans la mesure où plusieurs des paramètres cinétiques qui ont été mesurés ne devraient pas en dépendre. Un objectif à long terme sera toutefois de procéder à de telles analyses quantitatives pour aider dans l'interprétation globale des résultats.

1.1. Constructions simples

Tout d'abord, la construction simple codant pour la protéine myc-NKCC2A est bien exprimée dans les ovocytes de *Xenopus laevis*. Les deux bandes observées au panneau A de la figure 11 correspondent à la protéine myc-NKCC2A sous ses deux formes : la forme non glycosylée (110 kDa) et la forme glycosylée (160 kDa). La protéine est détectée lorsqu'une immunoprécipitation est faite au préalable avec l'anticorps anti-myc (IP) et dans l'échantillon total sans immunoprécipitation préalable (Total). Il est normal que le signal pour les bandes en condition IP soit plus fort puisque NKCC2 se retrouve concentré dans l'échantillon. Les expériences d'immunofluorescences ont aussi confirmé l'expression de la protéine myc-NKCC2A autant en milieu hypertonique qu'isotonique (figure 14) et que cette expression était à la membrane plasmique de l'ovocyte, conformément à la théorie, sachant que le cotransporteur NKCC2 est une protéine transmembranaire. Le signal semblait aussi plus fort en condition hypertonique.

Ensuite, la construction simple codant pour la protéine NKCC2B-flag est elle aussi bien exprimée dans les ovocytes de *Xenopus laevis*. En analyse *Western*, en milieu hypertonique, les mêmes bandes de 110 kDa et 160 kDa sont observées au panneau B de la figure 12 avec un signal plus fort lorsque la protéine est immunoprécipitée au préalable. En immunofluorescence, un signal à la membrane plasmique est observé en milieu hypertonique et en milieu isotonique (figure 15).

L'un des objectifs principaux de ce projet était de caractériser la fonction d'un hétérodimère formé par les variants A et B du cotransporteur NKCC2. Nous avons donc tenté de démontrer la dimérisation naturelle de NKCC2A et NKCC2B dans un modèle *in vitro*, celui des ovocytes de *Xenopus laevis*. Pour ce faire, nous avons coinjecté les constructions simples myc-NKCC2A et NKCC2B-flag dans ces cellules et réalisé des expériences de co-immunoprécipitation entre les protéines myc-NKCC2A et NKCC2B-flag. Le panneau A de la figure 12 montre que l'immunoprécipitation avec anti-myc suivie de la détection avec anti-flag ne présente aucun signal (n=4) et le panneau B de la figure 11 que l'immunoprécipitation avec anti-flag suivie de la détection avec anti-

myc se traduit aussi par un résultat négatif (n=4). D'après ces expériences, il semble donc que NKCC2A et NKCC2B n'auraient pas la capacité d'interagir entre eux dans l'ovocyte.

Devant ces résultats, la possibilité que l'épitope myc ou flag aurait pu devenir inaccessible à la détection dans un hétérodimère formé des variants myc-NKCC2A et NKCC2B-flag a été envisagée. À l'heure actuelle, il n'est pas possible d'éliminer cette possibilité. Une expérience qui serait utile à cet égard serait de coinjecter des constructions simples myc-NKCC2A avec NKCC2A-flag, flag-NKCC2A avec NKCC2A-myc, myc-NKCC2B avec NKCC2B-flag ou flag-NKCC2B avec NKCC2B-myc dans des ovocytes et de répéter les expériences de co-immunoprécipitation. Si les NKCC2 immunoprécipités avec l'anti-myc n'étaient pas détectables avec l'anti-flag et si les NKCC2 immunoprécipités avec l'anti-flag n'étaient pas détectables avec l'anti-myc, l'hypothèse de l'épitope caché deviendrait probable puisqu'il est connu que les NKCC sont organisés en homodimères. Cette hypothèse est d'autant plus à considérer que les images 3D du cotransporteur NKCC1 obtenues par cryomicroscopie électronique ont montré que la dimérisation du cotransporteur se produit par l'interaction entre les TM10, 11 et 12 et les extrémités C-terminales de chacune des sous-unités alors que les séquences en acides aminés entre les variants A et B de NKCC2 diffèrent entre eux dans le TM2 et la boucle intracellulaire suivante de manière exclusive. La formation d'un hétérodimère AB devrait donc être possible.

Il demeure néanmoins possible que la formation d'homodimères AA et BB soit hautement favorisée au sein de l'ovocyte, ne permettant ainsi qu'à un très petit nombre d'hétérodimères AB de se former et d'échapper alors à la détection. Si tel était le cas, il faudrait donc penser que le TM2 et la boucle intracellulaire suivante jouent un rôle clé dans la dimérisation du transporteur en forçant des associations AA ou BB strictes. Il s'agirait alors d'une fonction inédite pour l'exon 4 dans l'organisation quaternaire de NKCC2 et sans doute dans celle de plusieurs autres membres de la famille des CCC. En résumé, la détection d'interactions naturelles entre NKCC2A et NKCC2B n'est pas rapportée dans ce présent projet, mais des techniques plus fines pourront éventuellement être mises en œuvre au laboratoire pour y arriver.

Les ovocytes qui ont été coinjectés avec les constructions simples myc-NKCC2A et NKCC2B-flag ont aussi été l'objet d'expériences en immunofluorescence après avoir été soumis à des préincubations en milieu isotonique ou hypertonique. Il a été possible d'obtenir des signaux avec les anticorps anti-myc et anti-flag (figure 16), permettant de confirmer que les deux protéines sont exprimées à la surface de l'ovocyte. D'après les expériences d'immunoprécipitation, toutefois, on pourrait penser que seuls les dimères AA et BB ont été détectés sur cette figure.

1.2. Constructions doubles

Les ovocytes injectés avec les constructions doubles produisant les dimères AA, BB et AB ont aussi été soumis à des expériences de *Western blot* (après préincubation des ovocytes en milieu hypertonique) et d'immunofluorescences (après préincubation des ovocytes en milieu isotonique ou hypertonique). Les résultats de ces expériences avaient été décrits aux figures 13 et 17 à 19 et seront discutés dans la section qui suit.

Pour ce qui est des analyses de type *Western*, les deux bandes observées au panneau A de la figure 13 correspondent à la protéine NKCC2 sous ses deux formes, soit la forme non glycosylée (110 kDa) et la forme glycosylée (160 kDa). Il est intéressant d'observer que les bandes ont migré à des hauteurs de 160 et 110 kDa, et non de 320 et 220 kDa comme on devait s'attendre pour les protéines de fusion produites par les constructions doubles.

Il est probable que la présence d'une protéine homologue à la protéase USP5, protéine qui correspondrait à un orthologue endogène chez l'espèce de *Xenopus laevis* (227), ait été responsable du clivage de la protéine de fusion. Cette protéine endogène reconnaîtrait donc les sites protéolytiques LRGG présents dans la séquence du *linker* qui relie les deux variants dans l'ovocyte (figure 10), expliquant pourquoi les bandes observées à la figure 13 sont à des hauteurs de 160 et 110 kDa. Toutefois, plusieurs raisons, qui seront abordées un peu plus bas, semblent indiquer que la protéolyse réalisée par l'homologue de USP5 n'empêche pas la formation d'un hétérodimère entre NKCC2A et NKCC2B.

Après clivage des sites protéolytiques LRGG dans la séquence, on devrait obtenir dans chaque ovocyte deux séquences de NKCC2 séparées, soit : a) myc-NKCC2A avec flag-NKCC2A (construction double AA), b) myc-NKCC2B avec flag-NKCC2B (construction double BB) et c) myc-NKCC2A avec flag-NKCC2B (construction double AB). Tous les épitopes se retrouvent en N-terminal des protéines. De cette manière, il est possible d'observer les bandes caractéristiques de NKCC2A pour AA, NKCC2B pour BB et NKCC2A pour AB après immunoprécipitation avec anti-myc et détection avec anti-myc (figure 13A). Toutefois, aucune bande n'a été observée après immunoprécipitation avec flag et détection avec myc (figure 13B). Ainsi, l'expérience que nous aurions pu réaliser pour prouver l'hypothèse de l'épitope caché pourrait l'avoir été grâce aux constructions doubles en tenant compte du fait que certains ovocytes expriment myc-NKCC2A avec flag-NKCC2A ou myc-NKCC2B avec flag-NKCC2B.

Cependant, les NKCC2 immunoprécipités avec l'anti-flag n'ont pu être détectés avec l'anti-flag (résultats non montrés) alors qu'ils avaient pu l'être dans les conditions où les ovocytes avaient été coinjectés avec les constructions simples. Une seconde hypothèse est donc que la protéolyse réalisée par l'homologue de USP5 pourrait avoir endommagé l'épitope flag. En effet, le site LRGG se trouve juste en amont de la séquence de

l'épitope flag et permet le clivage après le deuxième résidu glycine, qui est à 1 résidu de l'épitope (information trouvée dans la base de données MEROPS, prise en charge par *EMBL-EBI*). Finalement, une autre possibilité est que l'épitope flag pourrait être devenu grandement inaccessible dans les homodimères AA, BB ou AB en étant localisé à la partie N-terminale plutôt que C-terminale. Des études sont en cours au laboratoire dans le but d'éloigner le site protéolytique de l'épitope flag (pour générer des protéines de fusion qui peuvent être clivées sans endommager l'épitope) et dans le but de le faire disparaître (pour générer des protéines de fusion non clivables).

Pour ce qui est des expériences d'immunofluorescences, elles ont confirmé l'expression de NKCC2 à partir des constructions doubles dans les deux milieux de préincubation (isotonique et hypertonique) puisqu'on observe un signal plasmique pour les protéines de fusion AA, BB et AB avec l'anti-myc et anti-flag (figure 17, 18 et 19, respectivement). De façon intéressante, on observe aussi un signal avec l'anti-flag, mais plus diffus et moins intense. Ces observations seraient aussi en accord avec un problème d'intégrité ou d'accessibilité de l'épitope flag. Il est aussi possible que les faibles signaux correspondent aux protéines de fusion non clivées.

2. Cinétiques de transport de NKCC2

Les constructions simples et les constructions doubles ont été soumises à des tests fonctionnels pour analyser la cinétique de transport de chacune des protéines produites à partir des constructions, et ce, à la suite de préincubations en milieu isotonique et hypertonique. Ainsi, les expériences ont été menées en incubant les ovocytes dans des solutions dont la concentration en rubidium variait de 0 à 20 mM durant l'étape de l'influx. En traçant ensuite une courbe michaelienne avec les valeurs d'influx obtenues en fonction de la concentration en rubidium dans la solution, il a été possible de calculer les $Km(Rb^+)$ et $Vmax(Rb^+)$ pour chacune des constructions testées.

2.1. Constructions simples

Pour les constructions simples, les caractéristiques des cinétiques de transport ($Km(Rb^+)$ et $Vmax(Rb^+)$) sont environ les mêmes pour les conditions NKCC2A+NKCC2A, NKCC2B+NKCC2B et NKCC2A+NKCC2B, et ce, autant en milieu isotonique (figure 20 et tableau 10) qu'en milieu hypertonique (figure 21 et tableau 10). Ces résultats sont en accord avec la théorie, puisqu'il est connu que la cinétique de transport pour le rubidium est très semblable entre les variants NKCC2A et NKCC2B (tableau 1). Ainsi, lorsque les deux variants sont coinjectés dans les mêmes ovocytes, la cinétique obtenue ne diffère pas de celles mesurées individuellement chez chacun des variants. Ces résultats suggèrent deux possibilités : 1) que A et B ne forment pas d'hétérodimères AB dans les ovocytes puisque le transport net correspond à une simple addition entre le transport généré par AA et celui généré par BB, ou 2) que si des hétérodimères AB se forment dans les ovocytes, le transport net correspond aussi à une simple addition comme si les monomères opéraient de manière

indépendante. Si les $Km(Rb^+)$ et $Vmax(Rb^+)$ pour AB avaient été différentes des $Km(Rb^+)$ et $Vmax(Rb^+)$ pour AA et BB, il aurait alors été possible de conclure que les sous-unités A et B d'un hétérodimère AB coopéraient entre elles pour former une structure fonctionnellement nouvelle. Les résultats obtenus en co-immunoprécipitation sont davantage en faveur de la première possibilité, suggérant que l'assemblage des homodimères AA et BB est favorisé par rapport à la formation d'un hétérodimère AB.

Finalement, le transport est activé par le rétrécissement cellulaire, causé par l'incubation en milieu hypertonique, que ce soit pour AA, BB ou AB. Dans chacun des cas, les $Vmax(Rb^+)$ sont effectivement deux fois plus élevées à la suite d'une préincubation en milieu hypertonique par rapport aux préincubations en milieu isotonique (comparer figures 20 et 21) alors que les $Km(Rb^+)$ demeurent inchangées. Ces résultats sont conformes aux attentes d'après les données disponibles dans la littérature.

2.2. Constructions doubles

Pour les cinétiques de transport des NKCC2 produits à partir des constructions doubles, on observe que les $Km(Rb^+)$ sont semblables parmi les conditions AA, BB et AB que ce soit en milieu isotonique (figure 22 et tableau 11) ou hypertonique (figure 23 et tableau 11). Ces résultats n'ont rien d'inattendu à la lumière des résultats qui ont été discutés jusqu'à maintenant et puisqu'il est connu que la cinétique de transport pour le rubidium est très semblable entre les variants NKCC2A et NKCC2B (tableau 1). On observe toutefois des résultats inattendus en ce qui a trait aux $Vmax(Rb^+)$ puisque l'on remarque des valeurs beaucoup plus élevées pour AB par rapport aux dimères AA et BB (figure 22, figure 23 et tableau 11). Ces différences s'inscrivent cependant dans un contexte où le transport demeure activable en milieu hypertonique (comparer figure 23 avec 22) et sensible au furosémide (voir figure 24) autant pour AA, BB que AB.

3. Contextualisation des résultats

Il a été observé un peu plus tôt que les protéines produites dans les ovocytes à la suite des injections doubles se retrouvaient à des hauteurs de 160 et 110 kDa et non à 320 et 220 kDa comme l'on pourrait s'attendre (figure 13). Cette observation a été expliquée par la présence d'un homologue de USP5 dans les ovocytes reconnaissant les sites protéolytiques dans le *linker*. Toutefois, certains résultats indiquent que les ovocytes semblent avoir été capables de former une petite quantité d'hétérodimères AB. Il se pourrait ainsi que les $Vmax(Rb^+)$ observées pour AB correspondent ici à l'activité de transport qui est réalisée par cet hétérodimère et qui s'ajoute à celle de AA et BB. Dans un tel hétérodimère, les sous-unités A et B coopéreraient donc ensemble pour former une structure aux caractéristiques cinétiques uniques. Une telle observation, soit l'apparition de nouvelles caractéristiques de transport, implique donc que la protéolyse du site LRGG par USP5 pourrait être incomplète en survenant alors qu'une fraction des hétérodimères sont déjà à la surface de l'ovocyte. De plus, de par sa localisation dans le noyau, les lysosomes et le cytoplasme, USP5 pourrait effectivement

n'avoir accès au LRGG du *linker* que lorsque NKCC2 est exprimé à la membrane plasmique (228, 229). Dans ce local cellulaire, LRGG se retrouve dans le cytosol plutôt que dans la lumière d'une vésicule, qui est l'autre site d'expression de NKCC2 (36).

Si un hétérodimère AB était recruté naturellement dans la section de la macula densa du néphron, structure dans laquelle NKCC2A et NKCC2B sont tous les deux exprimés et où ils participent à la rétroaction tubuloglomérulaire, il provoquerait (d'après nos données) une activité de transport plus importante que des homodimères AA et BB à une concentration luminale d'ions donnée. En effet, sa valeur de $V_{max}(Rb^+)$ serait plus élevée, mais sa valeur de $K_m(Rb^+)$ similaire. Il s'en suivrait un transfert plus important d'ions de la lumière vers le cytoplasme de la macula densa et une sensibilité accrue au déclenchement d'une rétroaction tubuloglomérulaire. La macula densa dispose peut-être de mécanismes qui permettent de contrôler la quantité d'hétérodimères AB formés (vs. AA et BB) et qui sont eux-mêmes sous la dépendance de certains facteurs comme le flot tubulaire, le statut volémique, le niveau d'activation du système rénine-angiotensine, etc. Nos données suggèrent aussi que malgré une tendance naturelle à l'homodimérisation, il suffirait peut-être d'une légère augmentation du nombre d'hétérodimères AB pour faire une différence importante.

NKCC2A et NKCC2B sont aussi tous deux exprimés dans la partie corticale de l'AAH qui est l'un des sites où les sels ultrafiltrés retournent dans la circulation. Dans la mesure où cette fraction de sels réabsorbés contribue au maintien du volume extracellulaire et de la pression artérielle, on pourrait aussi s'imaginer que la régulation du nombre d'hétérodimères AB par rapport aux homodimères servirait à des fins homéostatiques ou même qu'une propension innée à former trop de ces hétérodimères pourrait contribuer à l'hypertension artérielle sensible au sel. Mentionnons à cet effet que NKCC2A et NKCC2F partagent des sites d'expression le long de l'AAH médullaire et qu'ils pourraient donc eux aussi s'y assembler pour former des hétérodimères AF aux propriétés fonctionnelles uniques.

Dans ce travail, nous avons utilisé des milieux hypertoniques pour stimuler le transport $Na^+K^+Cl^-$ par les cotransporteurs NKCC2 et l'avons analysé autrement dans des conditions isotoniques. Il se pourrait que ces conditions expérimentales aient été un frein à la formation d'hétérodimères en supposant que celle-ci soit régulée par des facteurs divers. Il sera donc intéressant, à l'aide d'expériences ultérieures, de tester plusieurs conditions afin d'identifier celles qui auraient des effets hétérodimérisants. Au préalable, il faudra d'abord générer deux autres groupes de constructions à partir de celles qui sont disponibles : a) un groupe où le site LRGG est éloigné de l'épitope flag et b) un autre où le site LRGG est simplement aboli. Enfin, les rôles que joue NKCC2 dans la réabsorption du NaCl et dans l'hypertension artérielle sont certainement un sujet à étudier davantage et la démonstration de la formation d'un hétérodimère AB *in vivo* serait très pertinente à cet effet.

Conclusion

Cette étude représente un premier pas vers la démonstration de la capacité des variants A et B de NKCC2 à former des hétérodimères qui possèdent des caractéristiques cinétiques différentes des homodimères AA et BB. Toutefois, il ne semble pas que le modèle cellulaire exploité privilégie la formation de tels hétérodimères puisqu'il y aurait une tendance beaucoup plus forte pour la formation d'homodimères. Les résultats obtenus permettraient d'identifier un nouveau rôle possible pour l'exon 4 des CCC. Il avait déjà été démontré que cet exon 4, qui code pour le TM2 et une portion de la boucle intracellulaire suivante, jouait un rôle important dans le transport des ions, dans le trafic cellulaire de la protéine et dans l'expression différentielle des variants. Qu'il pourrait maintenant jouer un rôle dans l'assemblage de NKCC2 correspond certes à une observation inattendue, mais qui ouvre néanmoins une voie de recherche portant sur la régulation de la structure quaternaire des CCC. Il importe aussi de mentionner que même si la quantité d'hétérodimères formés pourraient être assez faible comparée à la quantité d'homodimères AA ou BB formés, et ce, en toutes circonstances, les $V_{max}(Rb)$ observées pour les constructions doubles AB dans notre travail étaient franchement plus élevées que pour les deux autres constructions doubles.

Le travail mené jusqu'à maintenant nécessitera toutefois beaucoup d'approfondissement. En outre, il faudra réparer ou modifier les constructions actuelles pour confirmer les résultats, identifier des conditions qui pourraient favoriser l'hétérodimérisation, mesurer l'expression des NKCC2 à la surface cellulaire avec plus de précision et étudier les interactions par des approches additionnelles comme des analyses de transfert d'énergie entre molécules fluorescentes (FRET) ou des analyses de *BioID*. Éventuellement, il sera aussi important de démontrer que l'hétérodimérisation peut aussi survenir *in vivo*. À cet égard, il apparaît probable que c'est une possibilité, puisque dans le système d'expression hétérologue des ovocytes de *Xenopus laevis*, les protéines hétérologues ont tendance à adopter le comportement qu'elles présentent normalement dans un système natif.

Les hétérodimères AB pourraient avoir d'importants rôles physiologiques, notamment dans la régulation de la rétroaction tubuloglomérulaire pour lui permettre de se dérouler avec un maximum de précision. La possibilité de former différents ratios de AA, BB et AB donnerait à la macula densa la possibilité d'agir en tant que senseur efficace à l'intérieur d'un intervalle élargi de concentration luminale de NaCl. On pourrait aussi imaginer que la possibilité de former des hétérodimères AF en quantités variables dans les segments intermédiaires du néphron procurerait ce même type de plasticité fonctionnelle pour la réabsorption du NaCl vers la circulation sanguine.

Bibliographie

1. Rabi DM, McBrien KA, Sapir-Pichhadze R, Nakhla M, Ahmed SB, Dumanski SM, et al. Hypertension Canada's 2020 Comprehensive Guidelines for the Prevention, Diagnosis, Risk Assessment, and Treatment of Hypertension in Adults and Children. *Can J Cardiol.* 2020;36(5):596-624.
2. Orlov SN, Koltsova SV, Kapilevich LV, Gusakova SV, Dulin NO. NKCC1 and NKCC2: The pathogenetic role of cation-chloride cotransporters in hypertension. *Genes Dis.* 2015;2(2):186-96.
3. Radi ZA. Kidney Pathophysiology, Toxicology, and Drug-Induced Injury in Drug Development. *Int J Toxicol.* 2019;38(3):215-27.
4. Kriz W. Structural organization of the renal medulla: comparative and functional aspects. *Am J Physiol.* 1981;241(1):R3-16.
5. Zhang SY, Mahler GJ. Modelling Renal Filtration and Reabsorption Processes in a Human Glomerulus and Proximal Tubule Microphysiological System. *Micromachines (Basel).* 2021;12(8).
6. Dalal R, Bruss ZS, Sehdev JS. Physiology, Renal Blood Flow and Filtration. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing
Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC.; 2021.
7. Bernhardt A, Häberer S, Xu J, Damerau H, Steffen J, Reichardt C, et al. High salt diet-induced proximal tubular phenotypic changes and sodium-glucose cotransporter-2 expression are coordinated by cold shock Y-box binding protein-1. *Faseb j.* 2021;35(10):e21912.
8. Greger R. Physiology of renal sodium transport. *Am J Med Sci.* 2000;319(1):51-62.
9. Dantzer WH, Layton AT, Layton HE, Pannabecker TL. Urine-concentrating mechanism in the inner medulla: function of the thin limbs of the loops of Henle. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2014;9(10):1781-9.
10. Subramanya AR, Ellison DH. Distal convoluted tubule. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2014;9(12):2147-63.
11. Cuzzo B, Padala SA, Lappin SL. Physiology, Vasopressin. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing
Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC.; 2021.
12. Burnstock G, Loesch A. Sympathetic innervation of the kidney in health and disease: Emphasis on the role of purinergic cotransmission. *Auton Neurosci.* 2017;204:4-16.
13. Chaudhuri A, Ghanim H, Arora P. Improving Residual Risk of Renal and Cardiovascular Outcomes in Diabetic Kidney Disease: Review of Pathophysiology, Mechanisms and Evidence from Recent Trials. *Diabetes Obes Metab.* 2021.
14. Schnermann J. Juxtaglomerular cell complex in the regulation of renal salt excretion. *Am J Physiol.* 1998;274(2):R263-79.
15. Schlatter E, Salomonsson M, Persson AE, Greger R. Macula densa cells sense luminal NaCl concentration via furosemide sensitive Na⁺2Cl⁻K⁺ cotransport. *Pflugers Arch.* 1989;414(3):286-90.
16. Nicolson GL. The Fluid-Mosaic Model of Membrane Structure: still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1838(6):1451-66.
17. Engel A, Fujiyoshi Y, Agre P. The importance of aquaporin water channel protein structures. *Embo j.* 2000;19(5):800-6.
18. Hruz PW, Mueckler MM. Structural analysis of the GLUT1 facilitative glucose transporter (review). *Mol Membr Biol.* 2001;18(3):183-93.
19. Jiang T, Wen PC, Trebesch N, Zhao Z, Pant S, Kapoor K, et al. Computational Dissection of Membrane Transport at a Microscopic Level. *Trends Biochem Sci.* 2020;45(3):202-16.
20. Bai X, Moraes TF, Reithmeier RAF. Structural biology of solute carrier (SLC) membrane transport proteins. *Molecular membrane biology.* 2017;34(1-2):1-32.
21. Fredriksson R, Nordström KJ, Stephansson O, Häggglund MG, Schiöth HB. The solute carrier (SLC) complement of the human genome: phylogenetic classification reveals four major families. *FEBS letters.* 2008;582(27):3811-6.

22. Hediger MA, Romero MF, Peng JB, Rolfs A, Takanaga H, Bruford EA. The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins Introduction. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 2004;447(5):465-8.
23. Yu FH, Catterall WA. The VGL-chanome: a protein superfamily specialized for electrical signaling and ionic homeostasis. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*. 2004;2004(253):re15.
24. Nilius B, Owsianik G. The transient receptor potential family of ion channels. *Genome biology*. 2011;12(3):218.
25. Ishibashi K, Morishita Y, Tanaka Y. The Evolutionary Aspects of Aquaporin Family. *Advances in experimental medicine and biology*. 2017;969:35-50.
26. Liu X. ABC Family Transporters. *Advances in experimental medicine and biology*. 2019;1141:13-100.
27. Dunbar LA, Caplan MJ. Ion pumps in polarized cells: sorting and regulation of the Na⁺, K⁺- and H⁺, K⁺-ATPases. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(32):29617-20.
28. César-Razquin A, Snijder B, Frappier-Brinton T, Isserlin R, Gyimesi G, Bai X, et al. A Call for Systematic Research on Solute Carriers. *Cell*. 2015;162(3):478-87.
29. Russell JM. Sodium-potassium-chloride cotransport. *Physiological reviews*. 2000;80(1):211-76.
30. Mount DB, Delpire E, Gamba G, Hall AE, Poch E, Hoover RS, et al. The electroneutral cation-chloride cotransporters. *J Exp Biol*. 1998;201(Pt 14):2091-102.
31. Geck P, Pietrzyk C, Burckhardt BC, Pfeiffer B, Heinz E. Electrically silent cotransport on Na⁺, K⁺ and Cl⁻ in Ehrlich cells. *Biochimica et biophysica acta*. 1980;600(2):432-47.
32. Haas M, Forbush B, 3rd. The Na-K-Cl cotransporters. *Journal of bioenergetics and biomembranes*. 1998;30(2):161-72.
33. Gagnon E, Bergeron MJ, Brunet GM, Daigle ND, Simard CF, Isenring P. Molecular mechanisms of Cl⁻ transport by the renal Na⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾-Cl⁻ cotransporter. Identification of an intracellular locus that may form part of a high affinity Cl⁽⁻⁾-binding site. *J Biol Chem*. 2004;279(7):5648-54.
34. Caron L, Rousseau F, Gagnon E, Isenring P. Cloning and functional characterization of a cation-Cl⁻ cotransporter-interacting protein. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(41):32027-36.
35. Daigle ND, Carpentier GA, Frenette-Cotton R, Simard MG, Lefoll MH, Noel M, et al. Molecular characterization of a human cation-Cl⁻ cotransporter (SLC12A8A, CCC9A) that promotes polyamine and amino acid transport. *Journal of cellular physiology*. 2009;220(3):680-9.
36. Marcoux AA, Slimani S, Tremblay LE, Frenette-Cotton R, Garneau AP, Isenring P. Endocytic recycling of Na⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾-Cl⁽⁻⁾ cotransporter type 2: importance of exon 4. *J Physiol*. 2019;597(16):4263-76.
37. Moore-Hoon ML, Turner RJ. Molecular characterization of the cation-chloride cotransporter family. *European journal of morphology*. 1998;36 Suppl:137-41.
38. Henderson SW, Wege S, Gilliam M. Plant Cation-Chloride Cotransporters (CCC): Evolutionary Origins and Functional Insights. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(2).
39. Moore-Hoon ML, Turner RJ. The structural unit of the secretory Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter (NKCC1) is a homodimer. *Biochemistry*. 2000;39(13):3718-24.
40. Marcoux AA, Tremblay LE, Slimani S, Fiola MJ, Mac-Way F, Garneau AP, et al. Molecular characteristics and physiological roles of Na⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾-Cl⁽⁻⁾ cotransporter 2. *Journal of cellular physiology*. 2021;236(3):1712-29.
41. Delpire E, Rauchman MI, Beier DR, Hebert SC, Gullans SR. Molecular cloning and chromosome localization of a putative basolateral Na⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾-2Cl⁻ cotransporter from mouse inner medullary collecting duct (mIMCD-3) cells. *J Biol Chem*. 1994;269(41):25677-83.
42. Payne JA, Xu JC, Haas M, Lytle CY, Ward D, Forbush B, 3rd. Primary structure, functional expression, and chromosomal localization of the bumetanide-sensitive Na-K-Cl cotransporter in human colon. *J Biol Chem*. 1995;270(30):17977-85.
43. Xu JC, Lytle C, Zhu TT, Payne JA, Benz E, Jr., Forbush B, 3rd. Molecular cloning and functional expression of the bumetanide-sensitive Na-K-Cl cotransporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994;91(6):2201-5.
44. Payne JA, Forbush B, 3rd. Alternatively spliced isoforms of the putative renal Na-K-Cl cotransporter are differentially distributed within the rabbit kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(10):4544-8.

45. Igarashi P, Vanden Heuvel GB, Payne JA, Forbush B, 3rd. Cloning, embryonic expression, and alternative splicing of a murine kidney-specific Na-K-Cl cotransporter. *Am J Physiol.* 1995;269(3 Pt 2):F405-18.
46. Greger R. Ion transport mechanisms in thick ascending limb of Henle's loop of mammalian nephron. *Physiol Rev.* 1985;65(3):760-97.
47. Gamba G, Miyanoshita A, Lombardi M, Lytton J, Lee WS, Hediger MA, et al. Molecular cloning, primary structure, and characterization of two members of the mammalian electroneutral sodium-(potassium)-chloride cotransporter family expressed in kidney. *J Biol Chem.* 1994;269(26):17713-22.
48. Mount DB, Baekgaard A, Hall AE, Plata C, Xu J, Beier DR, et al. Isoforms of the Na-K-2Cl cotransporter in murine TAL I. Molecular characterization and intrarenal localization. *Am J Physiol.* 1999;276(3):F347-58.
49. Haas M, Forbush B, 3rd. The Na-K-Cl cotransporter of secretory epithelia. *Annual review of physiology.* 2000;62:515-34.
50. Hall AC, Ellory JC. Measurement and stoichiometry of bumetanide-sensitive (2Na:1K:3Cl) cotransport in ferret red cells. *The Journal of membrane biology.* 1985;85(3):205-13.
51. Russell JM. Cation-coupled chloride influx in squid axon. Role of potassium and stoichiometry of the transport process. *The Journal of general physiology.* 1983;81(6):909-25.
52. Hoffmann EK, Dunham PB. Membrane mechanisms and intracellular signalling in cell volume regulation. *Int Rev Cytol.* 1995;161:173-262.
53. Duhm J. Furosemide-sensitive K⁺ (Rb⁺) transport in human erythrocytes: modes of operation, dependence on extracellular and intracellular Na⁺, kinetics, pH dependency and the effect of cell volume and N-ethylmaleimide. *The Journal of membrane biology.* 1987;98(1):15-32.
54. Lytle C, Xu JC, Biemesderfer D, Forbush B, 3rd. Distribution and diversity of Na-K-Cl cotransport proteins: a study with monoclonal antibodies. *Am J Physiol.* 1995;269(6 Pt 1):C1496-505.
55. Randall J, Thorne T, Delpire E. Partial cloning and characterization of Slc12a2: the gene encoding the secretory Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter. *Am J Physiol.* 1997;273(4):C1267-77.
56. Vibat CR, Holland MJ, Kang JJ, Putney LK, O'Donnell ME. Quantitation of Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransport splice variants in human tissues using kinetic polymerase chain reaction. *Anal Biochem.* 2001;298(2):218-30.
57. Flagella M, Clarke LL, Miller ML, Erway LC, Giannella RA, Andringa A, et al. Mice lacking the basolateral Na-K-2Cl cotransporter have impaired epithelial chloride secretion and are profoundly deaf. *J Biol Chem.* 1999;274(38):26946-55.
58. Delpire E, Gagnon KB. Na⁽⁺⁾ -K⁽⁺⁾ -2Cl⁽⁻⁾ Cotransporter (NKCC) Physiological Function in Nonpolarized Cells and Transporting Epithelia. *Comprehensive Physiology.* 2018;8(2):871-901.
59. Greger R, Schlatter E, Wang F, Forrest JN, Jr. Mechanism of NaCl secretion in rectal gland tubules of spiny dogfish (*Squalus acanthias*). III. Effects of stimulation of secretion by cyclic AMP. *Pflugers Archiv : European journal of physiology.* 1984;402(4):376-84.
60. Jakab RL, Collaco AM, Ameen NA. Physiological relevance of cell-specific distribution patterns of CFTR, NKCC1, NBCe1, and NHE3 along the crypt-villus axis in the intestine. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology.* 2011;300(1):G82-98.
61. O'Mahony F, Toumi F, Mroz MS, Ferguson G, Keely SJ. Induction of Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter expression mediates chronic potentiation of intestinal epithelial Cl⁻ secretion by EGF. *American journal of physiology Cell physiology.* 2008;294(6):C1362-70.
62. Grubb BR, Pace AJ, Lee E, Koller BH, Boucher RC. Alterations in airway ion transport in NKCC1-deficient mice. *American journal of physiology Cell physiology.* 2001;281(2):C615-23.
63. Evans RL, Park K, Turner RJ, Watson GE, Nguyen HV, Dennett MR, et al. Severe impairment of salivation in Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter (NKCC1)-deficient mice. *The Journal of biological chemistry.* 2000;275(35):26720-6.
64. Vizvári E, Katona M, Orvos P, Berczeli O, Facskó A, Rárosi F, et al. Characterization of Na⁺-K⁺-2Cl⁻ Cotransporter Activity in Rabbit Lacrimal Gland Duct Cells. *Investigative ophthalmology & visual science.* 2016;57(8):3828-35.
65. Seidler U, Rottinghaus I, Hillesheim J, Chen M, Riederer B, Krabbenhöft A, et al. Sodium and chloride absorptive defects in the small intestine in Slc26a6 null mice. *Pflugers Archiv : European journal of physiology.* 2008;455(4):757-66.

66. Haering C, Kanageswaran N, Bouvain P, Scholz P, Altmüller J, Becker C, et al. Ion transporter NKCC1, modulator of neurogenesis in murine olfactory neurons. *The Journal of biological chemistry*. 2015;290(15):9767-79.
67. Delpire E, Lu J, England R, Dull C, Thorne T. Deafness and imbalance associated with inactivation of the secretory Na-K-2Cl co-transporter. *Nat Genet*. 1999;22(2):192-5.
68. Pace AJ, Madden VJ, Henson OW, Jr., Koller BH, Henson MM. Ultrastructure of the inner ear of NKCC1-deficient mice. *Hearing research*. 2001;156(1-2):17-30.
69. Giménez I, Forbush B. Regulatory phosphorylation sites in the NH2 terminus of the renal Na-K-Cl cotransporter (NKCC2). *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005;289(6):F1341-5.
70. Gagnon KB, England R, Delpire E. A single binding motif is required for SPAK activation of the Na-K-2Cl cotransporter. *Cell Physiol Biochem*. 2007;20(1-4):131-42.
71. Gagnon KB, England R, Delpire E. Volume sensitivity of cation-Cl⁻ cotransporters is modulated by the interaction of two kinases: Ste20-related proline-alanine-rich kinase and WNK4. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006;290(1):C134-42.
72. Gagnon KB, England R, Delpire E. Characterization of SPAK and OSR1, regulatory kinases of the Na-K-2Cl cotransporter. *Mol Cell Biol*. 2006;26(2):689-98.
73. Gagnon KB, Delpire E. Multiple pathways for protein phosphatase 1 (PP1) regulation of Na-K-2Cl cotransporter (NKCC1) function: the N-terminal tail of the Na-K-2Cl cotransporter serves as a regulatory scaffold for Ste20-related proline/alanine-rich kinase (SPAK) AND PP1. *J Biol Chem*. 2010;285(19):14115-21.
74. Lytle C, Forbush B, 3rd. The Na-K-Cl cotransport protein of shark rectal gland. II. Regulation by direct phosphorylation. *J Biol Chem*. 1992;267(35):25438-43.
75. Lytle C, Forbush B, 3rd. Regulatory phosphorylation of the secretory Na-K-Cl cotransporter: modulation by cytoplasmic Cl⁻. *Am J Physiol*. 1996;270(2 Pt 1):C437-48.
76. Merner ND, Mercado A, Khanna AR, Hodgkinson A, Bruat V, Awadalla P, et al. Gain-of-function missense variant in SLC12A2, encoding the bumetanide-sensitive NKCC1 cotransporter, identified in human schizophrenia. *J Psychiatr Res*. 2016;77:22-6.
77. Delpire E, Wolfe L, Flores B, Koumangoye R, Schornak CC, Omer S, et al. A patient with multisystem dysfunction carries a truncation mutation in human SLC12A2, the gene encoding the Na-K-2Cl cotransporter, NKCC1. *Cold Spring Harb Mol Case Stud*. 2016;2(6):a001289.
78. Dixon MJ, Gazzard J, Chaudhry SS, Sampson N, Schulte BA, Steel KP. Mutation of the Na-K-Cl cotransporter gene *Slc12a2* results in deafness in mice. *Hum Mol Genet*. 1999;8(8):1579-84.
79. Pace AJ, Lee E, Athirakul K, Coffman TM, O'Brien DA, Koller BH. Failure of spermatogenesis in mouse lines deficient in the Na(+)-K(+)-2Cl(-) cotransporter. *J Clin Invest*. 2000;105(4):441-50.
80. Kahle KT, Staley KJ, Nahed BV, Gamba G, Hebert SC, Lifton RP, et al. Roles of the cation-chloride cotransporters in neurological disease. *Nature clinical practice Neurology*. 2008;4(9):490-503.
81. Kelly L, Almutairi MM, Kursan S, Pacheco R, Dias-Junior E, Castrop H, et al. Impaired glucose tolerance, glucagon, and insulin responses in mice lacking the loop diuretic-sensitive *Nkcc2a* transporter. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2019;317(4):C843-c56.
82. Alshahrani S, Alvarez-Leefmans FJ, Di Fulvio M. Expression of the *Slc12a1* gene in pancreatic β -cells: molecular characterization and in silico analysis. *Cell Physiol Biochem*. 2012;30(1):95-112.
83. Xue H, Liu S, Ji T, Ren W, Zhang XH, Zheng LF, et al. Expression of NKCC2 in the rat gastrointestinal tract. *Neurogastroenterol Motil*. 2009;21(10):1068-e89.
84. Friedman PA, Hebert SC. Diluting segment in kidney of dogfish shark. I. Localization and characterization of chloride absorption. *Am J Physiol*. 1990;258(2 Pt 2):R398-408.
85. Lapointe JY, Bell PD, Cardinal J. Direct evidence for apical Na⁺:2Cl⁻:K⁺ cotransport in macula densa cells. *Am J Physiol*. 1990;258(5 Pt 2):F1466-9.
86. Obermüller N, Kunchaparty S, Ellison DH, Bachmann S. Expression of the Na-K-2Cl cotransporter by macula densa and thick ascending limb cells of rat and rabbit nephron. *J Clin Invest*. 1996;98(3):635-40.
87. Kaplan MR, Plotkin MD, Lee WS, Xu ZC, Lytton J, Hebert SC. Apical localization of the Na-K-Cl cotransporter, rBSC1, on rat thick ascending limbs. *Kidney Int*. 1996;49(1):40-7.

88. Simon DB, Karet FE, Hamdan JM, DiPietro A, Sanjad SA, Lifton RP. Bartter's syndrome, hypokalaemic alkalosis with hypercalciuria, is caused by mutations in the Na-K-2Cl cotransporter NKCC2. *Nat Genet.* 1996;13(2):183-8.
89. Haas M, Forbush B, 3rd. Photolabeling of a 150-kDa (Na + K + Cl) cotransport protein from dog kidney with a bumetanide analogue. *Am J Physiol.* 1987;253(2 Pt 1):C243-52.
90. Markadieu N, Delpire E. Physiology and pathophysiology of SLC12A1/2 transporters. *Pflugers Arch.* 2014;466(1):91-105.
91. Brunet GM, Gagnon E, Simard CF, Daigle ND, Caron L, Noel M, et al. Novel insights regarding the operational characteristics and teleological purpose of the renal Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransporter (NKCC2s) splice variants. *The Journal of general physiology.* 2005;126(4):325-37.
92. Gagnon E, Forbush B, Flemmer AW, Giménez I, Caron L, Isenring P. Functional and molecular characterization of the shark renal Na-K-Cl cotransporter: novel aspects. *American journal of physiology Renal physiology.* 2002;283(5):F1046-55.
93. Yang T, Huang YG, Singh I, Schnermann J, Briggs JP. Localization of bumetanide- and thiazide-sensitive Na-K-Cl cotransporters along the rat nephron. *Am J Physiol.* 1996;271(4 Pt 2):F931-9.
94. Castrop H, Schnermann J. Isoforms of renal Na-K-2Cl cotransporter NKCC2: expression and functional significance. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008;295(4):F859-66.
95. Greger R, Schlatter E. Presence of luminal K⁺, a prerequisite for active NaCl transport in the cortical thick ascending limb of Henle's loop of rabbit kidney. *Pflugers Arch.* 1981;392(1):92-4.
96. Ho K, Nichols CG, Lederer WJ, Lytton J, Vassilev PM, Kanazirska MV, et al. Cloning and expression of an inwardly rectifying ATP-regulated potassium channel. *Nature.* 1993;362(6415):31-8.
97. Greger R, Bleich M, Schlatter E. Ion channels in the thick ascending limb of Henle's loop. *Ren Physiol Biochem.* 1990;13(1-2):37-50.
98. Gimenez I, Isenring P, Forbush B. Spatially distributed alternative splice variants of the renal Na-K-Cl cotransporter exhibit dramatically different affinities for the transported ions. *J Biol Chem.* 2002;277(11):8767-70.
99. Marcoux AA, Slimani S, Tremblay LE, Frenette-Cotton R, Garneau AP, Isenring P. Regulation of Na⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾-Cl⁽⁻⁾ cotransporter type 2 by the with no lysine kinase-dependent signaling pathway. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2019;317(1):C20-c30.
100. Plata C, Meade P, Vazquez N, Hebert SC, Gamba G. Functional properties of the apical Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter isoforms. *J Biol Chem.* 2002;277(13):11004-12.
101. Carota I, Theilig F, Oppermann M, Kongsuphol P, Rosenauer A, Schreiber R, et al. Localization and functional characterization of the human NKCC2 isoforms. *Acta Physiol (Oxf).* 2010;199(3):327-38.
102. Gagnon E, Forbush B, Caron L, Isenring P. Functional comparison of renal Na-K-Cl cotransporters between distant species. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2003;284(2):C365-70.
103. Giménez I, Forbush B. The residues determining differences in ion affinities among the alternative splice variants F, A, and B of the mammalian renal Na-K-Cl cotransporter (NKCC2). *J Biol Chem.* 2007;282(9):6540-7.
104. Gagnon E, Bergeron MJ, Daigle ND, Lefoll MH, Isenring P. Molecular mechanisms of cation transport by the renal Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransporter: structural insight into the operating characteristics of the ion transport sites. *J Biol Chem.* 2005;280(37):32555-63.
105. Isenring P, Forbush B, 3rd. Ion and bumetanide binding by the Na-K-Cl cotransporter. Importance of transmembrane domains. *J Biol Chem.* 1997;272(39):24556-62.
106. González E, Salomonsson M, Müller-Suur C, Persson AE. Measurements of macula densa cell volume changes in isolated and perfused rabbit cortical thick ascending limb. I. Isosmotic and anisosmotic cell volume changes. *Acta Physiol Scand.* 1988;133(2):149-57.
107. Hanner F, Chambrey R, Bourgeois S, Meer E, Mucsi I, Rosivall L, et al. Increased renal renin content in mice lacking the Na⁺/H⁺ exchanger NHE2. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008;294(4):F937-44.
108. Komlosi P, Fintha A, Bell PD. Unraveling the relationship between macula densa cell volume and luminal solute concentration/osmolality. *Kidney Int.* 2006;70(5):865-71.

109. Ares GR, Caceres PS, Ortiz PA. Molecular regulation of NKCC2 in the thick ascending limb. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2011;301(6):F1143-59.
110. Bergeron MJ, Gagnon E, Wallendorff B, Lapointe JY, Isenring P. Ammonium transport and pH regulation by K(+)-Cl(-) cotransporters. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003;285(1):F68-78.
111. Bleich M, Kötting M, Schlatter E, Greger R. Effect of NH₄⁺/NH₃ on cytosolic pH and the K⁺ channels of freshly isolated cells from the thick ascending limb of Henle's loop. *Pflugers Arch*. 1995;429(3):345-54.
112. Weiner ID, Verlander JW. Role of NH₃ and NH₄⁺ transporters in renal acid-base transport. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2011;300(1):F11-23.
113. Darman RB, Forbush B. A regulatory locus of phosphorylation in the N terminus of the Na-K-Cl cotransporter, NKCC1. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(40):37542-50.
114. Richardson C, Alessi DR. The regulation of salt transport and blood pressure by the WNK-SPAK/OSR1 signalling pathway. *J Cell Sci*. 2008;121(Pt 20):3293-304.
115. Alessi DR, Zhang J, Khanna A, Hochdörfer T, Shang Y, Kahle KT. The WNK-SPAK/OSR1 pathway: master regulator of cation-chloride cotransporters. *Sci Signal*. 2014;7(334):re3.
116. Zhang J, Siew K, Macartney T, O'Shaughnessy KM, Alessi DR. Critical role of the SPAK protein kinase CCT domain in controlling blood pressure. *Hum Mol Genet*. 2015;24(16):4545-58.
117. Ponce-Coria J, San-Cristobal P, Kahle KT, Vazquez N, Pacheco-Alvarez D, de Los Heros P, et al. Regulation of NKCC2 by a chloride-sensing mechanism involving the WNK3 and SPAK kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(24):8458-63.
118. Rinehart J, Kahle KT, de Los Heros P, Vazquez N, Meade P, Wilson FH, et al. WNK3 kinase is a positive regulator of NKCC2 and NCC, renal cation-Cl⁻ cotransporters required for normal blood pressure homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(46):16777-82.
119. Cheng CJ, Truong T, Baum M, Huang CL. Kidney-specific WNK1 inhibits sodium reabsorption in the cortical thick ascending limb. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2012;303(5):F667-73.
120. Loureiro CA, Barros P, Matos P, Jordan P. Tyrosine phosphorylation modulates cell surface expression of chloride cotransporters NKCC2 and KCC3. *Arch Biochem Biophys*. 2019;669:61-70.
121. Fraser SA, Gimenez I, Cook N, Jennings I, Katerelos M, Katsis F, et al. Regulation of the renal-specific Na⁺-K⁺-2Cl⁻ co-transporter NKCC2 by AMP-activated protein kinase (AMPK). *Biochem J*. 2007;405(1):85-93.
122. Gunaratne R, Braucht DW, Rinschen MM, Chou CL, Hoffert JD, Pisitkun T, et al. Quantitative phosphoproteomic analysis reveals cAMP/vasopressin-dependent signaling pathways in native renal thick ascending limb cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(35):15653-8.
123. Caceres PS, Ares GR, Ortiz PA. cAMP stimulates apical exocytosis of the renal Na(+)-K(+)-2Cl(-) cotransporter NKCC2 in the thick ascending limb: role of protein kinase A. *J Biol Chem*. 2009;284(37):24965-71.
124. Hong NJ, Garvin JL. Angiotensin II type 2 receptor-mediated inhibition of NaCl absorption is blunted in thick ascending limbs from Dahl salt-sensitive rats. *Hypertension*. 2012;60(3):765-9.
125. Dublineau I, Pradelles P, de Rouffignac C, Elalouf JM. Differential short-term desensitization to vasopressin, isoproterenol, glucagon, parathyroid hormone and calcitonin in the thick ascending limb of rat kidney. *Pflugers Arch*. 1992;420(1):16-22.
126. Cabral PD, Silva GB, Baigorria ST, Juncos LA, Juncos LI, Garcia NH. 8-iso-prostaglandin-F_{2α} stimulates chloride transport in thick ascending limbs: role of cAMP and protein kinase A. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010;299(6):F1396-400.
127. Procino G, Carmosino M, Milano S, Dal Monte M, Schena G, Mastrodonato M, et al. β₃ adrenergic receptor in the kidney may be a new player in sympathetic regulation of renal function. *Kidney Int*. 2016;90(3):555-67.
128. Turban S, Wang XY, Knepper MA. Regulation of NHE3, NKCC2, and NCC abundance in kidney during aldosterone escape phenomenon: role of NO. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003;285(5):F843-51.
129. Bailly C. Effect of luminal atrial natriuretic peptide on chloride reabsorption in mouse cortical thick ascending limb: inhibition by endothelin. *J Am Soc Nephrol*. 2000;11(10):1791-7.
130. de Jesus Ferreira MC, Bailly C. Luminal and basolateral endothelin inhibit chloride reabsorption in the mouse thick ascending limb via a Ca²⁺-independent pathway. *J Physiol*. 1997;505 (Pt 3)(Pt 3):749-58.

131. Herrera M, Hong NJ, Ortiz PA, Garvin JL. Endothelin-1 inhibits thick ascending limb transport via Akt-stimulated nitric oxide production. *J Biol Chem.* 2009;284(3):1454-60.
132. Neant F, Bailly C. Luminal and intracellular cGMP inhibit the mTAL reabsorptive capacity through different pathways. *Kidney Int.* 1993;44(4):741-6.
133. Hannemann A, Flatman PW. Phosphorylation and transport in the Na-K-2Cl cotransporters, NKCC1 and NKCC2A, compared in HEK-293 cells. *PLoS one.* 2011;6(3):e17992.
134. Richardson C, Sakamoto K, de los Heros P, Deak M, Campbell DG, Prescott AR, et al. Regulation of the NKCC2 ion cotransporter by SPAK-OSR1-dependent and -independent pathways. *Journal of cell science.* 2011;124(Pt 5):789-800.
135. Eveloff JL, Calamia J. Effect of osmolarity on cation fluxes in medullary thick ascending limb cells. *The American journal of physiology.* 1986;250(1 Pt 2):F176-80.
136. Haas M. Properties and diversity of (Na-K-Cl) cotransporters. *Annu Rev Physiol.* 1989;51:443-57.
137. Han Y, Zhao X, Wang S, Wang C, Tian D, Lang Y, et al. Eleven novel SLC12A1 variants and an exonic mutation cause exon skipping in Bartter syndrome type I. *Endocrine.* 2019;64(3):708-18.
138. Starremans PG, Kersten FF, Knoers NV, van den Heuvel LP, Bindels RJ. Mutations in the human Na-K-2Cl cotransporter (NKCC2) identified in Bartter syndrome type I consistently result in nonfunctional transporters. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14(6):1419-26.
139. Pressler CA, Heinzinger J, Jeck N, Waldegger P, Pechmann U, Reinalter S, et al. Late-onset manifestation of antenatal Bartter syndrome as a result of residual function of the mutated renal Na⁺-K⁺-2Cl⁻-co-transporter. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17(8):2136-42.
140. Acuña R, Martínez-de-la-Maza L, Ponce-Coria J, Vázquez N, Ortal-Vite P, Pacheco-Alvarez D, et al. Rare mutations in SLC12A1 and SLC12A3 protect against hypertension by reducing the activity of renal salt cotransporters. *J Hypertens.* 2011;29(3):475-83.
141. Herrera VL, Lopez LV, Ruiz-Opazo N. Alpha1 Na,K-ATPase and Na,K,2Cl-cotransporte/D3mit3 loci interact to increase susceptibility to salt-sensitive hypertension in Dahl S(HSD) rats. *Mol Med.* 2001;7(2):125-34.
142. Ares GR, Haque MZ, Delpire E, Ortiz PA. Hyperphosphorylation of Na-K-2Cl cotransporter in thick ascending limbs of Dahl salt-sensitive rats. *Hypertension.* 2012;60(6):1464-70.
143. Alvarez-Guerra M, Garay RP. Renal Na-K-Cl cotransporter NKCC2 in Dahl salt-sensitive rats. *J Hypertens.* 2002;20(4):721-7.
144. Hoagland KM, Flasch AK, Dahly-Vernon AJ, dos Santos EA, Knepper MA, Roman RJ. Elevated BSC-1 and ROMK expression in Dahl salt-sensitive rat kidneys. *Hypertension.* 2004;43(4):860-5.
145. Sonalker PA, Tofovic SP, Jackson EK. Cellular distribution of the renal bumetanide-sensitive Na-K-2Cl cotransporter BSC-1 in the inner stripe of the outer medulla during the development of hypertension in the spontaneously hypertensive rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2007;34(12):1307-12.
146. Sonalker PA, Tofovic SP, Jackson EK. Increased expression of the sodium transporter BSC-1 in spontaneously hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004;311(3):1052-61.
147. Gamba G, Saltzberg SN, Lombardi M, Miyanoshita A, Lytton J, Hediger MA, et al. Primary structure and functional expression of a cDNA encoding the thiazide-sensitive, electroneutral sodium-chloride cotransporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1993;90(7):2749-53.
148. Tutakhel OA, Jeleń S, Valdez-Flores M, Dimke H, Piersma SR, Jimenez CR, et al. Alternative splice variant of the thiazide-sensitive NaCl cotransporter: a novel player in renal salt handling. *American journal of physiology Renal physiology.* 2016;310(3):F204-16.
149. Mastroianni N, De Fusco M, Zollo M, Arrigo G, Zuffardi O, Bettinelli A, et al. Molecular cloning, expression pattern, and chromosomal localization of the human Na-Cl thiazide-sensitive cotransporter (SLC12A3). *Genomics.* 1996;35(3):486-93.
150. Ellison DH, Velázquez H, Wright FS. Thiazide-sensitive sodium chloride cotransport in early distal tubule. *The American journal of physiology.* 1987;253(3 Pt 2):F546-54.
151. Verouti SN, Boscardin E, Hummler E, Frateschi S. Regulation of blood pressure and renal function by NCC and ENaC: lessons from genetically engineered mice. *Curr Opin Pharmacol.* 2015;21:60-72.

152. Cutler JA, Davis BR. Thiazide-type diuretics and beta-adrenergic blockers as first-line drug treatments for hypertension. *Circulation*. 2008;117(20):2691-704; discussion 705.
153. Wright JM, Lee CH, Chambers GK. Systematic review of antihypertensive therapies: does the evidence assist in choosing a first-line drug? *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne*. 1999;161(1):25-32.
154. Wardak H, Tutakhel OAZ, Van Der Wijst J. Role of the alternative splice variant of NCC in blood pressure control. *Channels (Austin, Tex)*. 2018;12(1):346-55.
155. Valdez-Flores MA, Vargas-Poussou R, Verkaart S, Tutakhel OA, Valdez-Ortiz A, Blanchard A, et al. Functionomics of NCC mutations in Gitelman syndrome using a novel mammalian cell-based activity assay. *American journal of physiology Renal physiology*. 2016;311(6):F1159-f67.
156. Vargas-Poussou R, Dahan K, Kahila D, Venisse A, Riveira-Munoz E, Debaix H, et al. Spectrum of mutations in Gitelman syndrome. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2011;22(4):693-703.
157. Urbanová M, Reiterová J, Stěkrová J, Lněnička P, Ryšavá R. DNA analysis of renal electrolyte transporter genes among patients suffering from Bartter and Gitelman syndromes: summary of mutation screening. *Folia biologica*. 2011;57(2):65-73.
158. Gitelman HJ, Graham JB, Welt LG. A new familial disorder characterized by hypokalemia and hypomagnesemia. *Transactions of the Association of American Physicians*. 1966;79:221-35.
159. Simon DB, Nelson-Williams C, Bia MJ, Ellison D, Karet FE, Molina AM, et al. Gitelman's variant of Bartter's syndrome, inherited hypokalaemic alkalosis, is caused by mutations in the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter. *Nature genetics*. 1996;12(1):24-30.
160. Nicolet-Barousse L, Blanchard A, Roux C, Pietri L, Bloch-Faure M, Kolta S, et al. Inactivation of the Na-Cl co-transporter (NCC) gene is associated with high BMD through both renal and bone mechanisms: analysis of patients with Gitelman syndrome and Ncc null mice. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2005;20(5):799-808.
161. Wilson FH, Kahle KT, Sabath E, Lalioti MD, Rapson AK, Hoover RS, et al. Molecular pathogenesis of inherited hypertension with hyperkalemia: the Na-Cl cotransporter is inhibited by wild-type but not mutant WNK4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(2):680-4.
162. Kregenow FM. The response of duck erythrocytes to nonhemolytic hypotonic media. Evidence for a volume-controlling mechanism. *The Journal of general physiology*. 1971;58(4):372-95.
163. Lauf PK, Theg BE. A chloride dependent K⁺ flux induced by N-ethylmaleimide in genetically low K⁺ sheep and goat erythrocytes. *Biochemical and biophysical research communications*. 1980;92(4):1422-8.
164. Dunham PB, Stewart GW, Ellory JC. Chloride-activated passive potassium transport in human erythrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1980;77(3):1711-5.
165. Jennings ML, Adame MF. Direct estimate of 1:1 stoichiometry of K⁽⁺⁾-Cl⁽⁻⁾ cotransport in rabbit erythrocytes. *American journal of physiology Cell physiology*. 2001;281(3):C825-32.
166. Tanis JE, Bellemer A, Moresco JJ, Forbush B, Koelle MR. The potassium chloride cotransporter KCC-2 coordinates development of inhibitory neurotransmission and synapse structure in *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2009;29(32):9943-54.
167. Payne JA. Functional characterization of the neuronal-specific K-Cl cotransporter: implications for [K⁺]_o regulation. *The American journal of physiology*. 1997;273(5):C1516-25.
168. Mercado A, Song L, Vazquez N, Mount DB, Gamba G. Functional comparison of the K⁺-Cl⁻ cotransporters KCC1 and KCC4. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(39):30326-34.
169. Song L, Mercado A, Vázquez N, Xie Q, Desai R, George AL, Jr., et al. Molecular, functional, and genomic characterization of human KCC2, the neuronal K-Cl cotransporter. *Brain research Molecular brain research*. 2002;103(1-2):91-105.
170. Gillen CM, Brill S, Payne JA, Forbush B, 3rd. Molecular cloning and functional expression of the K-Cl cotransporter from rabbit, rat, and human. A new member of the cation-chloride cotransporter family. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(27):16237-44.
171. Payne JA, Stevenson TJ, Donaldson LF. Molecular characterization of a putative K-Cl cotransporter in rat brain. A neuronal-specific isoform. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(27):16245-52.

172. Hiki K, D'Andrea RJ, Furze J, Crawford J, Woollatt E, Sutherland GR, et al. Cloning, characterization, and chromosomal location of a novel human K⁺-Cl⁻ cotransporter. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(15):10661-7.
173. Mount DB, Mercado A, Song L, Xu J, George AL, Jr., Delpire E, et al. Cloning and characterization of KCC3 and KCC4, new members of the cation-chloride cotransporter gene family. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(23):16355-62.
174. Race JE, Makhoul FN, Logue PJ, Wilson FH, Dunham PB, Holtzman EJ. Molecular cloning and functional characterization of KCC3, a new K-Cl cotransporter. *The American journal of physiology*. 1999;277(6):C1210-9.
175. Garneau AP, Marcoux AA, Slimani S, Tremblay LE, Frenette-Cotton R, Mac-Way F, et al. Physiological roles and molecular mechanisms of K(+) -Cl(-) cotransport in the mammalian kidney and cardiovascular system: where are we? *The Journal of physiology*. 2019;597(6):1451-65.
176. Melo Z, Cruz-Rangel S, Bautista R, Vázquez N, Castañeda-Bueno M, Mount DB, et al. Molecular evidence for a role for K(+) -Cl(-) cotransporters in the kidney. *American journal of physiology Renal physiology*. 2013;305(10):F1402-11.
177. Marcoux AA, Garneau AP, Frenette-Cotton R, Slimani S, Mac-Way F, Isenring P. Molecular features and physiological roles of K(+)-Cl(-) cotransporter 4 (KCC4). *Biochimica et biophysica acta General subjects*. 2017;1861(12):3154-66.
178. Liapis H, Nag M, Kaji DM. K-Cl cotransporter expression in the human kidney. *The American journal of physiology*. 1998;275(6):C1432-7.
179. Boettger T, Rust MB, Maier H, Seidenbecher T, Schweizer M, Keating DJ, et al. Loss of K-Cl cotransporter KCC3 causes deafness, neurodegeneration and reduced seizure threshold. *The EMBO journal*. 2003;22(20):5422-34.
180. Mercado A, Vázquez N, Song L, Cortés R, Enck AH, Welch R, et al. NH₂-terminal heterogeneity in the KCC3 K⁺-Cl⁻ cotransporter. *American journal of physiology Renal physiology*. 2005;289(6):F1246-61.
181. Boettger T, Hübner CA, Maier H, Rust MB, Beck FX, Jentsch TJ. Deafness and renal tubular acidosis in mice lacking the K-Cl co-transporter Kcc4. *Nature*. 2002;416(6883):874-8.
182. Velázquez H, Silva T. Cloning and localization of KCC4 in rabbit kidney: expression in distal convoluted tubule. *American journal of physiology Renal physiology*. 2003;285(1):F49-58.
183. Kajiyama H, Okamoto F, Li JP, Nakao A, Okabe K. Expression of mouse osteoclast K-Cl Co-transporter-1 and its role during bone resorption. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2006;21(7):984-92.
184. Lu J, Karadshah M, Delpire E. Developmental regulation of the neuronal-specific isoform of K-Cl cotransporter KCC2 in postnatal rat brains. *Journal of neurobiology*. 1999;39(4):558-68.
185. Rivera C, Voipio J, Payne JA, Ruusuvuori E, Lahtinen H, Lamsa K, et al. The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature*. 1999;397(6716):251-5.
186. Pearson MM, Lu J, Mount DB, Delpire E. Localization of the K(+) -Cl(-) cotransporter, KCC3, in the central and peripheral nervous systems: expression in the choroid plexus, large neurons and white matter tracts. *Neuroscience*. 2001;103(2):481-91.
187. Flores B, Schornak CC, Delpire E. A role for KCC3 in maintaining cell volume of peripheral nerve fibers. *Neurochemistry international*. 2019;123:114-24.
188. Adragna NC, Chen Y, Delpire E, Lauf PK, Morris M. Hypertension in K-Cl cotransporter-3 knockout mice. *Advances in experimental medicine and biology*. 2004;559:379-85.
189. Delpire E. Advances in the development of novel compounds targeting cation-chloride cotransporter physiology. *American journal of physiology Cell physiology*. 2021;320(3):C324-c40.
190. Fujii T, Takahashi Y, Ikari A, Morii M, Tabuchi Y, Tsukada K, et al. Functional association between K⁺-Cl⁻ cotransporter-4 and H⁺,K⁺-ATPase in the apical canalicular membrane of gastric parietal cells. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(1):619-29.
191. Watanabe M, Zhang J, Mansuri MS, Duan J, Karimy JK, Delpire E, et al. Developmentally regulated KCC2 phosphorylation is essential for dynamic GABA-mediated inhibition and survival. *Science signaling*. 2019;12(603).

192. Pisella LI, Gaiarsa JL, Diabira D, Zhang J, Khalilov I, Duan J, et al. Impaired regulation of KCC2 phosphorylation leads to neuronal network dysfunction and neurodevelopmental pathology. *Science signaling*. 2019;12(603).
193. de Los Heros P, Alessi DR, Gourlay R, Campbell DG, Deak M, Macartney TJ, et al. The WNK-regulated SPAK/OSR1 kinases directly phosphorylate and inhibit the K⁺-Cl⁻ co-transporters. *The Biochemical journal*. 2014;458(3):559-73.
194. Rinehart J, Maksimova YD, Tanis JE, Stone KL, Hodson CA, Zhang J, et al. Sites of regulated phosphorylation that control K-Cl cotransporter activity. *Cell*. 2009;138(3):525-36.
195. Brown FC, Conway AJ, Cerruti L, Collinge JE, McLean C, Wiley JS, et al. Activation of the erythroid K-Cl cotransporter Kcc1 enhances sickle cell disease pathology in a humanized mouse model. *Blood*. 2015;126(26):2863-70.
196. Kahle KT, Khanna AR, Duan J, Staley KJ, Delpire E, Poduri A. The KCC2 Cotransporter and Human Epilepsy: Getting Excited About Inhibition. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*. 2016;22(6):555-62.
197. Andermann F AE, Joubert M, Karpati G, Carpenter S, Melancon D. Familial agenesis of the corpus callosum with anterior horn cell disease : a syndrome of mental retardation, areflexia and paraparesis. *Trans Am Neurol*. 1972;Assoc 97:242-4.
198. Howard HC, Mount DB, Rochefort D, Byun N, Dupré N, Lu J, et al. The K-Cl cotransporter KCC3 is mutant in a severe peripheral neuropathy associated with agenesis of the corpus callosum. *Nat Genet*. 2002;32(3):384-92.
199. Anfinsen CB. Principles that govern the folding of protein chains. *Science (New York, NY)*. 1973;181(4096):223-30.
200. Meiler J, Baker D. Coupled prediction of protein secondary and tertiary structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(21):12105-10.
201. Goodsell DS, Olson AJ. Structural symmetry and protein function. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*. 2000;29:105-53.
202. Vogel C, Bashton M, Kerrison ND, Chothia C, Teichmann SA. Structure, function and evolution of multidomain proteins. *Current opinion in structural biology*. 2004;14(2):208-16.
203. Sachs G, Shin JM, Briving C, Wallmark B, Hersey S. The pharmacology of the gastric acid pump: the H⁺,K⁺ ATPase. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 1995;35:277-305.
204. Fafournoux P, Noël J, Pouysségur J. Evidence that Na⁺/H⁺ exchanger isoforms NHE1 and NHE3 exist as stable dimers in membranes with a high degree of specificity for homodimers. *The Journal of biological chemistry*. 1994;269(4):2589-96.
205. Li C, Wang W. Molecular Biology of Aquaporins. *Advances in experimental medicine and biology*. 2017;969:1-34.
206. Blaesse P, Guillemain I, Schindler J, Schweizer M, Delpire E, Khiroug L, et al. Oligomerization of KCC2 correlates with development of inhibitory neurotransmission. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2006;26(41):10407-19.
207. Parvin MN, Gerelsaikhan T, Turner RJ. Regions in the cytosolic C-terminus of the secretory Na⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾-2Cl⁽⁻⁾ cotransporter NKCC1 are required for its homodimerization. *Biochemistry*. 2007;46(33):9630-7.
208. Starremans PG, Kersten FF, Van Den Heuvel LP, Knoers NV, Bindels RJ. Dimeric architecture of the human bumetanide-sensitive Na-K-Cl Co-transporter. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2003;14(12):3039-46.
209. Plata C, Mount DB, Rubio V, Hebert SC, Gamba G. Isoforms of the Na-K-2Cl cotransporter in murine TAL II. Functional characterization and activation by cAMP. *The American journal of physiology*. 1999;276(3):F359-66.
210. de Jong JC, Willems PH, Mooren FJ, van den Heuvel LP, Knoers NV, Bindels RJ. The structural unit of the thiazide-sensitive NaCl cotransporter is a homodimer. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(27):24302-7.

211. Simard CF, Brunet GM, Daigle ND, Montminy V, Caron L, Isenring P. Self-interacting domains in the C terminus of a cation-Cl⁻ cotransporter described for the first time. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(39):40769-77.
212. Bennett MJ, Schlunegger MP, Eisenberg D. 3D domain swapping: a mechanism for oligomer assembly. *Protein science : a publication of the Protein Society*. 1995;4(12):2455-68.
213. Parvin MN, Turner RJ. Identification of key residues involved in the dimerization of the secretory Na⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾-2Cl⁽⁻⁾ cotransporter NKCC1. *Biochemistry*. 2011;50(45):9857-64.
214. Uvarov P, Ludwig A, Markkanen M, Soni S, Hübner CA, Rivera C, et al. Coexpression and heteromerization of two neuronal K-Cl cotransporter isoforms in neonatal brain. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(20):13696-704.
215. Casula S, Shmukler BE, Wilhelm S, Stuart-Tilley AK, Su W, Chernova MN, et al. A dominant negative mutant of the KCC1 K-Cl cotransporter: both N- and C-terminal cytoplasmic domains are required for K-Cl cotransport activity. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(45):41870-8.
216. Simard CF, Bergeron MJ, Frenette-Cotton R, Carpentier GA, Pelchat ME, Caron L, et al. Homooligomeric and heterooligomeric associations between K⁺-Cl⁻ cotransporter isoforms and between K⁺-Cl⁻ and Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransporters. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(25):18083-93.
217. Pedersen M, Carmosino M, Forbush B. Intramolecular and intermolecular fluorescence resonance energy transfer in fluorescent protein-tagged Na-K-Cl cotransporter (NKCC1): sensitivity to regulatory conformational change and cell volume. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(5):2663-74.
218. Chew TA, Orlando BJ, Zhang J, Latorraca NR, Wang A, Hollingsworth SA, et al. Structure and mechanism of the cation-chloride cotransporter NKCC1. *Nature*. 2019;572(7770):488-92.
219. Chi G, Ebenhoch R, Man H, Tang H, Tremblay LE, Reggiano G, et al. Phospho-regulation, nucleotide binding and ion access control in potassium-chloride cotransporters. *The EMBO journal*. 2021:e107294.
220. Chi X, Li X, Chen Y, Zhang Y, Su Q, Zhou Q. Cryo-EM structures of the full-length human KCC2 and KCC3 cation-chloride cotransporters. *Cell research*. 2021;31(4):482-4.
221. Xie Y, Chang S, Zhao C, Wang F, Liu S, Wang J, et al. Structures and an activation mechanism of human potassium-chloride cotransporters. *Science advances*. 2020;6(50).
222. Yang X, Wang Q, Cao E. Structure of the human cation-chloride cotransporter NKCC1 determined by single-particle electron cryo-microscopy. *Nature communications*. 2020;11(1):1016.
223. Liu S, Chang S, Han B, Xu L, Zhang M, Zhao C, et al. Cryo-EM structures of the human cation-chloride cotransporter KCC1. *Science (New York, NY)*. 2019;366(6464):505-8.
224. Reid MS, Kern DM, Brohawn SG. Cryo-EM structure of the potassium-chloride cotransporter KCC4 in lipid nanodiscs. *eLife*. 2020;9.
225. Li G, Huang Z, Zhang C, Dong BJ, Guo RH, Yue HW, et al. Construction of a *linker* library with widely controllable flexibility for fusion protein design. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016;100(1):215-25.
226. Chen X, Zaro JL, Shen WC. Fusion protein *linkers*: property, design and functionality. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013;65(10):1357-69.
227. Klein SL, Strausberg RL, Wagner L, Pontius J, Clifton SW, Richardson P. Genetic and genomic tools for *Xenopus* research: The NIH *Xenopus* initiative. *Dev Dyn*. 2002;225(4):384-91.
228. Gaudet P, Livstone MS, Lewis SE, Thomas PD. Phylogenetic-based propagation of functional annotations within the Gene Ontology consortium. *Brief Bioinform*. 2011;12(5):449-62.
229. D'Andrea A, Pellman D. Deubiquitinating enzymes: a new class of biological regulators. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 1998;33(5):337-52.