

Régulation par la vasopressine de la réabsorption de NaCl dans le tubule collecteur rénal

par Alain Vandewalle

INSERM, U773, Centre de Recherche Biomédicale Bichat-Beaujon (CRB3), BP 416, F-75018 Paris, France ;
Université Paris 7-Denis Diderot, site Bichat, paris, F-75870 Paris, France. E-mail : vandewal@bichat.inserm.fr

Reçu le 22 juin 2005

RÉSUMÉ

Dans le rein, les parties terminales du tubule rénal sont le siège d'une régulation fine de la réabsorption de NaCl par la vasopressine et l'aldostérone. Cette revue résume les connaissances sur les effets de la vasopressine sur le transport de Na⁺ dépendant du canal épithélial sodique sensible à l'amiloride (ENaC)

et le canal chlorure *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR) dans des lignées immortalisées et des cultures primaires de tubules collecteurs, exprimant ou non des délétions du motif PY des sous-unités β - ou γ -ENaC, responsables de la maladie hypertensive de Liddle.

SUMMARY Regulation by vasopressin of NaCl absorption in the renal collecting duct

In the kidney, the fine control of NaCl absorption takes place in the distal nephron and is controlled by aldosterone and vasopressin. This review summarizes the effects of vasopressin on Na⁺ transport mediated by the amiloride-sensitive epithelial sodium channel (ENaC) and the *cystic fibrosis transmembrane conduc-*

tance regulator (CFTR) Cl⁻ channel in immortalized or primary cultured cortical collecting duct cells, expressing either the wild-type ENaC subunits, or mutations, or deletions of the PY domain of the β - or γ -ENaC subunits responsible for Liddle's syndrome, an inherited form of hypertension due to excessive salt absorption.

INTRODUCTION

Dans le rein, les parties terminales du tubule rénal, ou néphron distal, sont le siège d'une régulation hormonale fine de la réabsorption d'eau et d'électrolytes, faisant intervenir principalement l'aldostérone et la vasopressine (Stokes, 1982 ; Rossier & Palmer, 1992). L'aldostérone est la principale hormone corticostéroïdienne qui se lie au récepteur des minéralocorticoïdes (MR), un membre de la superfamille des récepteurs nucléaires (Arriza *et al.*, 1987), pour induire une cascade d'événements conduisant à une augmentation de la réabsorption de Na⁺ (Rossier & Palmer, 1992). La vasopressine est une hormone polypeptidique qui exerce une action à la fois antidiurétique (Grantham & Burg, 1966 ; May *et al.*, 1997) et antinatriurétique (Reif *et al.*, 1986). Dans le néphron distal, l'action de la vasopressine sur les transports ioniques et hydriques est la conséquence de la liaison de l'hormone à des récepteurs de type V2, couplés aux adénylate cyclases par le biais d'une protéine hétérotrimérique, la protéine Gs (Imbert-Teboul *et al.*, 1978). Des études de mesure d'activité d'adénylate cyclase ont permis de démontrer la présence des récepteurs V2 principalement au niveau de l'anse ascendante de Henle et du

tubule collecteur (Bindels *et al.*, 1988 ; Imbert-Teboul *et al.*, 1978). Des études de liaison sur segments tubulaires microdisséqués de reins de rat, utilisant la vasotocine tritiée (Ammar *et al.*, 1991), ainsi que des analyses de RT-PCR et d'hybridation *in situ* ont confirmé la présence de ces récepteurs dans l'anse ascendante de Henle et du tubule collecteur (Ostrowsli *et al.*, 1992 ; Terada *et al.*, 1993).

Les mécanismes moléculaires sous-tendant l'action antidiurétique de la vasopressine par le biais de la régulation des aquaporines 2 et 3 ont été largement étudiés (Knepper *et al.*, 1994 ; Kwon *et al.*, 2001 ; Verkman & Mitra, 2000). La vasopressine joue aussi un rôle essentiel dans le maintien du gradient osmotique interstitiel cortico-papillaire, en stimulant les processus de réabsorption active de NaCl au niveau de la portion médullaire de l'anse ascendante de Henle (Hall & Varney, 1980 ; Sasaki & Imai, 1980 ; Hebert *et al.*, 1981). Les études de microperfusion sur tubules isolés ont permis de démontrer que la vasopressine stimule de manière aiguë ou chronique (par infusion de vasopressine à l'aide de minipompes) le transport de Na⁺ et/ou de Cl⁻ dans la branche large ascendante de l'anse de Henle (Hall & Varney, 1980 ; Sasaki & Imai, 1980 ; Hebert *et al.*, 1981 ;

Besseghir *et al.*, 1986; Hawk *et al.*, 1996). Des études *ex vivo* sur des tubules collecteurs ont également permis de démontrer que la vasopressine induit une augmentation de la réabsorption de Na^+ (Frindt & Burg, 1972; Hawk *et al.*, 1980; Schlatter & Schaffer, 1987). L'utilisation de suspensions de tubules collecteurs ou de lignées cellulaires, comme les cellules A6 de rein de crapaud (Bindels *et al.*, 1988; Wong & Chase, 1988) ou les cellules M-1 dérivées de tubules collecteurs corticaux de souris (Nakhoul *et al.*, 1998), ont aussi permis de montrer qu'*in vitro*, la vasopressine stimule de manière très rapide (quelques minutes) la réabsorption de Na^+ . Cependant, les mécanismes moléculaires de régulation de la vasopressine dans la réabsorption de Na^+ restent encore assez mal connus.

Des lignées de cellules issues des parties terminales du néphron [*e.g.* le tubule contourné distal (DCT), le tubule collecteur dans sa portion corticale (CCD) et médullaire interne (IMCD)] ont été établies à partir des segments disséqués de reins de souris transgéniques SVPK/Tag exprimant l'antigène T du virus simien 40 (SV40) placé sous le contrôle des régions 5' régulatrices d'un promoteur tronqué de la pyruvate kinase de type L fusionné avec un enhanceur de SV40 (Van Huyen *et al.*, 2001). Il est apparu que ces lignées de cellules épithéliales tubulaires rénales ont conservé les principales propriétés des cellules dont elles ont été dérivées, notamment un transport de Na^+ stimulé par l'aldostérone et la vasopressine et un transport électrogénique de Cl^- stimulé par la vasopressine (Duong Van Huyen *et al.*, 1998; Bens *et al.*, 1999; Van Huyen *et al.*, 2001). Cette revue résume les principaux résultats obtenus sur la régulation du transport de NaCl par la vasopressine, les effets conjoints de la vasopressine et de l'aldostérone et les relations complexes pouvant exister entre le transport de Na^+ dépendant du canal épithélial sodique (ENaC) sensible à l'amiloride et le transport de Cl^- dépendant du canal chlorure CFTR.

RÉGULATION DU TRANSPORT DE Na^+ PAR LA VASOPRESSINE

Dans le tubule collecteur rénal, l'aldostérone et la vasopressine stimulent le transport de Na^+ par un mécanisme faisant intervenir ENaC et la pompe Na^+ , K^+ -ATPase. Dans le rein, ENaC est principalement localisé dans les cellules principales du tubule distal et collecteur (Duc *et al.*, 1994). Les sous-unités β -ENaC et γ -ENaC ne forment pas de canal Na^+ fonctionnel lorsqu'elles sont exprimées seules ou en association (Canessa *et al.*, 1993; Lingueglia *et al.*, 1993). A l'inverse, ces mêmes sous-unités potentialisent les courants sodiques lorsqu'elles sont co-exprimées avec la sous-unité α -ENaC (Canessa *et al.*, 1994; McDonald *et al.*, 1995). Les études d'expression fonctionnelle des sous-unités ENaC dans l'œuf de Xénope ont montré que ENaC s'organise en une protéine hétérotétramérique avec une stoechiométrie préférentielle de deux sous-unités α -ENaC, une sous-unité β -ENaC et une sous-unité γ -ENaC (Firsov *et*

al., 1996). De plus, les propriétés biophysiques et le profil pharmacologique de ENaC exprimés dans les ovocytes de Xénope sont identiques à ceux du canal natif exprimé dans le néphron distal (Canessa *et al.*, 1994). Dans le tubule collecteur rénal, le Na^+ présent dans la lumière tubulaire est réabsorbé au niveau de la face luminale des cellules principales par ENaC qui représente l'étape limitante pour l'entrée de Na^+ et est extrudé du côté basolatéral par la pompe Na^+ , K^+ -ATPase (Rossier & Palmer, 1992).

En réponse à une hypovolémie, une hypotension ou des variations de l'osmolarité, la vasopressine libérée par l'hypothalamus dans la circulation sanguine va se lier aux récepteurs V2 localisés dans les membranes basolatérales des cellules des tubules distaux et collecteurs. L'hormone polypeptidique va alors stimuler l'activité adénylate cyclasique pour augmenter le contenu cellulaire en AMP cyclique (AMPc). L'augmentation du contenu cellulaire en AMPc va être responsable d'une augmentation d'environ un facteur 2 de l'activité des canaux sodiques en 5 à 20 minutes (Vandewalle *et al.*, 1999). Bien que l'augmentation des courants sodiques par l'AMP cyclique soit bien établie, le mécanisme d'action par lequel ce dernier stimule l'activité de ENaC reste encore assez mal connu. La stimulation rapide de la Na^+ , K^+ -ATPase par les analogues de l'AMPc et la vasopressine est associée à une augmentation proportionnelle de l'expression membranaire de surface de la pompe sans pour autant modifier le pool intracellulaire total de la Na^+ , K^+ -ATPase (Gonin *et al.*, 2001). Il a aussi été montré que l'augmentation de l'expression de surface et l'activité de la Na^+ , K^+ -ATPase par le dibutyryl AMPc, un analogue perméant de l'AMPc, sont inhibées lorsque les mécanismes d'endocytose et d'exocytose sont bloqués par la bréfeldine A. La vasopressine par le biais de l'AMPc se lie aux sous-unités régulatrices de la PKA pour relarguer la sous-unité catalytique de la PKA. Ce mécanisme d'action de l'AMPc a été rapporté pour la stimulation de l'activité de ENaC dans les cellules A6 d'amphibien (Prat *et al.*, 1993). Dans l'épithélium intact, la plupart des études ont montré que la vasopressine induit une augmentation du nombre de canaux ENaC à la surface membranaire des tubules collecteurs (Marunaka & Eaton, 1991; Frindt *et al.*, 1995). En l'absence de toute stimulation, les canaux ENaC sont très peu, ou pratiquement pas, exprimés à la surface membranaire des tubules collecteurs, rendant difficile l'analyse du canal par les techniques électrophysiologiques de patch-clamp. Cette limitation méthodologique a conduit de nombreuses équipes à étudier les effets de la vasopressine sur le transport de Na^+ dans des modèles de cellules en culture. Des mesures de courant de court-circuit (I_{sc}) ont permis de montrer que la vasopressine induit une augmentation rapide de la composante sensible à l'amiloride (Ams I_{sc}) dans les cellules M-1 de tubules collecteurs de souris (Letz & Korbmacher, 1997). Nous avons aussi montré que la vasopressine entraîne une augmentation rapide de la réabsorption de Na^+ dans les trois lignées murines de cellules issues de DCT, CCD et d'IMCD. En accord avec l'existence d'un gradient

osmotique cortico-médullaire, les mesures de flux de Na^{22} et de Cl^{36} ont montré que la réabsorption de Na^+ et le transport net de Cl^- (mesuré dans les conditions physiologiques de courant ouvert) sont plus importants dans la lignée de cellules de DCT que dans celles de CCD et d'IMCD (Van Huyen *et al.*, 2001). Ces résultats ont suggéré que la réabsorption de Na^+ est prédominante dans le cortex, essentiellement au niveau des tubules distaux et du raccordement de ces derniers aux tubes collecteurs (e.g. les tubules connecteurs). La sous-unité α -ENaC joue un rôle essentiel dans la réabsorption de Na^+ . Alors que l'invalidation de la sous-unité α -ENaC est létale chez la Souris (Hummeler *et al.*, 1996), Rubera *et al.* (2003) ont démontré que l'invalidation ciblée et conditionnelle de cette sous-unité dans les cellules du tubule collecteur n'est pas létale et que la majorité de la réabsorption du Na^+ (et très vraisemblablement du Cl^-) siège au niveau des segments initiaux du néphron distal. Ces résultats, en accord avec les données obtenues sur les lignées cellulaires de DCT et de CCD, suggèrent donc que la majeure partie de la réabsorption de Na^+ dans la partie toute initiale du tubule collecteur.

L'aldostérone induit une séquence d'événements transcriptionnels et post-transcriptionnels initiés par la liaison

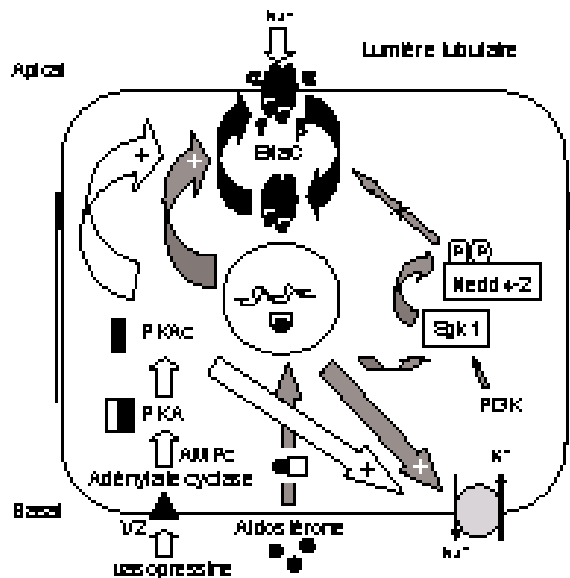


FIG. 1. – Schéma d'une cellule du tubule collecteur rénal et des principales voies de signalisation mises en jeu par l'aldostérone (flèches grises) et la vasopressine (flèches blanches). La vasopressine se lie au récepteur V2 et stimule la production d'AMPc responsable de l'activation de la voie de la PKA conduisant à une augmentation de l'activité de ENaC et de la Na^+ , K^+ -ATPase. L'aldostérone se lie au récepteur minéralocorticoïde pour induire une cascade d'événements transcriptionnels et post-transcriptionnels conduisant à l'augmentation de synthèse de protéines induites, notamment ENaC et la Na^+ , K^+ -ATPase responsables de l'augmentation de la réabsorption de Na^+ . ENaC est recyclée par un mécanisme d'ubiquitinylation faisant intervenir l'ubiquitine ligase Nedd4-2. L'aldostérone, l'insuline et la PI3kinase (PI3K) stimulent aussi la "glucocorticoid-regulated kinase" (SGK1) qui phosphoryle Nedd4-2, empêchant ainsi l'interaction des domaines WW de Nedd4-2 avec le motif PY de ENaC et, par voie de conséquence, l'internalisation et la dégradation du canal épithélial sodique.

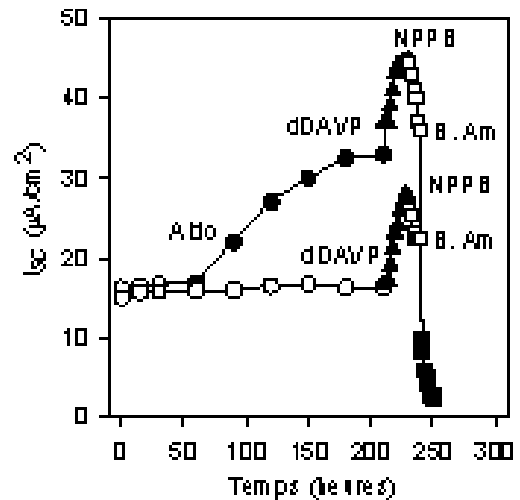


FIG. 2. – Effets de la dDAVP et de l'aldostérone sur l'augmentation de courant de court-circuit (I_{sc}). Tracés représentatifs des valeurs de I_{sc} obtenues sur les cellules mpkCCD incubées sur filtres, en l'absence (cercle blancs) ou en présence de 5×10^{-7} M d'aldostérone (cercles noirs) pendant 3 heures. Après équilibration des tracés, la dDAVP (10^{-7} M, triangles noirs), le NPPB (10^{-4} M, carrés blancs) et le benzamyl amiloride (B. Am, 10^{-6} M, carrés noirs) ont été ajoutés séquentiellement. D'après Duong Van Huyen *et al.*, (1998).

de l'aldostérone au récepteur minéralocorticoïde (MR), conduisant à une augmentation de la réabsorption de Na^+ résultant d'une activation coordonnée de ENaC et de la pompe Na^+ - K^+ -ATPase (Summa *et al.*, 2001 ; Feraille *et al.*, 2003). Le mécanisme d'activation de ENaC par la vasopressine diffère de l'action de l'aldostérone. La figure 1 résume de manière schématique les mécanismes d'action de ces deux hormones dans le tubule collecteur rénal. La vasopressine entraîne une augmentation beaucoup plus rapide (moins d'une minute) du transport de Na^+ que celle induite par l'aldostérone (> 30 minutes). De plus, la vasopressine peut potentialiser l'effet inducteur de l'aldostérone sur le transport de Na^+ . En effet, des études réalisées sur des tubules collecteurs perfusés de rat (Reif *et al.*, 1986), ainsi que sur les cellules A6 de rein de crapaud (Verrey 1994), ont démontré que la vasopressine a un effet additif à celui de la désoxycorticostérone ou de l'aldostérone sur le transport de NaCl. Nous avons aussi montré dans la lignée murine de cellules de tubules collecteurs corticaux, mpkCCD, que non seulement la vasopressine stimule la réabsorption de Na^+ préalablement stimulée par l'aldostérone, mais aussi que la déamino-8-D-arginine vasopressine (dDAVP), qui se lie spécifiquement aux récepteurs V2 (Kurokawa *et al.*, 1992), entraîne une augmentation notable de la sécrétion électrogénique apicale de Cl^- inhibée par le NPPB, un inhibiteur puissant des canaux chlorures (Wangemann *et al.*, 1986). La figure 2 illustre ces résultats. Ceux-ci indiquent aussi que le mécanisme d'action de la vasopressine sur l'activité du canal sodique diffère très certainement de celui exercé par l'aldostérone. Djelidi *et al.* (1999) ont rapporté qu'une exposition chronique des cel-

lules de CCD de rat à la vasopressine augmente l'influx de Na^{22} et entraîne une augmentation de l'expression des sous-unités β -ENaC et γ -ENaC. Ecelbarger *et al.* (2001) ont mis en évidence une augmentation de l'abondance des sous-unités β -ENaC et γ -ENaC dans le cortex mais pas dans la médullaire de reins de rats Sprague-Dawley, 30 et 60 minutes suivant une injection intramusculaire de dDAVP. Des résultats identiques ont été obtenus sur des rats soumis à une restriction hydrique durant une semaine (Ecelbarger *et al.*, 2001).

EFFETS DE MUTATIONS ACTIVATRICES DE ENaC RESPONSABLES DE LA MALADIE DE LIDDLE SUR LA RÉGULATION DU TRANSPORT DE Na^+ PAR LA VASOPRESSINE

La maladie de Liddle est une forme familiale d'hypertension à rénine basse due à une absorption inappropriée de NaCl (Liddle *et al.*, 1963) causée par des mutations des sous-unités β -ENaC et γ -ENaC (Hanson *et al.*, 1995a, 1995b; Shimkets *et al.*, 1994; Tamura *et al.*, 1996). Ces mutations, responsables de délétions ou de modifications d'un motif PY (séquence PPxY) localisé dans la région COOH terminale de β -ENaC ou γ -ENaC, sont responsables d'une augmentation de l'activité de ENaC et de la stabilité du canal à la surface des cellules cibles (Snyder *et al.*, 1995; Schild *et al.*, 1996). Il a été montré que les motifs riches en proline sont impliqués dans des interactions protéines-protéines. De plus, les motifs PY des sous-unités de ENaC interagissent avec l'ubiquitine ligase Nedd4-2 (Kamynina & Staub, 2002) identifiée à partir de la lignée mpkCCD_{c14} de cellules de tubule collecteur cortical (Kamynina *et al.*, 2001). Dans le système d'expression hétérologue d'œuf de Xénope, l'interaction entre les motifs PY et Nedd4-2 est responsable de l'ubiquitinylation du canal conduisant à son internalisation et sa dégradation dans le protéasome. Nedd4-2 joue aussi un rôle clé dans l'internalisation du canal en l'absence de toute stimulation (Kamynina &

Staub, 2002) (Fig. 1). En accord avec ces résultats, des mutations dans les motifs PY vont entraîner un défaut d'ubiquitinylation de ENaC et par voie de conséquence être responsables d'une retenue prolongée du canal dans les membranes plasmiques (Auberson *et al.*, 2003). Il a aussi été proposé que le motif PY fasse partie d'un motif d'endocytose reconnu par le complexe "clathrin-adaptor protein" (AP2) (Shimkets *et al.*, 1997). Ces deux modèles non mutuellement exclusifs rendent compte de l'augmentation de l'expression de ENaC muté à la surface des cellules cibles. De plus, des études récentes réalisées dans l'œuf de Xénope ont permis de montrer que la "glucocorticoid-regulated kinase" (SGK) peut moduler les interactions entre le motif PY et ENaC (Kamynina & Staub, 2002). Snyder (2000) a émis l'hypothèse selon laquelle la vasopressine interagirait sur le motif PY de ENaC pour sa stabilité à la surface cellulaire. Selon cette hypothèse, les mutants de ENaC responsables de la maladie de Liddle devraient alors être moins ou pas sensibles aux effets de l'aldostérone et de la vasopressine. Auberson *et al.* (2003) ont analysé les conséquences de mutations dans le motif PY des différentes sous-unités β -ENaC et γ -ENaC sur la réponse à l'aldostérone et à la vasopressine. Pour cette étude, la lignée de cellules mpkCCD_{c14}, ayant maintenu *in vitro* les principales propriétés des tubules collecteurs (Bens *et al.*, 1999; Summa *et al.*, 2001; Feraille *et al.*, 2003), a été transfectée avec des constructions exprimant soit la sous-unité β -ENaC rendue insensible à l'amiloride par l'addition de la mutation β -G525C et les mutations β -Y618A, β -P616L ou la mutation stop β -R566, soit la sous-unité γ -ENaC avec la mutation stop K570. En mettant à profit la propriété de la mutation β -G525C d'être très résistante à l'amiloride, l'utilisation de deux concentrations de faible dose d'amiloride (10 μM) et de forte dose de benzamyl amiloride (500 μM), un dérivé de l'amiloride dix fois plus puissant, a permis de mesurer les composantes amiloride sensibles représentant les courants I_{sc} dus au passage de Na^+ par l'ENaC endogène, et la composante résistante à l'amiloride et sensible au benzamyl-amiloride reflétant les courants sodiques passant par ENaC muté.

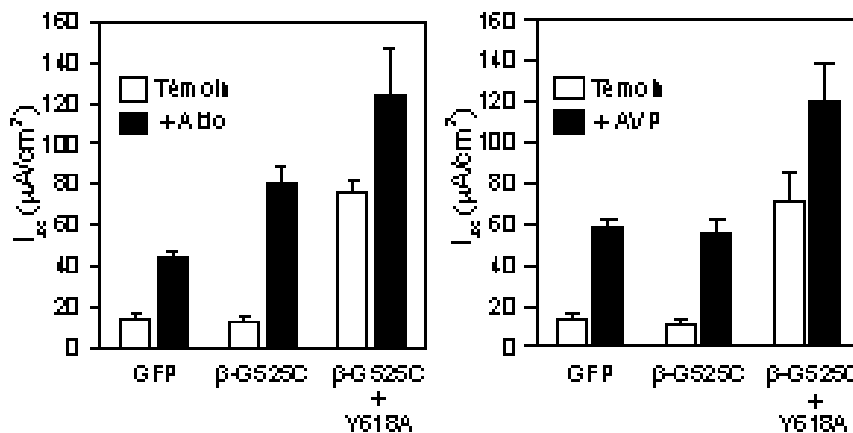


FIG. 3. – Effets de la dDAVP et de l'aldostérone sur le courant de court-circuit dans les cellules mpkCCD_{c14} transfectées avec différents mutants de la sous-unité β -ENaC. Les barres représentent les valeurs d' I_{sc} mesurées en présence de benzamyl amiloride (500 μM) (sauf pour les cellules transfectées avec la GFP seule) et d'amiloride (10 μM) dans les cellules transfectées avec la GFP seule (reflétant l'activité du canal ENaC endogène), la construction β -G525C (reflétant l'activité de la construction β -ENaC résistante à l'amiloride) et la construction β -G525C plus la mutation Y618A. Dans tous les cas, les valeurs d' I_{sc} (reflétant la réabsorption de Na^+ dépendant du ENaC endogène ou muté) mesurées en l'absence ou en présence de dDAVP ou d'aldostérone sont plus élevées dans les

cellules exprimant les constructions β -G525C et β -G525C plus la mutation Y618A. D'après Auberson *et al.* (2003).

Dans ces conditions expérimentales, Auberson *et al.* (2003) ont montré que les cellules exprimant les différentes mutations du motif PY ont un courant de court-circuit mesuré en condition basale 5 à 6 fois plus élevé que celui des cellules non transfectées. De plus, les cellules ainsi transfectées répondent toujours à l'aldostérone et à la vasopressine. La figure 3 résume les résultats obtenus avec les cellules transfectées avec la GFP, la mutation β -G525C seule et la mutation β -G525C plus Y618A. Dans les conditions où les cellules ont d'abord été stimulées par l'aldostérone ou la vasopressine, les mesures d' I_{sc} réalisées après avoir enlevé les hormones a clairement mis en évidence une baisse beaucoup moins rapide des valeurs d' I_{sc} avec les cellules exprimant les mutations que dans des lots de cellules témoins (Fig. 4). Ces résultats ont apporté la démonstration de l'augmentation de la demie-vie de ENaC portant des mutations de type Liddle à la surface membranaire des cellules du tubule collecteur rénal. Elles apportent aussi une illustration de l'importance du rôle joué par les ubiquitine ligases (en particulier Nedd4-2) (Kamynina & Staub, 2002) dans l'internalisation des canaux, une fois qu'ils sont exprimés à la surface membranaire. Ce travail a permis de démontrer, au moins dans des conditions *in vitro*, utilisant les modèles de cellules murines de tubule collecteur mpkCCD_{cl4} (Bens *et al.*, 1999), que les mutants ENaC portant des mutations activatrices de type Liddle ont conservé une sensibilité à l'aldostérone et à la vasopressine et ont une durée de vie prolongée à la surface membranaire, une propriété devant contribuer à l'augmentation de la réabsorption de Na⁺ chez les patients atteints de la maladie de Liddle. Une lignée de souris transgéniques exprimant une mutation stop-codon, correspondant à la mutation Stop R566 (L) initialement décrite chez les patients atteints de Liddle (Pradervand *et al.*, 1999), a aussi permis de montrer que l'aldostérone, et à un degré moindre la vasopressine, est encore capable d'induire une augmentation de la réabsorption de Na⁺ au niveau du tubule collecteur (Dahlmann *et al.*, 2003 ; Pradervand *et al.*, 2003). Ces résultats ont donc confirmé les premières observations réalisées sur la lignée de cellules de tubule collecteur démontrant que des mutations de type Liddle sont responsables d'une réabsorption exagérée de Na⁺.

INTERACTIONS ENTRE ENaC ET LE CANAL CHLORURE CFTR : RÔLE DE LA VASOPRESSINE

La vasopressine, outre son effet sur la réabsorption de Na⁺, stimule le canal Cl⁻ "cystic fibrosis transmembrane conductance regulator" (CFTR) à la fois dans les cellules A6 d'Amphibien (Verrey, 1994) et différentes lignées de cellules de tubule collecteur (Husted *et al.*, 1995 ; Vandorpe *et al.*, 1995 ; Bens *et al.*, 2001 ; Barriere *et al.*, 2003). Des études de co-expression hétérologue dans les œufs de Xénope et différents systèmes en culture ont montré que CFTR peut agir comme un régulateur négatif de l'activité de ENaC (Stutts *et al.*, 1995 ; Ji *et al.*, 2000) et que, réciproquement, la conductance Cl⁻ CFTR peut-être activée par ENaC (Jiang *et al.*, 2000). De plus, les courants sodiques de mutants ENaC de type Liddle sont aussi régulés négativement par CFTR lorsque les deux canaux sont exprimés dans les ovocytes (Hopf *et al.*, 1999). Ces résultats ont soulevé la question de savoir si la conductance CFTR activable par l'AMP cyclique participe ou non à la régulation de la réabsorption de Na⁺ dans les tubules collecteurs exprimant des mutations de ENaC de type Liddle. Pour répondre à cette question, les effets de la dDAVP sur le transport de Cl⁻ ont été analysés sur des cultures primaires de tubules collecteurs corticaux (CCD) microdisséqués de reins de souris normales ou de souris "Liddle" (Pradervand *et al.*, 1999) hétérozygotes (L/+) ou homozygotes (L/L) exprimant la mutation stop-codon correspondant à la mutation Stop R566 (L) de β -ENaC, ainsi que sur des cultures primaires provenant de reins des souris *cftr*^{lunc} invalidées pour le gène CFTR (Snouwaert *et al.*, 1992). Les résultats des mesures d' I_{sc} ont montré que les composantes sensibles à l'amiloride sont 2 à 4 fois plus élevées dans les CCD L/+ et L/L que dans les CCD des reins de souris normales. L'addition de dDAVP pendant une courte période (20 minutes) entraîne une augmentation significative (x2) de la composante sensible à l'amiloride dans les CCD de souris normales, mais est restée sans effet sur les CCD de souris L/+ et L/L. A l'inverse, la dDAVP stimule de manière significative des courants Cl⁻ inhibables par le NPPB dans les cultures de CCD L/+ et L/L préalablement traitées par l'amiloride (Chang *et*

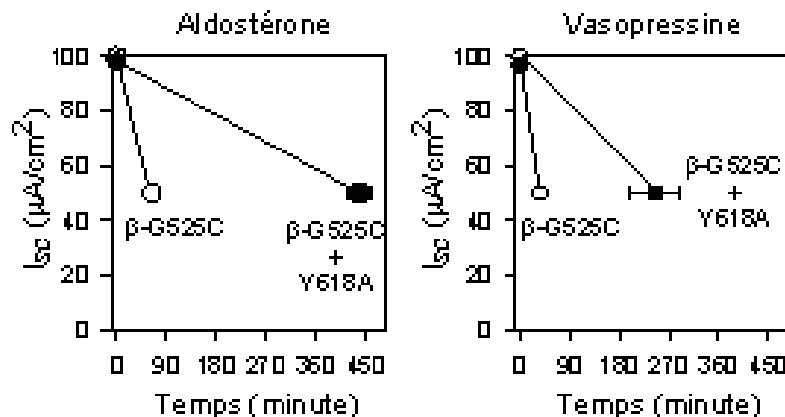
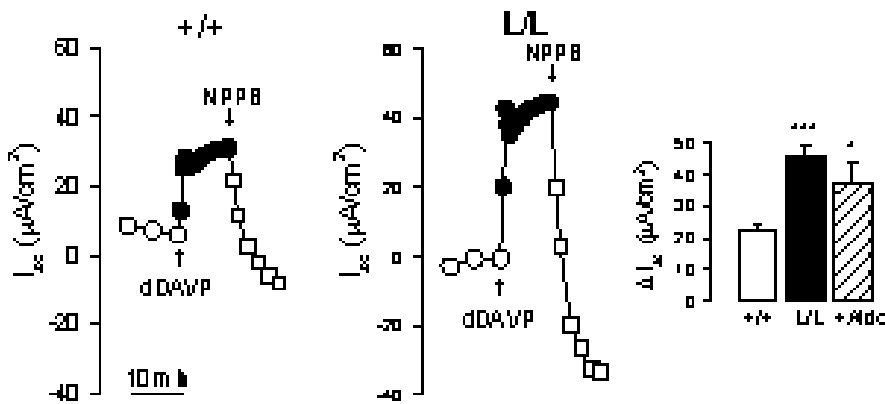


FIG. 4. – Décroissance des valeurs des courants de court-circuit dans les cellules mpkCCD_{cl4} exprimant la mutation Y618A et préalablement stimulées par l'aldostérone ou la vasopressine. Les cellules exprimant la construction β -G525C ou la construction β -G525C plus la mutation Y618A ont été préalablement incubées avec l'aldostérone ou la vasopressine, puis après avoir enlevé les hormones, la composante benzamyl-amiloride de I_{sc} a été mesurée pendant des temps variables. Les symboles représentent les valeurs de temps correspondant à une diminution de 50 % des valeurs d' I_{sc} . Dans les deux cas, les cellules exprimant la mutation Y618A ont un allongement des valeurs d' I_{sc} 50 % qui reflète l'augmentation de la durée de vie du canal à la surface cellulaire. D'après Auberson *et al.* (2003).



normales (+/+), de souris Liddle (L/L) ou de souris normales préalablement incubées avec l'aldostérone. D'après Chang *et al.* (2005).

al., 2005). Ces résultats ont donc soulevé l'hypothèse de la stimulation par la dDAVP d'une conductance apicale Cl^- de manière plus prononcée dans les CCD de reins de souris exprimant la mutation activatrice de β -ENaC de type Liddle. A l'appui de ces résultats, les mesures d' I_{sc} réalisées dans des conditions de substitution apicale de Na^+ (et de Cl^-) ont permis de démontrer que la sécrétion électrogénique de Cl^- stimulée par la dDAVP, totalement absente dans les CCD de souris invalidées pour CFTR (Bens *et al.*, 2001), est augmentée d'environ un facteur 2 et 4 respectivement dans les CCD L/+ et L/L (Chang *et al.*, 2005). De plus, les enregistrements d' I_{sc} réalisés dans des conditions de perméabilisation des membranes basolatérales par la nystatine, conditions permettant d'annuler les gradients électrogéniques imposés par la pompe Na^+ , K^+ -ATPase et les conductances potassiques, ont permis de démontrer que l'augmentation de l'activité ENaC (qu'elle soit due à un mutant ENaC de type Liddle ou à l'activation de ENaC par l'aldostérone) s'accompagne d'une augmentation de l'activité de la conductance Cl^- CFTR (Fig. 5). Les résultats de cette étude ont donc permis de démontrer que la vasopressine stimule une conductance Cl^- CFTR dans le tubule collecteur rénal exprimant un mutant ENaC de type Liddle, suggérant que cet effet peut contribuer à l'augmentation de la réabsorption de NaCl dans le néphron distal.

CONCLUSIONS

Cette revue non exhaustive a résumé l'action de la vasopressine sur la réabsorption de Na^+ et de Cl^- dans le néphron distal. Expérimentalement, les mesures de flux ioniques sont réalisées sur des monocouches de cellules confluentes cultivées sur filtres semi-perméables en utilisant la méthode de mesure de courant de court-circuit pour laquelle le potentiel transépithélial est clampé à 0. Dans ces conditions, on mesure une sécrétion électrogénique de Cl^- due à la présence du canal CFTR dans la membrane apicale des cellules du tubule collecteur. Cependant, l'orientation de flux de Cl^- mesuré dans des

FIG. 5. – Effets de la vasopressine sur le transport de Cl^- dans les cellules du tubule collecteur après perméabilisation des membranes basolatérales. L' I_{sc} a été mesuré dans des cultures primaires de tubule collecteurs corticaux (CCD) isolés de souris normales (+/+) ou de souris Liddle (L/L) après perméabilisation des membranes basales par la nystatine et imposition d'un gradient de Cl^- (milieu basal : 149 μM , milieu apical : 14,9 μM). Les cellules ont ensuite été séquentiellement incubées avec la dDAVP (10^{-8} M, appliquée du côté basal) et le NPPB (appliqué du côté apical). Les barres représentent l'augmentation de I_{sc} induit par la dDAVP dans les cultures de CCD disséquées de souris

conditions physiologiques (quand la différence de potentiel n'est pas clampée) peut alors être très différente des conditions expérimentales de mesures de courant de court-circuit, en particulier dans les tubules collecteurs exprimant les mutants ENaC de type Liddle. Dans ces cellules du tubule collecteur exprimant un canal épithélial sodique constitutivement hyperactivé (Pradervand *et al.*, 2003 ; Chang *et al.*, 2005), la différence de potentiel transépithélial devrait être suffisamment négative pour imposer une réabsorption de Cl^- dans des conditions physiologiques de courant ouvert en présence de vasopressine qui, de plus, peut agir en synergie avec l'aldostérone pour stimuler la réabsorption de NaCl (Verrey 1994 ; Duong Van Huyen *et al.*, 1998). Ainsi, l'étude réalisée par Chang *et al.* (2005) suggère que l'activation d'une conductance Cl^- par la vasopressine pourrait contribuer à une réabsorption exagérée de NaCl dans les reins de patients atteints de la maladie de Liddle et présentant une hypertension de type hypervolémique.

BIBLIOGRAPHIE

- Ammar A., Schmidt B. A., Semmekrot B., Roseau S. & Butlen D., Receptors for neurohypophysial hormones along the rat nephron: ^{125}I -labelled $(\text{CH}_2)_5[\text{Tyr}(\text{Me})_2, \text{Thr}_4, \text{Orn}_8, \text{Tyr-NH}_3^9]$ vasotocin binding in microdissected tubules. *Pflügers Arch.*, 1991, 418, 220-227.
- Arriza J. L., Weinberger C., Cerelli G., Glaser T. M., Handelin B. L., Housman D. E. & Evans R. M., Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. *Science*, 1987, 237, 268-275.
- Auberson M., Hoffmann-Pochon N., Vandewalle A., Kellenberger S. & Schild L., Epithelial Na^+ channel mutants causing Liddle's syndrome retain ability to respond to aldosterone and vasopressin. *Am. J. Physiol. Renal. Fluid. Electrolyte. Physiol.*, 2003, 285, F459-F471.
- Barriere H., Belfodil R., Rubera L., Tauc M., Poujeol C., Bidet M. & Poujeol P., CFTR null mutation altered cAMP-sensitive and swelling-activated Cl^- currents in primary cultures of mouse nephron. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, 2003, 284, F796-F811.

- Bens M., Vallet V., Cluzeaud F., Pascual-Letallec L., Kahn A., Rafestin-Oblin M. E., Rossier B. C. & Vandewalle A., Corticosteroid-dependent sodium transport in a novel immortalized mouse collecting duct principal cell line. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 1999, 10, 923-934.
- Bens M., Duong Van Huyen J. P., Cluzeaud F., Teulon J. & Vandewalle A., CFTR disruption impairs cAMP-dependent Cl⁻ secretion in primary cultures of mouse cortical collecting ducts. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 2001, 281, F434-F442.
- Bessegghir K., Trimble M. E. & Stoner L., Action of ADH on isolated medullary thick ascending limb of the Brattleboro rat. *Am. J. Physiol.*, 1986, 251, F271-F277.
- Bindels R. J., Schafer J. A. & Reif M. C., Stimulation of sodium transport by aldosterone and arginine vasotocin in A6 cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 1988, 972, 320-330.
- Canessa C. M., Horisberger J. D. & Rossier B. C., Epithelial sodium channel related to proteins involved in neurodegeneration. *Nature*, 1993, 361, 467-470.
- Canessa C. M., Schild L., Buell G., Thorens B., Gautschi I., Horisberger J. D. & Rossier B. C., Amiloride-sensitive epithelial Na⁺ channel is made of three homologous subunits. *Nature*, 1994, 367, 463-467.
- Chang C. T., Bens M., Hummler E., Boulkroun S., Schild L., Teulon J., Rossier B. C. & Vandewalle A., Vasopressin-stimulated CFTR Cl⁻ currents are increased in the renal collecting duct cells of a mouse model of Liddle's syndrome. *J. Physiol (London)*, 2005, 562, 271-284.
- Dahlmann A., Pradervand S., Hummler E., Rossier B.C., Frindt G. & Palmer L. G., Mineralocorticoid regulation of epithelial Na⁺ channels is maintained in a mouse model for Liddle's syndrome. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 2003, 285, F310-F318.
- Djelidi S., Fay M., Cluzeaud F., Thomas-Soumarmon A., Bonvalet J. P., Farman N. & Blot-Chabaud M., Vasopressin stimulates long-term net chloride secretion in cortical collecting duct cells. *FEBS Lett.*, 1999, 460, 533-538.
- Duc C., Farman N., Canessa C. M., Bonvalet J. P. & Rossier B. C., Cell-specific expression of epithelial sodium channel α , β , and γ subunits in aldosterone-responsive epithelia from the rat: localization by *in situ* hybridization and immunocytochemistry. *J. Cell Biol.*, 1994, 127, 1907-1921.
- Duong Van Huyen J., Bens M. & Vandewalle A., Differential effects of aldosterone and vasopressin on chloride fluxes in transimmortalized mouse cortical collecting duct cells. *J. Membr. Biol.*, 1998, 16, 79-90.
- Ecelbarger C. A., Kim G. H., Wade J. B. & Knepper M., Regulation of the abundance of renal sodium transporters and channels by vasopressin. *Exp. Neurology*, 2001, 171, 227-234.
- Féraitille E., Mordasini D., Gonin S., Deschênes G., Vinciguerra M., Doucet A., Vandewalle A. Summa V., Verrey F. & Martin P. Y., Mechanism of control of Na, K-ATPase in principal cells of the mammalian collecting duct. *Ann. NY Acad. Sci.*, 2003, 986, 570-578.
- Firsov D., Schild L., Gautschi I., Merillat A.M., Schneeberger E. & Rossier B. C., Cell surface expression of the epithelial Na channel and a mutant causing Liddle syndrome: a quantitative approach. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93, 15370-15375.
- Frindt G. & Burg M. B., Effect of vasopressin on sodium transport in renal cortical collecting tubules. *Kidney Int.*, 1972, 1, 224-231.
- Frindt G., Silver R. B., Windhager E. E. & Palmer L. G., Feedback regulation of Na channels in rat CCT. III. Response to cAMP. *Am. J. Physiol.*, 1995, 268, F480-F489.
- Gonin S., Deschênes, Roger F., Bens M., Martin P.-Y., Carpentier J.-L., Vandewalle A., Doucet A. & Féraitille, E., Cyclic AMP increases cell surface expression of functional Na, K-ATPase units in mammalian cortical collecting duct principal cells. *Mol. Biol. Cell*, 2001, 13, 255-264.
- Grantham J. J. & Burg M. B., Effect of vasopressin and cyclic AMP on permeability of isolated collecting tubules. *Am. J. Physiol.*, 1966, 211, 255-259.
- Hall D. A. & Varney D. M., Effect of vasopressin on electrical potential difference and chloride transport in mouse medullary thick ascending limb of Henle's loop. *J. Clin. Invest.*, 1980, 66, 792-802.
- Hansson J. H., Nelson-Williams C., Suzuki H. Schild L., Shimkets R., Lu Y., Canessa C., Iwasaki T., Rossier B. C. & Lifton R. P., Hypertension caused by the truncated epithelial sodium channel γ subunit: genetic heterogeneity of Liddle syndrome. *Nat. Genet.*, 1995a, 11, 76-82.
- Hansson J. H., Schild L., Lu Y., Wilson T. A., Gautschi I., Shimkets R., Lu Y., Nelson-Williams C., Rossier B. C. & Lifton R. P., A *de novo* missense mutation of the β subunit of the epithelial sodium channel causes hypertension and Liddle syndrome, identifying a proline-rich segment critical for regulation of channel activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995b, 92, 11495-11499.
- Hawk C. T., Li L. & Schafer J. A., AVP and aldosterone at physiological concentrations have synergistic effects on Na⁺ transport in rat CCD. *Kidney Int. Suppl.*, 1996, 57, S35-S41.
- Hebert S. C., Culpepper R. M. & Andreoli T. E., NaCl transport in mouse medullary thick ascending limbs. I. Functional nephron heterogeneity and ADH-stimulated NaCl cotransport. *Am. J. Physiol.*, 1981, 241, F412-F431.
- Hopf A., Schreiber R., Mall M., Greger R. & Kunzelmann K., Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator inhibits epithelial Na⁺ channels carrying Liddle's syndrome mutations. *J. Biol. Chem.*, 1999, 274, 13894-13899.
- Hummler E., Barker P., Gatzky J., Beermann F., Verdumo C., Schmidt A., Boucher R. & Rossier B. C., Early death due to defective neonatal lung liquid clearance in α -ENaC-deficient mice. *Nat. Genet.*, 1996, 12, 325-328.
- Husted R. F., Volk K. A., Sigmund R. D. & Stokes J. B., Anion secretion by the inner medullary collecting duct: evidence for involvement of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J. Clin. Invest.*, 1995, 95, 644-650.
- Imbert-Teboul M., Chabardes D., Montegut M., Clique A. & Morel F., Vasopressin-dependent adenylate cyclase activities in the rat kidney medulla: evidence for two separate sites of action. *Endocrinology*, 1978, 102, 1254-1261.
- Ji H. L., Chalfant M. L., Jovov B., Lockhart J. P., Parker S. B., Fuller C. M., Stanton B. A. & Benos D. J., The cytosolic termini of the β - and γ -ENaC subunits are involved in the functional interactions between cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and epithelial sodium channel. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275, 27947-27956.
- Jiang Q., Li J., Dubroff R., Ahn Y. J., Foskett J. K., Engelhardt J. & Kleyman T. R., Epithelial sodium channels regulate cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channels in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275, 13266-13274.
- Kamynina E., Debonneville C., Bens M., Vandewalle A. & Staub O., A novel mouse Nedd4 protein suppresses the activity of the epithelial Na⁺ channel. *FASEB J.*, 2001, 15, 204-214.
- Kamynina E. & Staub O., Concerted action of ENaC, Nedd4-2, and Sgk1 in transepithelial Na⁺ transport. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 2002, 283, F377-F387.
- Knepper M. A., Nielsen S., Chou C. L. & DiGiovanni S. R., Mechanism of vasopressin action in the renal collecting duct. *Semin. Nephrol.*, 1994, 14, 302-321.
- Kurokawa T., Fukagawa M., Hayashi M. & Saruta T., Renal receptors and cellular mechanisms of hormone action in the kidney. In: The kidney: physiology and pathophysiology, Sel-din D. W., Giebisch G. (editors) New York, Raven Press, 1992, pp. 1339-1372.
- Kwon T. H., Hager H., Nejsum L. N., Andersen M. L., Frokiaer J. & Nielsen S., Physiology and pathophysiology of renal aquaporins. *Semin. Nephrol.*, 2001, 21, 231-238.

- Letz B. & Korbmacher C., cAMP stimulates CFTR-like Cl⁻ channels and inhibits amiloride-sensitive Na⁺ channels in mouse CCD cells. *Am. J. Physiol.*, 1997, 272, C657-C666.
- Liddle G. W., Bledsoe T. & Coppage W. S., A familial renal disorder simulating primary aldosteronism but with negligible aldosterone secretion. *Trans. Assoc. Am. Physicians*, 1963, 76, 199-213.
- Lingueglia E., Voilley N., Waldmann R., Lazdunski M. & Barbry P., Expression cloning of an epithelial amiloride-sensitive Na⁺ channel. A new channel type with homologies to *Caenorhabditis elegans* degenerins. *FEBS Lett.*, 1993, 318, 95-99.
- Marunaka Y. & Eaton D. C., Effects of vasopressin and cAMP on single amiloride-blockable Na channels. *Am. J. Physiol.*, 1991, 260, C1071-C1084.
- Marunaka Y. & Eaton D. C., Effects of vasopressin and cAMP on single amiloride-blockable Na channels. *Am. J. Physiol.*, 1991, 260, C1071-C1084.
- May A., Puoti A., Gaeggeler H. P., Horisberger J. D., & Rossier B. C., Early effect of aldosterone on the rate of synthesis of the epithelial sodium channel α subunit in A6 renal cells. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 1997, 8, 1813-1822.
- McDonald F. J., Price M. P., Snyder P. M. & Welsh M. J., Cloning and expression of the β - and γ -subunits of the human epithelial sodium channel. *Am. J. Physiol.*, 1995, 268, C1157-C1163.
- Nakhoul N. L., Hering-Smith K. S., Gambal C. T. & Hamm L. L., Regulation of sodium transport in M61 Cells. *Am. J. Physiol.*, 1998, 275, F998-F1007.
- Ostrowski N. L., Lotait S. J., Bradley D. J., O'Carroll A. M., Brownstein M. J. & Young III S. J., Distribution of V1a and V2 vasopressin receptors messenger ribonucleic acids in rat liver, kidney, pituitary and brain. *Endocrinology*, 1992, 133, 1849-1859.
- Pradervand S., Wang Q., Burnier M., Beermann F., Horisberger J. D., Hummler E. & Rossier B. C., A mouse model for Liddle's syndrome. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 1999, 10, 2527-2533.
- Pradervand S., Vandewalle A., Bens M., Gautschi I., Löffling J., Hummler E., Schild L. & Rossier B. C., Dysfunction of the epithelial sodium channel expressed in the kidney of a mouse model for Liddle syndrome. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2003, 14, 2219-2228.
- Prat A. G., Ausiello D. A. & Cantiello H. F., Vasopressin and protein kinase A activate G protein-sensitive epithelial Na channels. *Am. J. Physiol.*, 1993, 265, C218-C223.
- Reif M. C., Troutman S. L. & Schafer J. A., Sodium transport by rat cortical collecting tubule. Effects of vasopressin and desoxycorticosterone. *J. Clin. Invest.*, 1986, 77, 1291-1298.
- Rossier B. C. & Palmer L. G., Mechanisms of aldosterone action on sodium and potassium transport. In: *The kidney: physiology and pathophysiology*. Seldin D. W., Giebisch G. (editors), New York, Raven Press, 1992, pp. 1373-1409.
- Rubera I., Löffling J., Palmer L. G., Frindt G., Fowler-Jaeger N., Sauter D., Carroll T., McMahon A., Hummler E. & Rossier B. C., Collecting duct-specific gene inactivation of α ENaC in the mouse kidney does not impair sodium and potassium balance. *J. Clin. Invest.*, 2003, 112, 554-565.
- Sasaki S. & Imai M., Effects of vasopressin on water and NaCl transport across the *in vitro* perfused medullary thick ascending limb of Henle's loop of mouse, rat, and rabbit kidneys. *Pflugers Arch.*, 1980, 383, 215-221.
- Shimkets R. A., Lifton R. P. & Canessa C. M., The activity of the epithelial sodium channel is regulated by clathrin-mediated endocytosis. *J. Biol. Chem.*, 1997, 272, 25537-25541.
- Shimkets R. A., Warnock D. G., Bositis C. M., Nelson-Williams C., Hansson J. H., Schambelan M., Gill J. R. Jr, Ulrik S., Milora R. V., Findling J. W., Canessa C. M., Rossier B. C. & Lifton R. P., Liddle's syndrome: heritable human hypertension caused by mutations in the β subunit of the epithelial sodium channel. *Cell*, 1994, 79, 407-414.
- Schild L., Lu Y., Gautschi I., Schneeberger E., Lifton R. P. & Rossier B. C., Identification of a PY motif in the epithelial Na channel subunits as a target sequence for mutations causing channel activation found in Liddle syndrome. *EMBO J.*, 1996, 15, 2381-2387.
- Schlatter E. & Schafer J. A., Electrophysiological studies in principal cells of rat cortical collecting tubules. ADH increases the apical membrane Na⁺-conductance. *Pflugers Arch.*, 1987, 409, 81-92.
- Snyder P. M., Price P. M., McDonald F. J., Adams C. M., Volk K. A., Zeiher B. G., Stokes J. B. & Welsh M. J., Mechanism by which Liddle's syndrome mutations increase activity of a human epithelial Na⁺ channel. *Cell*, 1995, 83, 969-978.
- Snyder P. M., Liddle's syndrome mutations disrupt cAMP-mediated translocation of the epithelial Na⁺ channel to the cell surface. *J. Clin. Invest.*, 2000, 105, 45-53.
- Snouwaert J. N., Brigman K. K., Latour A. M., Malouf N. N., Boucher R. C., Smithies O. & Koller B. H., An animal model for cystic fibrosis made by gene targeting. *Science*, 1992, 257, 1083-1088.
- Stokes J. B., Ion transport in the cortical and outer medullary collecting tubule. *Kidney Int.*, 1982, 22, 473-484.
- Stutts M. J., Canessa C. M., Olsen J. C., Hamrick M., Cohn J. A., Rossier B. C. & Boucher R. C., CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels. *Science*, 1995, 269, 847-850.
- Summa V., Mordasini D., Roger F., Bens M., Martin P. Y., Vandewalle A., Verrey F. & Feraille E., Short term effect of aldosterone on Na, K-ATPase cell surface expression in kidney collecting duct cells. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276, 47087-47093.
- Tamura H., Schild L., Enomoto N., Matsui N., Marumo F., Rossier B. C. & Sasaki S., Liddle disease caused by a missense mutation of β subunit of the epithelial sodium channel gene. *J. Clin. Invest.*, 1996, 97, 1780-1784.
- Terada Y., Tomita K., Nonoguchi H. & Yang T., Different localization and regulation of two types of vasopressin receptors messenger RNA in microdissected rat nephron segments using reverse transcription polymerase chain reaction. *J. Clin. Invest.*, 1993, 76, 132-136.
- Vandewalle A., Bens M. & Duong Van Huyen J. P., Immortalized kidney epithelial cells as tools for hormonally-regulated ion transport studies. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, 1999, 8, 581-587.
- Vandorpe D., Kizer N., Ciampollilo F., Moyer B., Karson K., Guggino W. B. & Stanton B. A., CFTR mediates electrogenic chloride secretion in mouse inner medullary collecting duct (mIMCD-K2) cells. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, 1995, 269, C683-C689.
- Van Huyen J. P., Bens M., Teulon J. & Vandewalle A., Vasopressin-stimulated chloride transport in transimmortalized mouse cell lines derived from the distal convoluted tubule and cortical and inner medullary collecting ducts. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2001, 16, 238-245.
- Verkman A. S. & Mitra A. K., Structure and function of aquaporin water channels. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, 2000, 278, F13-F28.
- Verrey F., Antidiuretic hormone action in A6 cells: effect on apical Cl and Na conductances and synergism with aldosterone for NaCl reabsorption. *J. Membr. Biol.*, 1994, 138, 65-76.
- Wangemann P., Wittner M., Di Stefano A., Englert H. C., Lang H. J., Schlatter E. & Greger R., Cl⁻-channel blockers in the thick ascending limb of the loop of Henle. Structure activity relationship. *Pflugers Arch.*, 1986, 407, S128-S141.
- Wong S. M. & Chase H. S. Jr., Effect of vasopressin on intracellular [Ca] and Na transport in cultured toad bladder cells. *Am. J. Physiol.*, 1988, 255, F1015-F1024.