

UNIVERSITE LOUIS PASTEUR DE STRASBOURG

THESE

Présentée pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LOUIS PASTEUR DE STRASBOURG

Discipline : Sciences du Vivant

Spécialité : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

par

Sandra Welsch

**Dérégulation de la Protéine Apparentée à l'Hormone
Parathyroïde (PTHrP) et du Récepteur PTH/PTHrP
(Récepteur PTH1) dans l'Hypertension Artérielle en
réponse à l'Angiotensine II**

*Laboratoire de Pharmacologie et Physiopathologie Rénales
U727 INSERM-ULP (Directeur : Dr JJ. Helwig)
Faculté de Médecine, Strasbourg*

Soutenue le 21 juin 2005 devant la commission d'examen :

P. Corvol	Examineur
A. Parini	Rapporteur externe
V. Schini-Kerth	Rapporteur interne
C. Silve	Rapporteur externe
JJ. Helwig	Examineur
M. Barthelmebs	Directeur de thèse

*« Les os peuvent se briser,
Les muscles s'atrophier,
Les glandes peuvent tarir,
Le cerveau lui-même peut s'endormir
Sans mettre en danger la vie.
Mais que les reins défont
Et c'est la mort des os, des glandes et du cerveau... »*

W. Homer Smith – Fish to Philosopher (1953)

A mes grands-parents

A Eric

A mes parents

A ma sœur

A ma famille

A tous ceux qui me sont chers

Je les remercie pour leur soutien constant, leur aide et leur réconfort durant toutes ces années, qu'ils trouvent dans ce mémoire le témoignage de toute mon affection et de ma profonde reconnaissance.

Remerciements

Je remercie profondément **Madame le Docteur Mariette Barthelmebs**, Directrice de recherche au CNRS, qui a assuré la direction de ce travail et m'a initiée à la recherche. Je lui suis particulièrement reconnaissante pour son accessibilité, sa disponibilité et pour tout le temps qu'elle a consacré à ma thèse. Je la remercie de m'avoir accordé sa confiance et prodigué son aide durant mon séjour au laboratoire.

Je remercie chaleureusement le **Docteur Jean-Jacques Helwig**, Directeur de recherche à l'INSERM et Directeur du Laboratoire de Pharmacologie et Physiopathologie Rénale, pour m'avoir accueillie au sein de son unité, pour son écoute, son appui ainsi que pour son investissement dans ce travail.

J'exprime toute ma reconnaissance envers les membres de mon jury de thèse, **Mesdames le Docteur Caroline Silve et le Professeur Valérie Schini-Kerth**, **Messieurs le Professeur Pierre Corvol et le Docteur Angelo Parini** qui me font l'honneur d'accepter de juger ce travail.

Je remercie également vivement le **Docteur Thierry Massfelder**, Chargé de recherche à l'INSERM pour m'avoir initié à la biologie moléculaire, pour sa disponibilité, ses compétences scientifiques, ses précieux conseils, et sa collaboration dans une ambiance toujours joyeuse et efficace.

Mes remerciements très particuliers vont à **Monsieur Eric Schordan**, pour son aide quotidienne, son réconfort et son soutien moral dans toutes mes démarches. Je lui suis reconnaissante de m'avoir épaulée en toutes circonstances et supportée jour après jour durant toutes ces années. Merci à toi.

Cette thèse est l'occasion d'exprimer mes remerciements les plus chaleureux à l'ensemble des membres du Laboratoire de Pharmacologie et Physiopathologie Rénale qui ont tous participé à la réalisation de ce travail.

A **Madame Sylvie Rothhut**, pour son amitié chaleureuse, son dévouement, sa disponibilité ainsi que pour l'intérêt qu'elle a porté à mon travail.

A **Mesdames Suzanne Wendling, Virginie Roques et Danièle Kuhlwein** pour leur aide technique et les travaux de secrétariat.

A **Monsieur Alain Lambert**, ingénieur à l'INSERM, pour sa précieuse aide technique en physiologie.

A **Madame Catherine Coquard** pour sa sympathie et sa bonne humeur.

A tous mes amis du laboratoire, **Mesdemoiselle Sabrina Danilin et Carole Sourbier**, et **Monsieur Abdelali Agouni** ainsi que **Messieurs les Docteurs Benoît Escande et Samuel Fritsch**, pour leur sympathie, leur soutien et leur bonne humeur quotidienne.

Qu'ils trouvent tous ici l'expression de mon entière reconnaissance.

Abréviations

AC : adénylate cyclase

ADN : acide désoxyribonucléique

AGT : angiotensinogène

AMPc : adénosine monophosphate cyclique

Ang I : angiotensine I

Ang II : angiotensine II

ANP : peptide natriurétique atrial

ARNm : acide ribonucléique messenger

ATP : adénosine triphosphate

BSA : sérum albumine de bœuf

Bmax : capacité maximale de liaison

CaR : récepteur sensible au calcium

CE₅₀ : concentration efficace 50

CML : cellule musculaire lisse (**r** : rat, **m** : souris)

- **Ao** : aortique
- **Rv** : rénovasculaire
- **V** : vasculaires

CRE : élément répondant à l'AMPc

DAG : diacylglycérol

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

DOCA: acétate de déoxycorticostérone

ECA: enzyme de conversion de l'angiotensine I

EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique

EGF : facteur de croissance épithélial

FBS : sérum foetal de bœuf

FGF : facteur de croissance fibroblastique

GAPDH : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

GC : guanylate cyclase

GMPc : guanosine monophosphate cyclique

GRKs : kinases des récepteurs couplés aux protéines G

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène

HMM : hypercalcémie humorale maligne

HTA : hypertension artérielle

HTLV-1 : human T cell leukemia virus de type 1

IGF : insuline growth factor

IL-1 : interleukine 1

IP-3 : inositol triphosphate

i.a. : intra-artériel

i.p. : intra-péritonéal

i.v. : intra-veineux

NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate déshydrogénase

NHERF : Na/H exchanger regulatory factor

NLS: signal de location nucléaire

NO: monoxyde d'azote

NOS : synthase du monoxyde d'azote

O₂⁻ : anion superoxide

PBS : phosphate buffer saline

pcDNA : plasmide complementary désoxyribonucléic acid

PKA : protéine kinase A

PKC : protéine kinase C

PLC : phospholipase C

PMSF : phénylméthyl-sulfonyl fluorure

PTH : hormone parathyroïdienne

PTHrP: protéine apparentée à l'hormone parathyroïdienne

RCPG : récepteurs couplés aux protéines G

ROS : espèces réactives de l'oxygène

R-PTH1 : récepteur à l'hormone parathyroïdienne de type 1

RT-PCR : transcription réverse-réaction de polymérisation en chaîne

RVR : résistance vasculaire rénale

SHR : rat spontanément hypertendu

NLS : signal de localisation nucléaire

SOD : superoxyde dismutase

SRA : système rénine-angiotensine

TIP 39: peptide tubéroinfundibulaire de 39 acides aminés

TGF-β: facteur de croissance tumoral

TNF-α: facteur de nécrose tumorale

WKY : Wistar Kyoto

Sommaire

Abréviations	5
Préface.....	12
CHAPITRE I : Introduction Bibliographique	13
La Protéine Apparentée à l'Hormone Parathyroïdienne	14
De l'hypercalcémie maligne à la PTHrP.....	14
L'HHM, une vieille histoire.....	14
Caractérisation et isolement de la PTHrP	15
PTHrP et HHM.....	15
Structure du gène	16
Région promotrice.....	17
Région codante.....	18
Région 3'.....	19
La PTHrP, une famille de peptides.....	19
Séquence signal prépro.....	20
Le fragment N-terminal : PTHrP(1-36).....	21
Les fragments intermédiaires.....	21
Le fragment C-terminal : PTHrP(107-139).....	22
Le fragment C-terminal extrême : PTHrP(141-173).....	22
Autres traitements post-traductionnels.....	23
Variations dans les fragments de la PTHrP.....	23
Modes d'action de la PTHrP.....	24
Mode de sécrétion.....	24
Action endocrine, paracrine ou autocrine.....	24
Action intracrine.....	25
Régulation de l'expression de la PTHrP.....	26
L'AMPc.....	28
Les facteurs de croissance et les cytokines.....	28
Vasoconstricteurs et PKC.....	28
Les hormones stéroïdes.....	28
Le calcium.....	29
Conditions physiologiques et pathologiques.....	29
Principaux effets biologiques de la PTHrP.....	30
PTHrP et carcinome.....	30
Développement du fœtus.....	31
Glande mammaire et lactation.....	32
La peau : épiderme, derme et follicule pileux.....	32
Le squelette.....	32
Le système nerveux central.....	33
Le foie.....	33
Les poumons.....	33
Le système endocrine.....	34
Le muscle lisse.....	34
Conclusions.....	35
Le Récepteur PTH/PTHrP ou R-PTH1 et les autres Récepteurs de la PTH ou PTHrP	36
Structure du gène	38

Relations structure activité	41
Domaine N-terminal extra-cellulaire.....	41
Région juxtamembranaire.....	41
Dimérisation.....	43
Résidus cystéine extra-cellulaires.....	43
Sites de N-glycosylation.....	43
Activation du récepteur, signalisation intracellulaire	44
Interaction du R-PTH1 avec NHERF	45
Désensibilisation et internalisation du R-PTH1	45
Régulation de l'expression du R-PTH1	47
R-PTH1 et désordres génétiques	48
La chondrodysplasie de Jansen.....	48
La chondrodysplasie de Blomstrand.....	49
Le Récepteur PTH-2 ou R-PTH2	49
Structure du R-PTH2.....	50
Profil pharmacologique.....	50
Voies de signalisation.....	51
Distribution tissulaire et fonctions.....	51
Le Récepteur PTH-3 ou R-PTH3	52
Les Récepteurs hypothétiques pour des fragments de la PTHrP	53
Le couple PTHrP / R-PTH1 dans le système cardiovasculaire	53
Expression dans le cœur	53
Fonctions cardiaques	54
Expression dans les vaisseaux	55
Effets sur la pression artérielle	56
Effets vasorelaxants	58
La voie de l'AC/PKA.....	58
La voie PLC/PKC et le calcium intracellulaire.....	58
La voie NOS/guanylate soluble.....	59
Effets trophiques de la PTHrP	59
Inhibition autocrine/paracrine de la prolifération des CMLV.....	59
Stimulation intracrine de la prolifération des CMLV : ciblage vers le noyau / NLS.....	60
Le système PTHrP / R-PTH1 dans le rein	61
Expression dans la PTHrP	61
Effets tubulaires	61
Effets vasculaires et glomérulaires	62
Système rénine-angiotensine	64
Le système PTHrP / R-PTH1 en physiopathologie (autre que HTA)	65
Insuffisance rénale chronique	65
Insuffisance rénale aigüe	66
Ischémie	66

Resténose artérielle et athérosclérose.....	66
Pathologies inflammatoires.....	67
Régime alimentaire.....	67
Age.....	67
Le système PTHrP / R-PTH1 dans l'HTA.....	71
Le rein dans l'hypertension artérielle.....	71
Le rein et la régulation physiologique de la pression artérielle.....	71
Les expériences de transplantations rénales croisées.....	71
Le rein, coupable et victime.....	72
Modèles animaux d'HTA.....	72
Rats spontanément hypertendus (SHR).....	73
Rats DOCA-sel.....	74
Les altérations hémodynamiques rénales dans l'HTA.....	74
Augmentation de la RVR.....	74
Altération de la natriurèse de pression.....	75
Augmentation du rétrocontrôle tubuloglomérulaire.....	75
Réponse aux vasoconstricteurs et vasodilatateurs : rôle des protéines G et de l'endothélium.....	76
Hypertrophie / hyperplasie des parois vasculaires rénales.....	76
Réponse exagérée aux agents mitogènes.....	76
HTA et stress oxydatif.....	78
Origine des ROS vasculaires.....	79
Régulation des NADPH oxydases par l'Ang II.....	79
Stress oxydatif et Ang II chez le SHR.....	81
Système rénine-angiotensine rénal chez le SHR.....	82
PTH, PTHrP et R-PTH1 dans l'HTA.....	83
Hyperparathyroïdisme primaire et HTA.....	83
Parathyroïde et HTA.....	84
Surexpression vasculaire de la PTHrP : Ang II et stretch.....	84
Surexpression vasculaire de la PTHrP chez le SHR.....	85
Dérégulation du R-PTH1 chez le SHR.....	85
PTHrP et prolifération des CMLRv du SHR.....	85
Transfert in vivo du gène du R-PTH1 chez le SHR.....	86
Objectifs de cette thèse.....	87

CHAPITRE II : Matériel et Méthodes..... 89

Les animaux.....	90
Approches expérimentales <i>in vitro</i>.....	90
Le rein isolé perfusé.....	90
Le lit vasculaire mésentérique isolé perfusé.....	92
Approches expérimentales <i>in vivo</i>.....	93
Hémodynamique rénale et mésentérique : débitmétrie électromagnétique.....	93
Traitement des SHR par le losartan.....	95
Induction d'une hypertension artérielle DOCA-sel.....	95
Mesure de la pression artérielle par méthode sphygmomanométrique.....	96
Cultures cellulaires.....	96
Mise en culture de cellules musculaires lisses rénovasculaires (CMLRv).....	96
Mise en culture de cellules musculaires lisses aortiques (CMLAo).....	97

Protocole de stretch mécanique des cellules.....	97
Effets de l'ANG II et/ou du losartan sur l'expression du R-PTH1.....	97
Stabilité de l'ARNm du R-PTH1.....	98
Transfection des cellules par des constructions P1-luciférase et P2-luciférase.....	98
Mesure de l'activité transcriptionnelle des promoteurs P1 et P2.....	99
Transfection des cellules de souris par la Cre-recombinase.....	100
Techniques biochimiques et biomoléculaires.....	100
Isolement des vaisseaux et autres organes.....	100
Evaluation de l'expression de l'ARNm par RT-PCR.....	101
Evaluation de l'expression de la protéine du R-PTH1 par Western blot.....	103
Expression des Résultats.....	104

CHAPITRE III : La dérégulation du R-PTH1 : une spécificité rénale chez le SHR ?.....105

Introduction.....	106
Résultats.....	107
<i>La diminution, chez le SHR adulte, de la vasodilatation rénale induite par la PTHrP(1-36) est aussi une réalité in vivo</i>	<i>107</i>
<i>La vasodilatation induite par la PTHrP(1-36) sur le lit vasculaire mésentérique n'est pas altérée chez le SHR adulte.....</i>	<i>108</i>
<i>La baisse de l'expression du R-PTH1 chez le SHR adulte est une particularité réno-vasculaire.....</i>	<i>108</i>
<i>L'hyporéactivité vasculaire à la PTHrP chez le SHR diffère de celle à l'isoprotérénol.....</i>	<i>109</i>
<i>La réponse vasodilatatrice rénale et l'expression du R-PTH1 ne sont pas modifiés chez le SHR de 4 semaines.....</i>	<i>110</i>
<i>SHR traitement losartan.....</i>	<i>110</i>
<i>Rats DOCA-sel.....</i>	<i>110</i>
<i>Surexpression de la PTHrP.....</i>	<i>111</i>
Discussion.....	121
Publication (soumise à Hypertension).....	123
« <i>Downregulation of type 1 PTH/PTHrP receptor is not a general feature in the cardiovascular system in hypertensive rats</i> »	

CHAPITRE IV : Mécanismes d'action de l'Ang II dans la dérégulation du R-PTH1.....140

Introduction.....	141
Résultats.....	142
<i>L'Ang II, via l'activation du récepteur AT1, diminue l'expression du R-PTH1 sur les CMLRv et les CMLAo.....</i>	<i>142</i>
<i>L'Ang II n'affecte pas l'activité des promoteurs P1 et P2 contrôlant la transcription du gène du R-PTH1 mais diminue la stabilité de son ARNm.....</i>	<i>143</i>

<i>La déstabilisation par l'Ang II de l'ARNm du R-PTH1 dépend de la PTHrP active par voie intracrine.....</i>	<i>143</i>
<i>La dérégulation du R-PTH1 par l'étirement mécanique des CMLRv met en jeu l'Ang II.....</i>	<i>145</i>
<i>L'ARNm du R-PTH1 est déstabilisé sur des CMLRv provenant de SHR.....</i>	<i>145</i>
Discussion.....	153
Publication (Soumise à Circulation Research).....	156
<i>« Angiotensin II-Induced Parathyroid Hormone(PTH)-Related Protein Acts Through the Intracrine Pathway to Destabilize PTH1 Receptor mRNA in Vascular Smooth Muscle »</i>	
Conclusions.....	174
Résumé.....	176
Références Bibliographiques.....	182

Préface

La protéine apparentée à l'hormone parathyroïdienne, plus communément appelée PTHrP, est un peptide découvert en 1987, lors de recherches sur l'agent responsable de l'hypercalcémie humorale maligne. La PTHrP est impliquée dans de nombreux processus physiologiques tels que le développement et l'homéostasie du calcium. Elle exerce également, des effets marqués sur le système cardiovasculaire et rénal, essentiellement en activant le récepteur PTH/PTHrP ou R-PTH1. Au niveau des vaisseaux, cette activation entraîne une vasodilatation, responsable *in vivo* d'un effet hypotenseur ¹. Au niveau rénal, la PTHrP induit une vasodilatation responsable d'une augmentation du débit de filtration glomérulaire chez le rat ¹ mais aussi chez l'homme ². Le R-PTH1 est par ailleurs aussi impliqué dans les effets tubulaires de la PTHrP conduisant à une diminution de la réabsorption du sodium et des phosphates et à une augmentation de la réabsorption du calcium. Par ces effets vasculaires et rénaux, le système PTHrP/R-PTH1 est susceptible de participer à la régulation de la pression artérielle. Une démonstration claire de ce rôle n'a cependant pas pu être obtenue chez des souris présentant une délétion du gène de la PTHrP ou du R-PTH1 puisque ces souris ne sont pas viables ³. Cependant, des souris transgéniques surexprimant la PTHrP ou le R-PTH1 présentent une baisse de leur pression artérielle ^{4,5}. De même, la pression artérielle était abaissée ainsi que la résistance vasculaire rénale (RVR) après transfert *in vivo*, chez le rat normotendu, du gène codant pour le R-PTH1 conduisant à une surexpression vasculaire du récepteur ⁶. Ces travaux montrent que la PTHrP endogène est capable d'exercer des effets hémodynamiques et que le taux d'expression du R-PTH1 en est un facteur limitant.

Des travaux antérieurs réalisés dans mon laboratoire d'accueil chez des rats spontanément hypertendus (SHR) ont de même mis en évidence le rôle central de la dérégulation du R-PTH1 dans les altérations hémodynamiques rénales associées à ce modèle d'hypertension artérielle (HTA) génétique. En effet, chez des SHR adulte, la PTHrP était surexprimée dans les vaisseaux intra-rénaux alors que l'expression du R-PTH1 y était abaissée. Ceci allait de pair avec une baisse de la vasodilatation rénale à la PTHrP évaluée *in vitro*, sur le rein isolé perfusé ^{7,8}. Le transfert *in vivo* du gène du R-PTH1 chez le SHR adulte, restaurait l'expression vasculaire du R-PTH1, la vasodilatation rénale à la PTHrP et abaissait la RVR préalablement élevée chez le SHR ⁸.

Le travail de cette thèse se situe en continuité de ces travaux antérieurs de mon laboratoire et aborde plus précisément les mécanismes impliqués dans la régulation du R-PTH1. Dans la première partie, les mécanismes de régulation du R-PTH1 ont été évalués à travers des approches *in vivo* et *ex vivo*, en utilisant à la fois des SHR adultes et jeunes et des rats ayant une HTA induite par un traitement DOCA-sel. Les résultats obtenus m'ont conduit à m'intéresser plus particulièrement par la suite aux effets de l'angiotensine II (Ang II) comme facteur de régulation du R-PTH1. C'est pourquoi, dans la seconde partie de mon travail expérimental, la dérégulation de l'expression du R-PTH1 par l'Ang II a été étudiée sur des cellules de muscle lisse vasculaire (CMLV) en culture. Dans l'introduction bibliographique, je ferai le point sur les connaissances actuelles concernant le système PTHrP/R-PTH1 dans des conditions normales et pathologiques, en particulier dans l'HTA, avant d'exposer mes propres travaux expérimentaux.

CHAPITRE I

Introduction bibliographique

Le système PTHrP/R-PTH1

La Protéine Apparentée à l'Hormone Parathyroïdienne

De l'hypercalcémie humorale maligne à la PTHrP

La protéine apparentée à l'hormone parathyroïdienne appelée PTHrP a été découverte en 1987, simultanément dans trois laboratoires différents⁹⁻¹¹. Elle a été identifiée au cours de la recherche du facteur tumoral responsable de l'hypercalcémie humorale maligne ou HHM. L'HHM est le plus commun des syndromes paranéoplasiques. Elle est décrite en association à des tumeurs solides telles que les carcinomes du sein, du rein, du poumon, de l'œsophage, du larynx, de l'ovaire et de la vessie, sans métastases osseuses. Ce syndrome est caractérisé par une hypercalcémie et une hypophosphatémie rappelant l'hyperparathyroïdisme primaire, mais il s'en différencie notamment par des taux circulants de PTH bas.

□ L'HHM, une vieille histoire

L'hypercalcémie a été décrite chez des patients cancéreux dès la mise au point des méthodes de mesure du calcium sérique dans les années 20¹². A cette époque, l'hypercalcémie maligne était associée aux métastases osseuses et semblait, par conséquent, résulter de la résorption osseuse liée à l'invasion de cellules tumorales.

Mais en 1941, F. Albright découvre chez un patient ayant un carcinome rénal et peu de métastases, l'existence d'une hypercalcémie associée à une hypophosphatémie qui sont toutes deux réversées après éradication de la tumeur. Il émet alors l'hypothèse de l'existence d'un facteur hypercalcémiant phosphaturique circulant qui pourrait être l'hormone parathyroïdienne (PTH), mais la nature exacte de ce facteur ne fut déterminée que dans les années 1980.

Entre temps, d'autres facteurs ont été évoqués occasionnellement (vitamine D, prostaglandines) avant que les espoirs ne se portent après 1960 sur la PTH produite ectopiquement par les tumeurs¹³⁻¹⁶.

Dans les années 80, le syndrome de l'HHM est de mieux en mieux caractérisé biochimiquement. L'analogie entre les patients atteints d'HHM et ceux présentant un hyperparathyroïdisme primaire est certaine (hypercalcémie, hypophosphatémie), mais l'HHM se distingue par une réduction des concentrations circulantes de PTH et de 1,25-dihydroxyvitamine D, ainsi qu'une plus grande excrétion fractionnelle du calcium^{17,18}. D'autre part, le taux de résorption osseuse est compensé par sa néoformation dans l'hyperparathyroïdisme, alors que la perte osseuse est majeure dans l'HHM. Ceci élimine l'hypothèse de la PTH comme facteur responsable de l'HHM. L'observation d'une augmentation de sécrétion d'AMPc néphrogénique dans l'HHM a été utilisée par la suite pour identifier le facteur recherché¹⁹.

Les expériences menées *in vitro*, montrent que des extraits tumoraux associés à l'HHM stimulent la voie de l'adénylate cyclase (AC) PTH-dépendante sur le rein et l'os^{17,20}. Le facteur incriminé est par conséquent capable de se lier au récepteur de la PTH. L'activation de l'AC est inhibée par un antagoniste

spécifique de la PTH, le (⁸Nle, ¹⁸Nle, ³⁴Tyr) bPTH(3-34) amide ²¹, mais non par un anticorps dirigé contre la PTH. Burtis montre par la suite que les extraits de tumeur, ou le milieu de culture conditionné par des tumeurs associées à l'HMM, contiennent une protéine (ou une famille de protéines) qui stimule le système AC PTH-dépendant dans des membranes corticales rénales de chien, mais dont la taille est supérieure à celle de la PTH elle-même. Il identifie une protéine de 17 kD qui mime les effets de la PTH ⁹.

❑ **Caractérisation et isolement de la PTHrP**

Finalement, en 1987, les techniques de stimulation d'AC permettent simultanément à trois laboratoires de New Haven (USA), Melbourne (Australie) et San Francisco (USA) d'identifier et de purifier le facteur responsable de ce syndrome ⁹⁻²². Durant toute cette recherche, ce facteur a porté différents noms tels que protéine stimulant l'AC, facteur de l'HMM, facteur hypercalcémiant humain, pour finalement être dénommé « protéine apparentée à l'hormone parathyroïdienne » ou PTHrP. Ce nom rappelle l'homologie de séquence de la partie N-terminale de ce facteur avec la PTH. En effet, 8 des 13 premiers acides aminés de la PTHrP sont identiques à ceux de la PTH bovine et de rat, les séquences divergeant totalement au-delà du 13^{ème} acide aminé (figure I-1).

L'isolement de l'ADN complémentaire a permis le séquençage complet de la PTHrP ^{23,24}. L'ADNc est un fragment de 2 kb ²⁴ qui code pour une protéine de 177 acides aminés, constituée d'une séquence prépropeptidique de 36 acides aminés et d'un peptide mature de 141 acides aminés. Ce séquençage complet de la PTHrP a permis de confirmer l'homologie de séquence entre les 13 premiers acides aminés de la PTH et la PTHrP. Cette partie N-terminale est un domaine connu depuis longtemps pour être important dans la liaison au récepteur de la PTH ²⁵. La PTHrP partage avec la PTH ses propriétés phosphaturiques et hypocalciuriques liées à l'activation de ce récepteur sur le tubule rénal. Les études de biologie moléculaire ont révélé la présence de multiples ARNm de ce peptide, que les transcrits soient de tumeurs associées à l'HMM ou de cellules humaines normales (kératinocytes). Les analyses par Southern blot réalisées sur l'ADN humain ont démontré la présence du gène sous forme d'une seule copie, codant pour trois protéines de 139, 141 et 173 acides aminés par épissage alternatif du pré-messager ²⁶.

❑ **PTHrP et hypercalcémie humorale maligne**

La PTHrP est un facteur produit et sécrété par les tumeurs, dont les cibles sont essentiellement l'os et le rein. De part sa sécrétion par les tumeurs, elle a avant tout été considérée comme une protéine délétère responsable des HMM. En effet, l'hypercalcémie chez les patients atteints de cancer est le plus souvent sévère (concentrations sériques en calcium à 12 mg.dl⁻¹) ²⁷ et synonyme de mauvais pronostic puisque la survie moyenne est estimée à environ six semaines ^{27,28}. Contrairement à l'hyperparathyroïdisme qui se développe lentement, l'hypercalcémie chez les patients atteints de cancer survient brusquement. Par ailleurs, il est intéressant de noter que les taux sériques de PTHrP sont augmentés chez 80 % des patients développant un cancer, notamment chez ceux porteurs de tumeurs solides ^{29,30}.

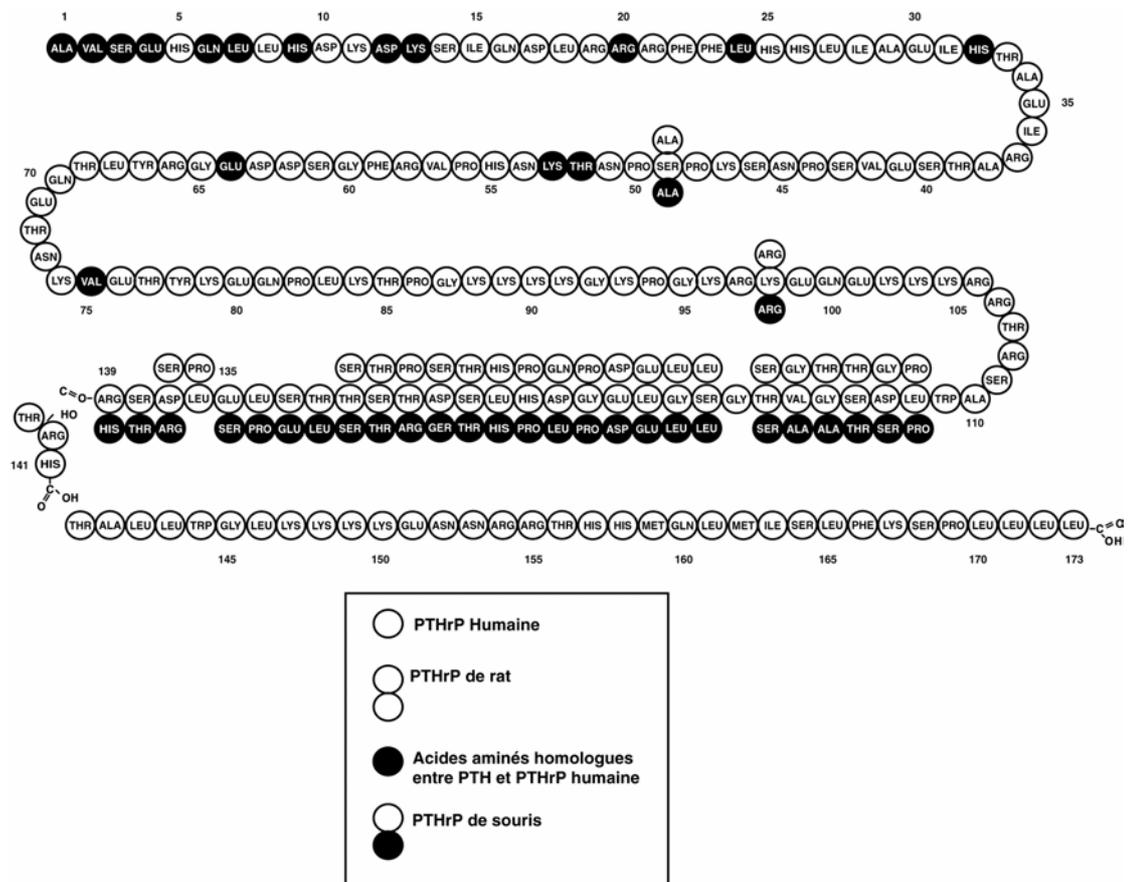


Figure I-1 : Structure primaire de la PTHrP humaine, de rat et de souris. Les trois isoformes de la PTHrP humaine (139, 141 et 173 acides aminés) sont schématisées. La PTHrP de rat comporte 141 acides aminés et celle de souris en comporte 139.

Structure du gène

La structure du gène de la PTHrP a été décrite au début des années 1990 chez l'homme, le rat et la souris³¹⁻³⁴. Le gène de la PTHrP humaine s'étend sur plus de 15 kb et est situé sur le bras court du chromosome 12 dans une position homologue au gène de la PTH situé sur le chromosome 11 (figure I-2). Ces deux chromosomes portent plusieurs gènes appartenant à la même famille, comme par exemple les isoformes A et B de la lactate déshydrogénase (LDH) et les formes H et K du gène ras³⁵. Les gènes sont donc probablement issus de la duplication d'un chromosome ancestral commun. L'analyse de leur structure génomique a montré que le gène de la PTHrP était beaucoup plus complexe que celui de la PTH¹². Les structures comparatives vous sont représentées sur la figure I-2. Le gène humain de la PTHrP comporte 9 exons et code pour trois ARNm différents qui donnent naissance à trois protéines de 139, 141 et 173 acides aminés ne différant que par leur partie C-terminale.

En revanche, chez d'autres espèces animales comme le rat, la souris, le poulet ou le chien, le gène de la PTHrP présente une organisation plus simple que celle de l'homme^{12,36-38}. Chez le rat, le gène de la PTHrP est situé sur le chromosome 4, s'étend sur 13 kb et comporte 5 exons³⁹. Chez la souris, le gène est situé sur le chromosome 6 et présente une organisation semblable à celle du rat. Cependant, l'isoforme majoritairement rencontrée chez la souris est une PTHrP de 139 acides aminés, en raison de la délétion des codons 130 et 131⁴⁰.

□ Région promotrice

Chez l'homme, le gène de la PTHrP comporte 9 exons, dont l'exon 6 code pour la majeure partie de la PTHrP, et 3 éléments promoteurs. Les promoteurs P1 et P3 consistent en des boîtes « TATA » classiques, qui se situent respectivement en amont de l'exon I et entre l'exon III et IV. Mis à part ces boîtes « TATA », ces éléments ne contiennent aucune séquence consensus^{37,41,42}. Le promoteur P2 est une séquence riche en « GC »⁴³ située entre l'exon II et III, contenant de nombreux sites de liaison pour les facteurs de transcription comme par exemple SP-1, ce qui suggère une régulation complexe de l'expression du gène de la PTHrP⁴⁴.

Ces 3 promoteurs sont actifs dans la majorité des cellules normales et tumorales. Cependant, au niveau cardiaque, chez le fœtus comme chez l'adulte, seul le promoteur P3 intervient dans la régulation du gène de la PTHrP, alors qu'au niveau de l'amnios, seul P2 intervient⁴⁵. La présence des deux types de promoteurs « GC » et « TATA » au niveau du gène de la PTHrP suggère qu'un type de promoteur puisse être utilisé pour une expression « domestique » et l'autre pour une expression « régulée »^{46,47}.

Comme la plupart des gènes eucaryotiques, le gène de la PTHrP comporte, en plus des 3 promoteurs, des sites de régulation en « cis ». Ces sites incluent :

- deux séquences activatrices (« enhancers ») GCAAT décrites par Campos et coll.⁴⁸, situées en amont de l'exon 4,
- plusieurs séquences de régulation extinctrices (« silencers ») en 5' de l'exon 1,
- des sites de liaison pour les facteurs de transcriptions SP-1, AP-1 et AP-2 en 5' de l'exon 1, dans les exons 3 et 4^{39,41,49},
- deux régions ressemblant au site consensus « cyclic AMP response element » (CRE) en 5' de l'exon 1 et dans l'exon 4^{41,49,50},
- des motifs nucléotidiques consensus pour la 1,25-(OH)₂ vitamine D3 et les glucocorticoïdes, localisés en 5' de l'exon 1, dans l'exon 1 et 4⁴⁹.

La majorité de ces séquences régulatrices en « cis » a été identifiée par simple examination des séquences. Seuls les sites CRE⁵⁰ et les sites de liaison SP-1/ETS-1^{51,52} ont bénéficié d'études fonctionnelles approfondies.

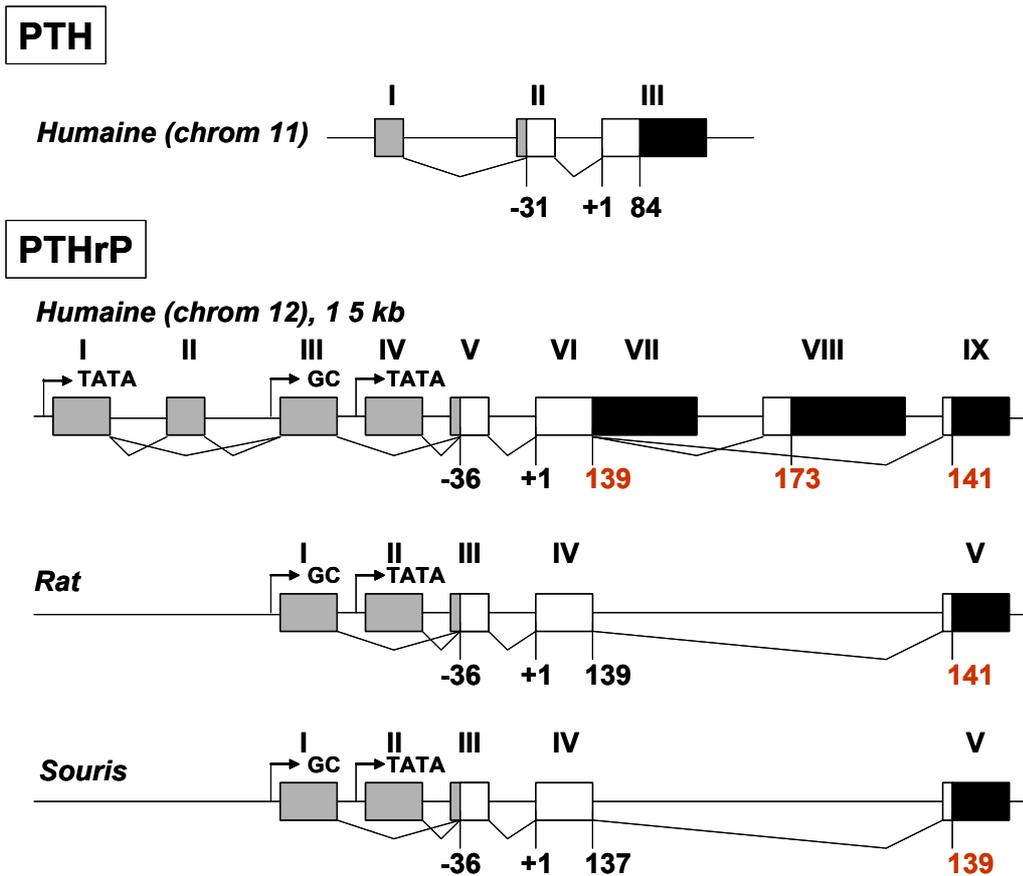


Figure I-2 : Comparaison de l'organisation des gènes de la PTHrP humaine, de rat et de souris avec celle de la PTH humaine. Les exons sont numérotés en chiffres romains. Les régions codantes sont représentées par les rectangles blancs, les régions non traduites en 5' sont en gris et les régions non traduites en 3' sont représentées en noir. Les séquences promotrices sont signalées par les flèches noires. Les sites potentiels d'excision/épissage alternatif sont indiqués par les traits joignant les différents exons.

□ Région codante

L'exon 5 du gène de la PTHrP code les acides aminés de la séquence « prépro » de la PTHrP (-36 à -8), sauf les 7 derniers acides aminés qui sont sous la dépendance de l'exon 6. Cette séquence « prépro » contient un site de clivage dibasique lys-arg, servant dans d'autres hormones peptidiques à libérer la pro-hormone⁵³. Chez l'homme, la forme mature de la PTHrP, c'est-à-dire la PTHrP(1-139) commune à toutes les isoformes de la PTHrP, est codée par l'exon 6 (l'exon 4 chez le rat et la souris). L'épissage alternatif des exons 7 et 8 génère les isoformes 1-141 et 1-173^{24,37,41,42}. La prévalence de

l'expression de telle ou telle isoforme dans les tissus normaux ou néoplasiques a été étudiée. Ainsi, Campos et coll.⁵⁴ ont rapporté une prédominance des transcrits 1-139 et 1-141 dans les tissus normaux et 1-173 dans les tissus néoplasiques. Mais la signification physiopathologique de cette hétérogénéité de l'expression de la PTHrP dans les tissus normaux et néoplasiques reste à être déterminée.

□ Région 3'

Chez l'homme, de même que chez le rat, la souris ou le poulet, l'extrémité 3' non traduite du gène de la PTHrP est constituée de nombreux motifs riches en « AU ». Ces éléments servent à la dégradation rapide de l'ARNm et sont souvent présents dans les gènes codant les cytokines et les proto-oncogènes impliqués dans la prolifération et la différenciation cellulaire. La présence de ces motifs « AU » responsables d'une instabilité des ARNm est en accord avec la demi-vie courte de l'ARNm de la PTHrP qui n'est que de 30 minutes à 2 heures⁵⁵⁻⁵⁷. La dégradation rapide de l'ARNm de la PTHrP sert probablement à limiter la durée de la réponse après l'initiation de la transcription.

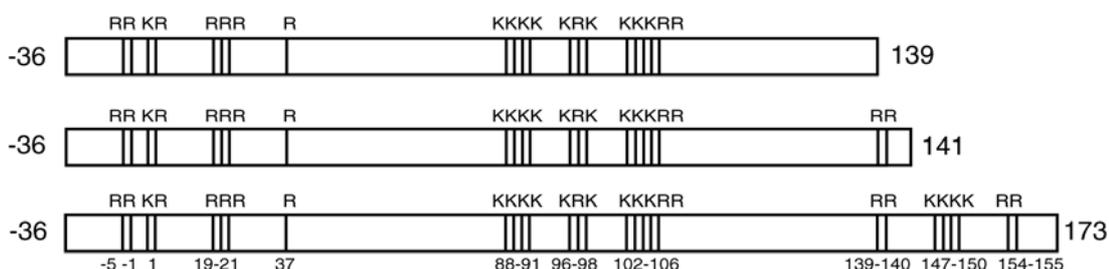
D'autre part, des séquences TTTTGTA ont été identifiées à l'extrémité 3' non traduite des exons 7 et 9. La signification exacte de ces séquences est encore inconnue mais elle est retrouvée dans de nombreux gènes à réponse précoce³².

La PTHrP : une famille de peptides

La traduction des différents ARNm de la PTHrP donne naissance à trois isoformes initiales de 175, 177 et 209 acides aminés, contenant chacun une séquence signal « prépro » de 36 acides aminés (figure I-3). Après clivage de la séquence « prépro », les acides aminés 1-139 sont communs aux trois produits qui ne diffèrent que par leur partie C-terminale. L'homologie de séquence avec la PTH concerne les acides aminés 1 à 13 des formes finales de ces deux peptides. En effet, par purification de la protéine et par clonage de l'ADNc, il a été montré que 8 des 13 premiers acides aminés sont identiques à ceux de la PTH. Après le 13^{ème} acide aminé la séquence diverge totalement. Pourtant, les régions comprenant les acides aminés (14-34) semblent avoir une structure tridimensionnelle comparable étant donné qu'elles se fixent au même récepteur, avec une affinité similaire. Par conséquent, la région de similitude entre la PTHrP et la PTH s'étend de l'acide aminé 1 à 34.

La région intermédiaire de la PTHrP s'étendant des acides aminés 35 à 111 ne présente de ressemblance avec aucune autre protéine connue. Cependant, cette région est extrêmement conservée entre les espèces (homme, souris, rat et poulet) (fig I-1). Entre l'homme et les rongeurs, seuls deux acides aminés diffèrent dans la portion (1-111). Chez le chien, un seul acide aminé est substitué et 11 chez le poulet. La région (141-179) quant à elle, est spécifique de l'homme^{12,39,49,58,59,60}.

A. Les trois produits traductionnels initiaux de la PTHrP



B. Domaines fonctionnels de la PTHrP



C. Modifications posttraductionnelles de la PTHrP

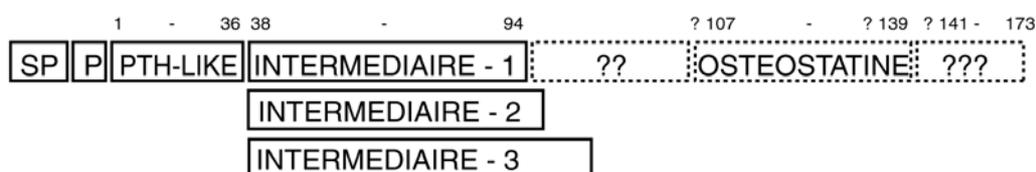


Figure I-3 : Représentation des trois isoformes de la PTHrP comportant 139, 141 et 173 acides aminés, de ses domaines fonctionnels et de ses formes de sécrétion obtenues après les modifications post-traductionnelles. Les motifs multibasiques sont indiqués par la succession de résidus Lysine (K) et Arginine (R). Après clivage du peptide signal (région -36 à -8) et de la séquence pro, cinq produits de sécrétion matures sont possibles : la PTHrP(1-36) qui a été parfaitement caractérisée, les fragments intermédiaires (38-94), (38-95), (38-101) et un fragment C-terminal (107-139). Chez l'homme, l'existence d'un fragment (141-173) est soupçonnée. D'après Philbrick et coll. ¹².

□ Séquence signal prépro

La PTHrP contient une séquence « prépro » codée par l'exon 5. Cette séquence comporte 36 acides aminés et consiste en une séquence hydrophobe de 5 à 15 acides aminés entourée par deux courtes régions d'acides aminés chargés. Cette structure caractéristique des peptides signaux décrits dans la littérature, guide la chaîne peptidique naissante du cytosol où elle est formée vers le réticulum endoplasmique rugueux et les voies de sécrétions. La peptidase signal clive vraisemblablement le peptide « pré » lors de la traduction, au niveau des acides aminés -9 ou -8 ¹². Le séquençage de la protéine a permis de déterminer que la PTHrP mature débutait avec une Ala¹ ^{22,23,61}. La séquence « pro » comprend donc les acides aminés -8 ou -7 à -1 (figure I-3). Cette région « pro » comporte une séquence multibasique Arg⁻⁵-Arg-Leu-Lys-Arg⁻¹, substrat de la pro-hormone convertase furine, qui par protéolyse post-traductionnelle de la PTHrP, génère diverses formes de sécrétion mature (figures I-3, I-4).

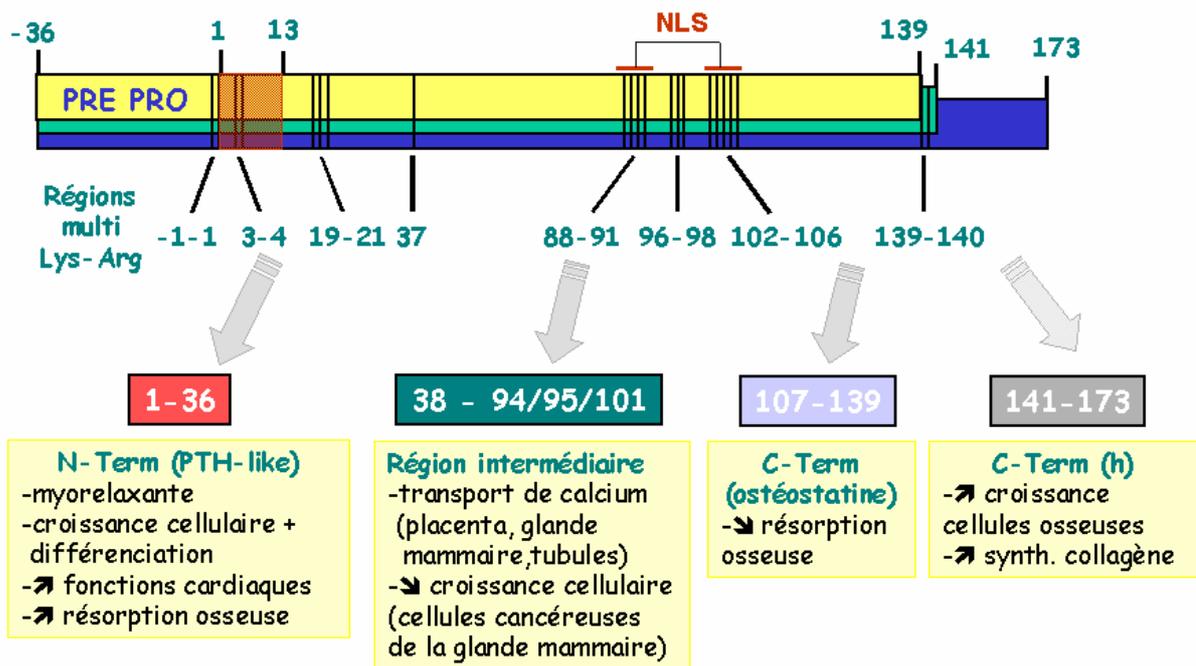


Figure I-4 : Représentation schématique des trois isoformes initiales de la PTHrP issues de l'épissage alternatif de l'ARN pré-messager. Les modifications post-traductionnelles consistant en une endoprotéolyse au niveau des sites multi-basiques génèrent les formes matures de sécrétion N-terminale, intermédiaire et C-terminale de la PTHrP. Les principales fonctions physiologiques connues de ces formes matures sont précisées. NLS signifie séquence de localisation nucléaire.

❑ Le fragment N-terminal : PTHrP(1-36)

L'Arg³⁷ constitue un site de clivage pour la famille des pro-hormones convertases monobasiques. Ce clivage libère une forme peptidique mature : le fragment N-terminal, la PTHrP(1-36). Cette idée est renforcée du fait que l'Ala³⁸ a été identifiée comme premier acide aminé d'une forme intermédiaire et qu'une mutagenèse de l'Arg³⁷ prévient ce clivage¹². D'autre part, il a été montré que le fragment 1-36 de la PTHrP est actif au même titre que la PTH(1-34), sur des tests fonctionnels tant *in vitro* que *in vivo*⁶². Cette région est homologue entre la PTHrP et la PTH et est directement impliquée dans leur interaction avec leur récepteur commun, le récepteur PTH/PTHrP ou R-PTH1.

❑ Les fragments intermédiaires

Un fragment intermédiaire débutant par l'Ala³⁸ a été identifié comme une autre forme mature de la PTHrP⁶³. Ce fragment, d'un poids moléculaire d'environ 7000 Da, possède de nombreux sites multibasiques pouvant être clivés par des pro-hormones convertases¹². La recherche de l'extrémité C-terminale de ce fragment a révélé l'existence de trois formes sécrétées : la PTHrP(38-94), (38-95) et (38-101). Ces fragments sont présents dans la circulation⁶⁴, particulièrement chez les patients présentant

une HHM. Mais ces fragments peuvent également être sécrétés de façon régulée dans les cellules neuroendocrine ⁶⁵.

Les acides aminés de la séquence 38-111 sont très conservés entre les espèces (figure I-1). Cette extraordinaire conservation phylogénétique suggère une fonction vitale de cette région intermédiaire. En effet, Care ⁶⁶ a montré l'importance du fragment (38-94) dans l'établissement du gradient calcique materno-fœtal, un effet qui n'est reproduit ni par la PTH, ni par la PTHrP(1-36). Par ailleurs, la PTHrP(38-94) augmente les concentrations de calcium cytosolique dans des lignées issues de cellules β pancréatiques (RIN 1046-38), de carcinomes squameux humain (YCC-SQ-1) ou de cellules musculaires vasculaires (A10) ^{67,68}.

Il est intéressant de noter que la région intermédiaire, et plus particulièrement la PTHrP(67-86), exerce un effet inhibiteur sur la prolifération des cellules cancéreuses issues de la glande mammaire ⁶⁹. Cet effet a été confirmé *in vivo*, puisque l'injection de PTHrP(38-94) diminue la taille de tumeurs mammaires chez des souris immunodéficientes ⁷⁰.

Henderson et coll. ont montré en 1995 ⁷¹ que la région intermédiaire de la PTHrP comporte deux régions multibasiques représentées par les acides aminés (88-91) et (102-106) (figure I-4), essentielles pour le transport de la PTHrP vers les noyaux par le passage au travers de pores nucléaires. Ces séquences sont proches de la séquence de localisation nucléaire (NLS) présente dans certaines protéines rétrovirales ou le facteur de croissance des fibroblastes (FGF).

Ditmer a par ailleurs observé ⁷² que la région multibasique (87-106) de la PTHrP correspond à un site de clivage potentiel des pro-hormones convertases et exerce un rôle dans le trafic cellulaire de la PTHrP naissante. En effet, cette région sert à diriger le précurseur de la PTHrP vers un site de dégradation intracellulaire *via* la voie du protéasome après ubiquitinylation.

□ Le fragment C-terminal : PTHrP(107-139)

La séquence multibasique Lys¹⁰²-Lys-Lys-Arg-Arg¹⁰⁶, site de clivage pour les pro-hormones convertases, génère la PTHrP(107-139), une autre forme de sécrétion mature de la PTHrP ⁷³. La région 107-111 est très conservée phylogénétiquement, ce qui témoigne de son importance physiologique. En effet, la PTHrP(107-139), également appelée « ostéostatine », a la propriété particulière d'inhiber la résorption osseuse en inhibant l'activité des ostéoclastes et en stimulant celle des ostéoblastes ^{73,74}. Les effets de la PTHrP(107-139) semblent indépendants d'une interaction avec le R-PTH1 et mettent en jeu un récepteur spécifique encore inconnu actuellement ⁷⁵. Le même récepteur pourrait être impliqué dans la libération de VEGF induite spécifiquement par la PTHrP(107-139) dans les cellules ostéoblastiques humaines ⁷⁶.

□ Le fragment C-terminal extrême : PTHrP(141-173)

L'épissage de l'exon 6 code pour la région 141-173 de la PTHrP, une forme identifiée uniquement chez l'homme. La PTHrP(141-173) a été dosée par test radioimmunologique dans de multiples situations : le lait maternel, le sang du cordon ombilical, le milieu conditionné par les kératinocytes, les

carcinomes squameux et rénaux ⁷⁷, les cancers de la prostate ⁷⁸ ainsi que dans les membranes amniotiques ⁷⁹. Mais le rôle physiologique de ce fragment C-terminal extrême de la PTHrP reste cependant encore inconnu actuellement.

❑ **Autres traitements post-traductionnels**

Les kératinocytes humains sont susceptibles de sécréter une forme hautement glycosylée de la PTHrP, dont le poids moléculaire passe d'environ 10000 à 16000 Da. Ceci est en accord avec la présence dans la PTHrP de multiples résidus de sérine, thréonine et proline susceptibles d'être O-glycosylés ⁸⁰. Mais la PTHrP humaine ne contient par contre aucun site de N-glycosylation. Une PTHrP glycosylée (48,5 kDa) a été mise en évidence par Western blot dans les ventricules de rat et de souris ⁸¹.

Il existe également des sites (X-Gly-Basique-Basique) susceptibles d'être amidés en positions (86-91) et (94-98), mais l'existence de telles formes amidées de la PTHrP n'a pas été formellement démontrée ⁸².

❑ **Variations dans les fragments de la PTHrP**

L'action des prohormone-convertases génère au moins 6 formes de sécrétion différentes de la PTHrP, dérivées des extrémités N- et C-terminales, ainsi que de la région intermédiaire du peptide (figure I-4). Chacune de ces formes filles interagit très vraisemblablement avec un récepteur particulier, dont seul le R-PTH1 reconnaissant la PTHrP N-terminale est actuellement bien connu. Toutes les formes matures sont sécrétées par les tumeurs au cours de l'HHM, mais les PTHrP(37-94) et (109-138) sont particulièrement majorées dans la circulation (respectivement 9 et 3 fois) par rapport à la PTHrP(1-74) ⁶⁴. La PTHrP(109-138) serait alors responsable d'effets délétères (angiogenèse *via* le VEGF, favorable au développement des tumeurs) ^{76,83}, alors que la PTHrP(37-74) pourrait limiter le développement des tumeurs ⁷⁰.

La sécrétion de certains fragments spécifiques a aussi été décrite dans certaines conditions particulières. Ainsi, le fragment N-terminal est sécrété par la glande mammaire pendant l'allaitement ⁸⁴⁻⁸⁶, ou au cours du choc endotoxémique ⁸⁷. Par contre, dans l'insuffisance rénale chronique, le fragment C-terminal de la PTHrP s'accumule chez les patients par ailleurs normocalcémiques et ceci d'autant plus que les fonctions rénales sont altérées ⁸⁸. Il s'agit là probablement d'un défaut d'élimination par le rein puisque les concentrations plasmatiques de PTHrP(109-138) sont plus basses chez les patients soumis à une dialyse péritonéale ambulatoire chronique ⁸⁸. Il faut remarquer que dans l'insuffisance rénale chronique, un fragment C-terminal de la PTH, la PTH(7-84) s'accumule également. De par ses propriétés antagonistes sur le R-PTH1, elle est susceptible d'induire une pseudo-résistance aux effets à la fois de la PTH et de la PTHrP.

Modes d'action de la PTHrP

☐ Mode de sécrétion

Les formes matures de la PTHrP sont sécrétées par la voie constitutive ou régulée, selon que les cellules possèdent ou non la machinerie neurosécrétoire⁸⁹. Dans ce sens, on peut dire que ce processus de sécrétion est spécifique du type cellulaire⁶⁵. La PTHrP présente ainsi l'originalité d'être considérée à la fois comme un facteur de croissance ou une cytokine, mais également comme un peptide de type neuroendocrine. Sur le mode constitutif, la sécrétion se fait de façon continue et l'événement déterminant de son taux de sécrétion est alors son taux de transcription. Ceci est le cas dans la majorité des cellules où la PTHrP est exprimée, y compris les cellules musculaires lisses vasculaires (tableau I-1). Dans les cellules neuroendocrines, la PTHrP est empaquetée dans des granules de sécrétion denses et la dépolarisation de la cellule permet une vague de sécrétion du peptide. Ce phénomène est rencontré par exemple au niveau des cardiomyocytes atriaux, des cellules β pancréatiques et des cellules juxtaglomérulaires^{12,65,90}. En outre, les différents fragments N-terminaux, intermédiaires ou C-terminaux de la PTHrP sont libérés selon la même voie de sécrétion, dans un type cellulaire donné⁶⁵.

Sécrétion régulée	Sécrétion constitutive
glande surrénale	membrane amniotique
système nerveux central	chondrocytes
îlots pancréatiques	kératinocytes
parathyroïde	cellules tubulaires rénales
hypophyse	ostéoblastes
(cardiomyocytes atriaux)	muscle squelettique
	muscle lisse (vasculaire, utérin, vésical, gastrique)
	rate

Tableau I-1 : Tissus et types cellulaires produisant la PTHrP selon les modes « régulé » ou « constitutif ». D'après Plawner et coll.⁶⁵.

☐ Action endocrine, paracrine ou autocrine

La PTHrP a été découverte au cours de l'HHM où elle se comporte comme une hormone, libérée par une tumeur maligne et majorant la calcémie de par son action sur les organes cibles qui sont l'os et le rein. Effectivement, la PTHrP peut dans certaines situations physiopathologiques telles que le choc

sceptique ou le diabète, circuler par voie systémique afin d'exercer une authentique fonction endocrine. Dans les circonstances normales, le seul effet endocrine bien caractérisé de la PTHrP reste son action au niveau du placenta, durant la vie embryonnaire.

Le mode d'action habituel de la PTHrP est cependant le mode autocrine/paracrine, pour la plupart de ses actions connues dans les conditions physiologiques. Il en est ainsi pour la PTHrP produite par les kératinocytes, qui exerce ses effets *via* un des récepteurs membranaires sur les kératinocytes, mais également au niveau des fibroblastes adjacents. Dans les vaisseaux, la PTHrP produite dans les cellules endothéliales ou musculaires lisses peut agir sur les cellules musculaires lisses sous-jacentes¹². Enfin, dans le rein, les cellules mésangiales quiescentes *in vivo*, n'expriment pas la PTHrP, mais portent le R-PTH1 et sont potentiellement une cible de la PTHrP produite par les artéoles intra-rénales ou les podocytes. Pour exercer de tels effets, la PTHrP suit une voie de sécrétion classique *via* le réticulum endoplasmique grâce à son peptide signal, puis l'appareil de Golgi avant d'intégrer les vésicules de sécrétion pour une libération constitutive, ou les granules de sécrétion pour une libération régulée, suivant le type cellulaire considéré⁹¹ (figure I-5).

□ Action intracrine

Un troisième mode d'action de la PTHrP, par une voie intracrine, a été proposé il y a maintenant près de 10 ans^{71,92-94}. Dans ce cas, le peptide serait ciblé vers le noyau grâce à une séquence bipartite de localisation nucléaire (NLS) située dans la région (88-106) de la PTHrP que nous avons déjà évoquée. Cette région riche en amino-acides multibasiques est présente dans la majorité des protéines nucléaires ainsi que dans de nombreux facteurs de transcriptions rétroviraux ou eucaryotes (HIV-1, *c-fos* et *c-jun*)^{95,96}. Elle est formée d'un bloc de résidus non basiques, flanqué de deux groupes d'acides aminés multibasiques (88-91) et (102-106). Cette séquence permet à la PTHrP d'interagir avec l'importine β , nécessaire à sa translocation dans le noyau^{96,97}. La séquence NLS est nécessaire et suffisante pour cette translocation^{71,98}.

Ce trafic inhabituel vers le noyau d'un peptide destiné à être sécrété peut s'envisager par diverses voies, actuellement à l'étude⁹⁴ :

- La PTHrP est sécrétée puis se retrouve dans le cytoplasme après endocytose avec le R-PTH1 ;
- la PTHrP peut résulter d'une traduction alternative de son ARNm produisant un peptide sans séquence signal fonctionnelle ;
- enfin, le transport rétrograde de la PTHrP dans le réticulum endoplasmique vers le cytoplasme a également été envisagé ; la PTHrP présente dans le cytoplasme gagnerait alors le noyau *via* l'importine β .

Le rôle fonctionnel de la PTHrP nucléaire reste encore largement inconnu. Cependant, trois fonctions ont été décrites à ce jour :

- Les cellules en culture surexprimant la PTHrP avec une séquence NLS intacte, résistent mieux à la privation de sérum ; cet effet anti-apoptotique a été décrit sur les chondrocytes humains⁷¹ et sur une lignée de cellules cancéreuses mammaires⁹⁹ ;

- Sur les cellules de muscle lisse vasculaire, la PTHrP nucléaire stimule la prolifération cellulaire, un effet diamétralement opposé à celui de la PTHrP exogène qui diminue la prolifération de ces cellules par la voie autocrine/paracrine^{95,100,101} ; cet effet prolifératif intracrine nécessite non seulement une séquence NLS intacte mais aussi la préservation de l'extrémité C-terminale de la PTHrP⁹⁸ ;

- Enfin, sur les cellules cancéreuses de la prostate, la PTHrP induit une production délétère d'IL-8, un facteur angiogénique, par une voie intracrine qui semble cependant indépendante ici de la séquence NLS¹⁰².

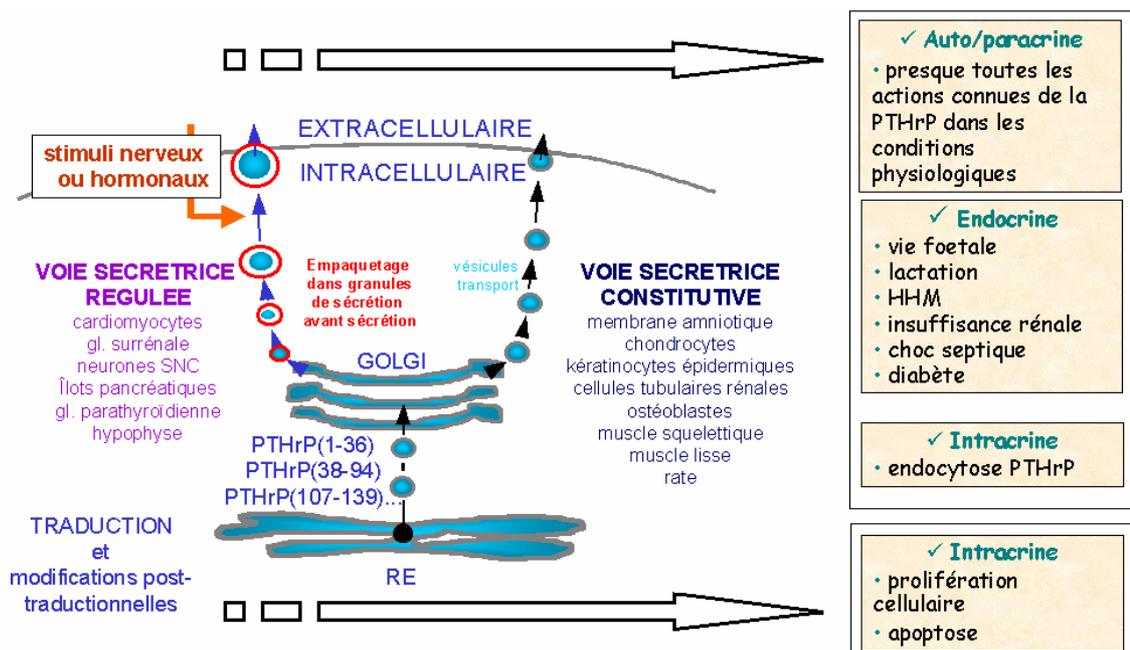


Figure I-5 : Représentation des voies de sécrétion de la PTHrP et des actions autocrine/paracrine, endocrine et intracrine de la PTHrP.

Régulation de l'expression de la PTHrP

Lorsqu'elle est sécrétée de façon constitutive, la PTHrP est contrôlée de façon complexe et variée au niveau de l'expression de son ARNm, suivant le type cellulaire et le tissu considéré. La structure du gène de la PTHrP et sa cinétique d'expression sont proches de celles des gènes précoces. Ainsi, de nombreux facteurs et situations physiologiques ou pathologiques modulent rapidement et de façon transitoire l'expression du gène de la PTHrP en modifiant le taux de sa transcription et/ou la stabilité de son ARNm. Le tableau I-2 résume les données de la littérature à ce sujet. Il est aujourd'hui bien établi que la synthèse et la sécrétion de la PTHrP sont régulées par une grande variété d'hormones, de peptides et seconds messagers, et un nombre croissant de travaux révèle la complexité de la régulation de l'expression du gène de la PTHrP par ces substances.

Stimuli pharmacologiques	Type cellulaire/tissu	ARNm de la PTHrP	PTHrP	
forskoline	cellules T (homme)	↗	ND	
calcitonine	carcinome squameux (homme)	↗	ND	
	cellules cancéreuses du sein	↘	↘	
sérum	insulinome (rat)	↗	ND	
	kératinocyte (homme)	↗	ND	
	kératinocyte (rat)	↗	ND	
	muscle lisse aortique	↗	↗	
facteurs de croissance	kératinocyte (homme)	↗	ND	
EGF	kératinocyte (rat)	↗	ND	
	épithélium mammaire (homme)	↗	ND	
IGF-1	épithélium mammaire (homme)	↗	ND	
TGF-β	carcinome rénal (homme)	↗	ND	
	myomètre (homme)	↗	↗	
	endomètre (homme)	↗	↗	
	kératinocyte (rat)	↗	ND	
	cellules endothéliales coronaires	↘	↘	
	chondrocytes (poulet)	↗	ND	
	cycloheximide	ostéosarcome (homme)	↗	ND
		insulinome (rat)	↗	ND
nombreux tissus (rat et homme)		↗	ND	
phorbol ester		ostéosarcome (homme)	↗	ND
	cellules T (homme)	↗	ND	
	cellules endothéliales (homme)	ND	↗	
endothéline-1	muscle lisse aortique (rat)	↗	ND	
thrombine	muscle lisse aortique (rat)	↗	ND	
noradrénaline	cellules endothéliales (homme)	ND	↗	
angiotensine II	muscle lisse aortique (rat)	↗	ND	
arginine-vasopressine	cellules hypothalamiques	↗	ND	
glucocorticoïdes	carcinome (homme)	↘	ND	
	insulinome (rat)	↘	ND	
	muscle lisse aortique (rat)	↘	ND	
	kératinocyte (rat)	↘	ND	
1,25(OH) ₂ D	carcinome médullaire (homme)	↘	ND	
	kératinocyte (homme)	↘	ND	
	kératinocyte (rat)	↘	ND	
22-oxa-1,25-(OH) ₂ D	cellules T (homme)	↘	ND	
	utérus (rat)	↗	ND	
	hypophyse/hypothalamus (rat)	↗	ND	
	cellules du myomètre (rat)	↗	ND	
	rein (singe)	↗	ND	
TNF-α	cellules endothéliales (homme)	↗	↗	
IL-1β	cellules endothéliales (homme)	↗	↗	
	ostéoblastes en culture	↗	↗	
	glande mammaire (rat)	↗	ND	
Tax	cellules T (homme)	↗	ND	
Ras	fibroblastes en culture	↗	ND	

Tableau I-2 : Facteurs pharmacologiques régulant l'expression de l'ARNm de la PTHrP ou de la protéine elle-même dans divers tissus ou cellules en culture.

ND : Non Déterminé. Adapté essentiellement d'après Yang et coll. ⁸².

□ L'AMPc

L'effet de l'AMPc est essentiellement stimulateur de l'expression du gène de la PTHrP. C'est le cas notamment dans les cellules T, où l'AMPc est le second messenger intracellulaire intervenant dans les effets de la prostaglandine E1 et de l'IL-2^{103,104}. De même, la calcitonine augmente la transcription du gène de la PTHrP dans une lignée de cellules cancéreuses pulmonaires¹⁰⁵. Les facteurs qui affectent les taux intracellulaires d'AMPc tels que l'IBMX ou la forskoline, modifient également l'expression du gène de la PTHrP¹⁰⁴⁻¹⁰⁷. Il est intéressant de noter dans ce contexte que sur des ostéoblastes humains en culture primaire et sur des cellules d'ostéosarcomes, la PTH(1-34) est elle aussi capable d'induire rapidement et massivement (x 50 en 30 min) l'expression de l'ARNm de la PTHrP¹⁰⁸. L'existence de plusieurs séquences consensus sensibles à l'AMPc (sites CRE) sur le gène de la PTHrP⁴⁹ est à l'origine de cette régulation. Une majoration de l'activité des promoteurs P1 et P3 de la PTHrP a d'ailleurs été décrite dans les cellules cancéreuses pulmonaires, après exposition à la forskoline et la calcitonine¹⁰⁵.

□ Les facteurs de croissances et les cytokines

La PTHrP a les propriétés d'une cytokine et son gène fait partie de la famille des gènes à induction précoce. Leurs caractéristiques sont une induction rapide par le sérum, les facteurs de croissance et le cycloheximide. Ces caractéristiques sont effectivement celles de la régulation de l'expression de la PTHrP (tableau I-2). L'EGF, le TGFβ, l'IGF-1 et l'insuline majorent les taux d'ARNm de la PTHrP^{82,109,110}. Les effets du TGFβ ont été particulièrement bien étudiés. Une majoration de l'ARNm de la PTHrP induite par le TGFβ a été observée dans de nombreux types de cellules normales (kératinocytes, chondrocytes, épithélium prostatique, myomètre, endomètre) ou cancéreuses (rénales, ovariennes, squameuses orales, du sein, ostéosarcomes) (tableau I-2)¹¹¹⁻¹¹⁵. L'augmentation du taux d'ARNm par le TGFβ est rapide (60 min) et relève d'une double action. En effet, une augmentation de la transcription du gène a été décrite *via* P1 et P2 sur des cellules cancéreuses squameuses¹¹⁶ ou P3 sur des cellules cancéreuses du sein¹¹³, mettant en jeu la voie signalétique de smad-3 en synergie avec Ets^{113,117}. Mais le TGFβ stabilise aussi l'ARNm de la PTHrP, en particulier celui correspondant à l'isoforme 141^{111,116}. L'EGF partage avec le TGFβ cette double activité sur les taux d'ARNm de la PTHrP mais stimule l'activité transcriptionnelle de P2 et P3 et stabilise l'ARNm de l'isoforme 139¹¹⁸.

L'induction de l'ARNm de la PTHrP par le sérum a été décrite sur les kératinocytes^{119,120}, mais aussi sur les cellules musculaires lisses (CML) aortiques en culture¹²¹ et dans l'ostéosarcome¹²². L'augmentation de l'ARNm de la PTHrP par le sérum est probablement due à l'interaction du sérum avec des « SRE » (serum response element) présents dans la région promotrice du gène de la PTHrP, mais une augmentation de la stabilité de l'ARNm a aussi été rapportée¹²².

□ Vasoconstricteurs et PKC

Les esters de phorbol augmentent le plus souvent l'expression de la PTHrP (îlots pancréatiques, ostéosarcome, cellules endothéliales, cellules T)¹²³, bien qu'un effet inhibiteur ait aussi été rapporté initialement sur des kératinocytes¹²⁰. La plupart des vasoconstricteurs, actifs *via* l'activation de la PKC,

augmentent les taux d'ARNm de la PTHrP, en particulier sur les CMLV et les cellules endothéliales. Les effets de l'Ang II relèvent à la fois d'une augmentation de la transcription et d'une prolongation de la demi-vie de l'ARNm de la PTHrP ^{121,124,125}. Rappelons la présence des sites de liaison pour le facteur AP-1 sur le gène de la PTHrP.

❑ Les hormones stéroïdes

Un grand nombre de travaux montre que plusieurs composés stéroïdiens tels que la 1,25-(OH)₂vitD₃, les glucocorticoïdes, les oestrogènes, la dexaméthasone et l'hydrocortisone affectent la production de PTHrP dans plusieurs lignées tumorales ou normales ^{56,119,121,126,130}, l'effet étant positif, négatif ou nul en fonction du temps d'incubation et/ou de l'état de différenciation de la cellule. L'identification d'une séquence nucléotidique répondant négativement à la 1,25-(OH)₂vitD₃ du côté 5' du gène de la PTHrP ¹¹⁹ est en accord avec les effets négatifs de la vitamine D₃ et de ses dérivés sur la production de la PTHrP.

❑ Les facteurs viraux

Une corrélation entre l'infection par le HTLV1 et l'augmentation de l'expression du gène de la PTHrP a été mise en évidence suggérant qu'un ou plusieurs facteurs viraux sont capables d'activer la transcription du gène de la PTHrP ^{131,132}. L'étude réalisée par Watanabe et coll. ¹³³ a permis de montrer qu'un des facteurs viraux impliqués est la protéine tax, protéine importante pour la propagation de HTLV1 dans les cellules T. La PTHrP sécrétée pourrait agir d'une manière autocrine en inhibant la prolifération de ces cellules ¹³⁴.

❑ Le calcium

Des concentrations physiologiques de calcium inhibent la sécrétion de PTHrP par une lignée de cellules parathyroïdiennes de rat ¹³⁵, alors que des concentrations similaires de calcium sont sans effet sur la sécrétion de PTHrP par les cellules parathyroïdiennes bovines ¹³⁶ ou les kératinocytes humains ¹³⁷. A l'inverse, la sécrétion de PTHrP par des cellules cancéreuses (carcinome pulmonaire, à cellules squameuses) est stimulée par l'augmentation des concentrations extracellulaires de calcium ^{129,138,139}.

Cet effet du calcium est médié par le récepteur sensible au calcium, CaR ¹³⁹. Ainsi apparaît clairement un cercle vicieux, en cas de métastases osseuses avec ostéolyse et dans l'HHM, deux situations où des concentrations de calcium locales ou systémiques élevées entretiennent la surexpression de la PTHrP et ses effets délétères sur l'homéostasie du calcium.

❑ Conditions physiologiques et pathologiques

Certaines conditions physiologiques comme l'étirement mécanique, l'occupation utérine ou le phénomène de succion, sont également responsables d'une augmentation importante du taux d'expression de l'ARNm dans les CML (tableau I-3). Les régulations de l'expression de la PTHrP dans des conditions pathologiques ont surtout été analysées sur les vaisseaux et dans le rein. Nous les

exposerons ultérieurement dans cette partie bibliographique pour les discuter en parallèle avec les variations de l'expression du R-PTH1.

timuli physiologiques	Type cellulaire/Tissu	ARNm PTHrP	PTHrP
succion	glande mammaire (rate lactante)	↗	↗
gestation	myomètre (rat)	↗	↗
étirement mécanique	myomètre (rat) vessie	↗	↗
		↗	ND
cycle de ponte de l'oeuf	oviducte	↗	↗
différenciation	carcinome embryonnaire kératinocyte (homme) trophoectoderme (souris)	↗	ND
		↗	ND
		↗	↗

Tableau I-3 : Facteurs physiologiques régulant l'expression de l'ARNm de la PTHrP ou de la protéine elle-même dans divers tissus ou cellules en culture.

ND : Non Déterminé

Principaux effets biologiques de la PTHrP

Contrairement à la PTH dont la synthèse est restreinte à la glande parathyroïde et au système nerveux central^{12,140}, la PTHrP est produite dans de très nombreux tissus cancéreux ou normaux, adulte ou fœtaux, où sa présence a pu être associée à un rôle physiologique. Les kératinocytes humains ont été les premières cellules normales à avoir été identifiées comme sécrétant la PTHrP. Son expression quasi-ubiquitaire, suggère qu'elle puisse avoir des fonctions de type autocrine ou paracrine. Les effets cardiovasculaires et rénaux seront détaillés plus loin. Les autres effets principaux de la PTHrP sont brièvement résumés ici.

☐ PTHrP et carcinomes

La PTHrP a été isolée et clonée initialement à partir de différents types de tumeurs néoplasiques tels qu'un carcinome squameux pulmonaire¹⁰, un adénocarcinome du sein⁹ et un carcinome rénal¹¹. Les études d'hybridation *in situ*, de Northern blot et d'immunohistochimie indiquent la présence de PTHrP dans de nombreuses tumeurs et lignées cellulaires tumorales, où elle peut être sécrétée. Elle est alors le facteur humoral d'hypercalcémie dans l'HHM. Des résultats plus récents démontrent aussi son implication dans le développement même des cancers (sein, prostate, poumon). Dans notre laboratoire, Thierry

Massfelder a pu montrer que la PTHrP jouait un rôle essentiel dans la croissance du carcinome rénal à cellules conventionnelles, tant sur des cellules en culture que sur des tumeurs se développant en sous-cutané chez la souris nude ¹⁴¹.

□ Développement du fœtus

L'ARNm de la PTHrP ainsi que la protéine ont été détectés dans tous les tissus embryonnaires examinés (système nerveux, glandes endocrines, appareil digestif, poumon, muscle, tractus uro-génital) ¹². Le taux d'expression de la PTHrP ainsi que sa localisation tissulaire varie en fonction du stade de développement. Cette expression ubiquitaire, modulée en fonction des stades évolutifs de la gestation, est compatible avec un rôle de la PTHrP dans la croissance et la différenciation tissulaire fœtale.

L'expression de la PTHrP est précoce. Chez l'embryon de poulet, l'ARNm de la PTHrP est détecté dès le 3^{ème} jour de gestation et dès le stade 8 cellules chez la souris ^{142,143}. Elle est détectée dans des tissus extra-embryonnaires et dans la membrane du chorion, en accord avec son rôle dans le transport placentaire du calcium chez les mammifères ¹².

Un profil d'expression analogue est observé chez l'homme. En effet, l'expression de l'ARNm de la PTHrP est détectée précocement au niveau extra-embryonnaire, mais au niveau embryonnaire, la PTHrP n'est visible qu'à partir de la 7^{ème} ou 8^{ème} semaine de vie fœtale ¹⁴⁴ au niveau du poumon, foie, pancréas, estomac, intestins, épiderme, muscles lisses squelettiques et vasculaires. Au niveau du système nerveux central, l'expression de la PTHrP est d'abord limitée au plexus choroïde puis s'étend à partir de la 12^{ème} semaine à la moelle épinière et aux ganglions dorsaux ¹⁴⁵. Dès la 20^{ème} semaine, l'expression de la PTHrP est présente au niveau cardiovasculaire ^{145,146}. Au niveau rénal, la PTHrP est localisée dans les glomérules et dans l'épithélium tubulaire du mésonéphros et du métanéphros ^{144,146} puis son expression se limite aux tubules proximaux et distaux et aux canaux collecteurs entre le 4^{ème} et 5^{ème} mois de gestation.

La PTHrP joue un rôle central au cours du développement embryonnaire. La PTHrP produite par le placenta et le myomètre est essentielle dans l'établissement et le maintien du gradient calcique materno-fœtal. Elle régule également le débit sanguin utérin et placentaire ainsi que la tonicité du muscle lisse utérin en fonction de la taille du fœtus.

Les travaux réalisés chez la souris en invalidant le gène de la PTHrP ou du R-PTH1 démontrent aussi son rôle essentiel dans le développement osseux. En effet, les souris PTHrP^{-/-} ou R-PTH1^{-/-} meurent *in utero* ou dès la naissance par ossification prématurée de leur cage thoracique. Sur le plan histologique, les plaques de croissance osseuses présentent une ossification endochondrale et périchondrale prématurée, ainsi qu'un nombre diminué de chondrocytes prolifératifs ¹⁴⁷⁻¹⁴⁹. Ces résultats démontrent que la PTHrP joue un rôle central dans le développement du cartilage, où elle accélère la croissance des cellules cartilagineuses mais s'oppose à leur progression vers un stade différencié ³. Ainsi, les souris PTHrP^{-/-} mais chez lesquelles la PTHrP est surexprimée spécifiquement dans les chondrocytes sous le contrôle du promoteur du collagène II, survivent et naissent avec un squelette cartilagineux ¹⁵⁰. Des souris surexprimant simultanément la PTHrP et le R-PTH1 meurent *in utero* de malformations cardiaques.

❑ La glande mammaire et la lactation

Après les tumeurs, la PTHrP fut identifiée dans la glande mammaire en lactation. En effet, le phénomène de succion lors de l'allaitement provoque une augmentation rapide et transitoire de l'expression de la PTHrP ¹⁵¹. Cette induction s'observe dès le début de l'allaitement et semble être dépendante de l'augmentation des concentrations de prolactine. Dans ce cas, la majorité de la PTHrP produite est sécrétée vers le lait, où elle se trouve à une concentration 1000 fois supérieure à celle rencontrée au cours de l'HMM ¹⁵²⁻¹⁵⁴.

La PTHrP exercerait une action au niveau du transport du calcium de la mère vers l'enfant, important pour la minéralisation osseuse ³. Le marquage immuno-histochimique de la PTHrP au niveau des cellules myoépithéliales suggère aussi un rôle dans la régulation du débit sanguin mammaire et du tonus myoépithélial durant l'allaitement. La PTHrP a également été détectée dans la glande mammaire au repos, où elle interviendrait au niveau de l'interaction complexe entre l'épithélium et le mésenchyme, responsable du développement et de la croissance de la glande mammaire ^{3,12,155}.

❑ La peau : épiderme, derme et follicule pileux

La PTHrP et son ARNm sont présents dans toutes les composantes de l'épiderme, de la couche basale à la couche granuleuse ¹⁵⁶⁻¹⁵⁸. Chez l'homme, la PTHrP est localisée dans l'épiderme, les glandes sébacées, le derme, les cellules musculaires lisses et endothéliales des artéριοles et dans le muscle érecteur du poil. Les kératinocytes humains sécrètent essentiellement trois formes du peptide : la PTHrP(1-36), un fragment intermédiaire ⁶³, et une forme N-terminale O-glycosylée ⁸⁰.

La PTHrP semble contrôler la prolifération du pool basal de kératinocytes à partir duquel les cellules se différencient, se kératinisent puis entrent en apoptose. Ce pool augmente parallèlement à l'expression de la PTHrP. Au niveau des follicules pileux, la PTHrP ralentit la phase de croissance des poils. En effet, le traitement par des antagonistes de la PTHrP augmente le nombre de follicules pileux et active la phase de croissance des cheveux ^{3,159}.

❑ Le squelette

La PTHrP et le R-PTH1 sont exprimés dans les chondrocytes, les ostéoblastes et les ostéoclastes. Des résultats récents obtenus chez l'homme définissent la PTHrP comme un puissant inhibiteur de la maturation des chondrocytes ¹⁶⁰. En l'absence de PTHrP, les cellules cartilagineuses prolifèrent anormalement et donnent naissance à des os plus courts. Leur différenciation est accélérée de façon à ce que leur matrice extracellulaire se minéralise prématurément.

Comment la PTHrP peut-elle déterminer la taille et la forme des os ? En réalité, elle n'agit pas seule mais elle interfère avec d'autres gènes tels que l'« Indian Hedgehog » (Ihh). Chez les vertébrés, la protéine Ihh est sécrétée par les chondrocytes préhypertrophiques et stimule la PTHrP, qui à son tour inhiberait l'expression de l'Ihh. Ainsi, la PTHrP et l'Ihh formeraient une boucle de régulation négative contrôlant le taux de prolifération des chondrocytes et leur différenciation terminale ^{161,162,163}.

La PTHrP, le TGF β et la cycline D1 sont nécessaires à la stimulation de la prolifération des chondrocytes à la fois *in vitro* et *in vivo*, mais les voies signalétiques intracellulaires et les gènes cibles de ces agents n'ont pas été identifiés ^{147,149}.

Dans l'HHM, les concentrations élevées permanentes de PTHrP circulantes sont responsable de la résorption osseuse majeure dans cette pathologie. Par contre, un rôle anabolique de la PTHrP dans l'os vient d'être suggéré à partir de résultats obtenus chez des souris délétées en PTH (PTH $^{-/-}$) et hétérozygotes pour la PTHrP (PTHrP $+/-$). Ces souris présentent une perte osseuse qui n'existe pas chez les souris PTH $^{-/-}$ ^{164,165}. Ce rôle physiologique anabolique de la PTHrP est tout à fait cohérent avec son utilisation dans le traitement de l'ostéoporose, où son efficacité vient d'être démontrée lors d'une administration en injection quotidienne à faibles doses ¹⁶⁶.

❑ Le système nerveux central

La PTHrP est exprimée dans un certain nombre de régions spécifiques du cerveau. L'ARNm de la PTHrP a été localisé au niveau de l'hippocampe, de la couche granuleuse du cervelet et du cortex cérébral ¹⁶⁷. Ces expériences ont été confirmées par Weaver qui détecte l'ARNm de ce peptide dans les cellules de Purkinje du cervelet ¹⁶⁸, le signal le plus intense étant localisé au niveau de l'hypothalamus.

La distribution du R-PTH1 est bien corrélée à celle de la PTHrP, ce qui suggère que ce peptide agit de façon autocrine/paracrine au niveau du SNC ¹². La présence de la PTHrP au niveau des astrocytes suggère un rôle protecteur de ce peptide sur les neurones face à la toxicité du glutamate. Elle inhiberait l'entrée du calcium libéré par les canaux voltage-dépendant suite à l'activation des récepteurs au glutamate ^{3,169}. D'autre part, la PTHrP modulerait la sécrétion hypothalamique d'arginine vasopressine ¹⁷⁰ et exercerait un effet hypertenseur par activation du système nerveux sympathique ¹⁷¹.

❑ Le foie

De nombreuses études rapportent l'expression de la PTHrP dans le foie chez l'homme et le rat ^{145,172,173}. Un intense marquage est visible dans les hépatocytes fœtaux humains et murins, mais il disparaît chez l'adulte. Il semblerait donc que la PTHrP soit un facteur de développement hépatique exprimé uniquement durant la période d'hépatogenèse fœtale. Sa disparition au cours de la vie adulte et sa réapparition dans les carcinomes hépatiques laisse à penser que la PTHrP jouerait un rôle régulateur de la croissance et de la différenciation de ces cellules. La PTHrP pourrait être réexprimée au cours de la régénération hépatique et participer à la capacité du foie à se régénérer ¹².

❑ Les poumons

Comme pour de nombreux tissus, la mise en évidence de PTHrP dans le poumon a été réalisée chez des patients atteints d'HHM associée à des tumeurs pulmonaires. Ce n'est que secondairement que la PTHrP a été détectée au niveau du tissu pulmonaire normal. Son ARNm a été identifié dès le 15^{ème} jour de vie embryonnaire chez le rat et le poulet. Le peptide apparaît dès le stade glandulaire ^{142,173,174,175} et persiste à chaque stade du développement. Chez l'adulte, l'expression de la PTHrP se limite à

l'épithélium bronchiolaire et alvéolaire^{176,177,178}. Il a été montré que ce peptide est produit par les cellules alvéolaires de type II en culture, notamment sous l'effet d'un étirement mécanique¹⁷⁹. La PTHrP joue un rôle dans la production de surfactants par les cellules alvéolaires¹⁸⁰ et ce rôle est essentiel comme le démontre l'analyse de fœtus et de souriceau nouveau-né PTHrP-/-¹⁸¹.

□ Le système endocrine

Chez l'homme et le rat, la PTHrP immunoréactive est décelée dans de nombreux tissus endocriniens tels que la glande parathyroïdienne et thyroïdienne, le pancréas, les glandes surrénales, la glande pituitaire, les ovaires, les testicules et la prostate.

Dans le pancréas, la PTHrP et son récepteur sont exprimés au niveau des îlots de Langerhans par les cellules α , β , δ et PP qui produisent respectivement le glucagon, l'insuline, la somatostatine et le polypeptide pancréatique^{182,183}. Une surexpression de PTHrP dans les cellules β , chez des souris transgéniques, est responsable d'une augmentation de la masse de ces cellules avec pour conséquence une élévation de la libération d'insuline et une hypoglycémie¹⁸⁴.

Dans l'hypophyse, le marquage le plus intense est observé au niveau des cellules produisant la prolactine et l'hormone de croissance^{176,185}. Dans la thyroïde, la PTHrP est présente dans les cellules épithéliales folliculaires, sans que son rôle ait pu être déterminé^{176,186}. Par contre, au niveau des glandes parathyroïdiennes, la PTHrP est essentiellement exprimée au cours de la vie fœtale. Durant la gestation, la PTHrP produite par la parathyroïde est le plus puissant régulateur de sécrétion du calcium, son organe cible étant le placenta où elle intervient au niveau du transport calcique materno-fœtal¹². Dans les glandes surrénales, la PTHrP est présente chez l'homme adulte au niveau du cortex, dans les cellules de la zone réticulée, et à un moindre degré dans la zone glomérulée produisant l'aldostérone¹⁷⁶. Elle est aussi présente dans les ovaires et les testicules. D'un point de vue fonctionnel, les effets de la PTHrP au niveau des surrénales, des ovaires et des testicules ne sont pas connus à ce jour¹².

□ Le muscle lisse

L'une des grandes fonctions physiologiques de la PTHrP est de réguler le tonus des cellules musculaires lisses. La PTHrP est présente dans les muscles lisses vasculaires mais également dans les cellules musculaires lisses de tous les organes creux comme l'utérus, la vessie, l'oviducte de poule et le tractus digestif.

Dans l'utérus, la PTHrP immunoréactive ainsi que son ARNm ont été identifiés dans le myomètre normal en cours de gestation¹⁸⁷. Le taux d'expression de la PTHrP est stimulé par l'application d'un étirement mécanique sur les cellules musculaires lisses utérines¹⁸⁸. In vivo, cette élévation d'expression du peptide est liée à l'occupation intra-utérine et est proportionnelle à la croissance du fœtus. Après la parturition, les taux d'ARNm de la PTHrP dans l'utérus diminuent rapidement pour rejoindre les valeurs basales en quatre heures¹⁸⁷.

Chez la poule, la PTHrP a été détectée dans l'oviducte des jeunes oiseaux en croissance. A l'âge adulte, l'expression du peptide est régulée en fonction des cycles de ponte et sa localisation est limitée à

la partie terminale de l'oviducte : l'isthme, qui intervient dans le dépôt du calcium au moment de la formation de la coquille ¹⁸⁹.

Dans la vessie, le taux d'expression de la PTHrP est corrélé avec le volume de remplissage ¹⁹⁰. Une obstruction à l'écoulement induit une élévation de l'expression de la PTHrP alors qu'un maintien de la vessie dans un état vide entraîne une baisse de l'ARNm du peptide au niveau des cellules de la paroi musculaire. De façon plus directe, l'application de PTHrP(1-34) sur des préparations musculaires vésicales préconstrictées, induit une relaxation ¹².

La PTHrP a également été détectée dans le tractus gastro-intestinal incluant l'estomac, l'intestin grêle et le côlon. A ce niveau, elle est libérée à la suite de l'étirement mécanique des cellules musculaires au passage du bol alimentaire et elle y exerce une action de compliance ¹⁹¹.

Ce peptide est produit de façon abondante au niveau du système vasculaire, in vivo dans la média ou l'intima, mais également in vitro dans les cellules musculaires lisses et endothéliales en culture. Ce point sera abordé plus largement ultérieurement.

Conclusions

Nous constatons donc que la PTHrP est exprimée de façon quasi ubiquitaire et que ses fonctions physiologiques peuvent être classées essentiellement en trois catégories :

- sur le transport transépithélial du calcium

La PTHrP favorise et module le transport du calcium materno-fœtal à travers le placenta et au niveau de la glande mammaire. Elle stimule la mobilisation du calcium par résorption osseuse dans l'HHM, mais elle intervient aussi dans la calcification des tissus.

- sur la croissance, la différenciation et l'apoptose cellulaire

Ce peptide est un facteur de régulation de la croissance et du développement sur de nombreux tissus chez le fœtus, en particulier sur les chondrocytes et les hépatocytes. Mais elle exerce également une activité différenciatrice et contrôle la croissance de nombreux tissus adultes, comme les kératinocytes ou les cellules β des îlots de Langerhans. Tous ces effets sont généralement liés à un mécanisme d'action autocrine/paracrine. Par contre, son action inhibitrice de l'apoptose au niveau des chondrocytes est due à un effet intracrine grâce à un ciblage nucléaire de la PTHrP par la région (88-106).

- sur les muscles lisses vasculaires et extra-vasculaires

La PTHrP est exprimée dans la plupart des muscles lisses de l'organisme où elle est responsable d'un puissant effet myorelaxant et contrôle le tonus musculaire de nombreux organes. Souvent, elle est exprimée en réponse à un étirement mécanique des cellules et agit comme un facteur de compliance.

Le Récepteur PTH/PTHrP ou R-PTH1

Les études menées *in vitro* et *in vivo* lors de la recherche du facteur responsable de l'HMM, avaient déjà démontré que le récepteur de la PTH était également activé par la PTHrP. La similitude de la partie N-terminale de ces deux peptides est responsable de l'activation d'un récepteur commun, le récepteur PTH/PTHrP ou R-PTH1^{192,193,194}. Ce récepteur cloné en 1991, demeure actuellement le mieux caractérisé. Deux autres récepteurs ont cependant été clairement identifiés et clonés : le récepteur PTH2, qui présente 50 % d'homologie avec le R-PTH1 mais qui n'est activé que par la PTH et le peptide tubéroinfundibulaire de 39 acides aminés (TIP 39), et le récepteur PTH3 du poisson zèbre¹⁹⁵. Les études pharmacologiques suggèrent l'existence d'autres récepteurs spécifiques des parties intermédiaires et C-terminales de la PTHrP, mais ces récepteurs n'ont pas encore été clairement identifiés.

Le récepteur PTH1 appartient à la famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G. Il appartient plus précisément à la classe II ou famille B qui inclue aussi les récepteurs de la sécrétine, calcitonine, VIP et du glucagon^{192,193,196,197} (figure I-6).

Ces récepteurs de la classe II se caractérisent notamment par rapport au récepteur β 2–adrénergiques (classe Ia), par (figures I-6 et I-7) :

- un large domaine N-terminal extra-cellulaire (150 acides aminés) présentant des sites potentiels de glycosylation,
- sept hélices transmembranaires reliées entre elles par des boucles hydrophiles d'environ 280 acides aminés ; à ce niveau, la mutation de l'His²²³ conduit à la chondrodysplasie de Jansen où le R-PTH1 est constitutivement activé,
- huit résidus cystéine hautement conservés : six cystéines sont présentes dans le domaine N-terminal extracellulaire et une autre dans chacune des première et seconde boucles extra-cellulaires. De par leur localisation extra-cellulaire, ces cystéines peuvent être impliquées dans la formation de ponts disulfures,
- d'autres résidus hautement conservés (environ 40 acides aminés). Leur mutation spontanée conduit à des pathologies. Il en est ainsi pour la proline située en C-terminal de la 4^{ème} cystéine extra-cellulaire (Pro¹³²), dont la mutation dans la chondrodysplasie de Blomstrand est associée à l'inactivation du R-PTH1¹⁹⁷,
- une extrémité C-terminale cytoplasmique (130 acides aminés) avec des sites de phosphorylation pour les kinases des récepteurs couplés aux protéines G (GRK), la PKA et la PKC (figure I-7).

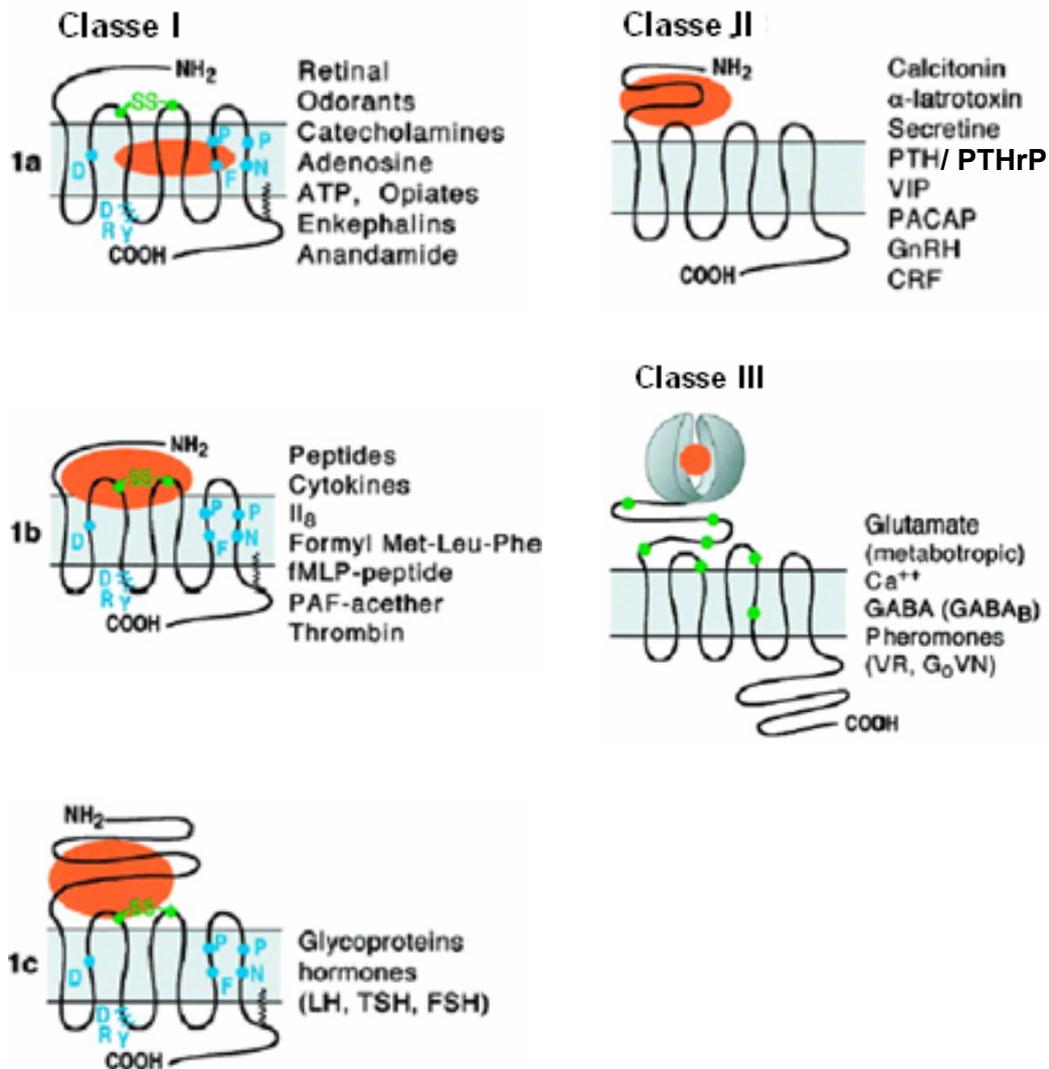


Figure I-6 : Les structures des récepteurs appartenant à la famille des récepteurs couplés aux protéines G sont présentées, en mettant en évidence les différences entre les sites d'interaction avec leurs ligands respectifs.

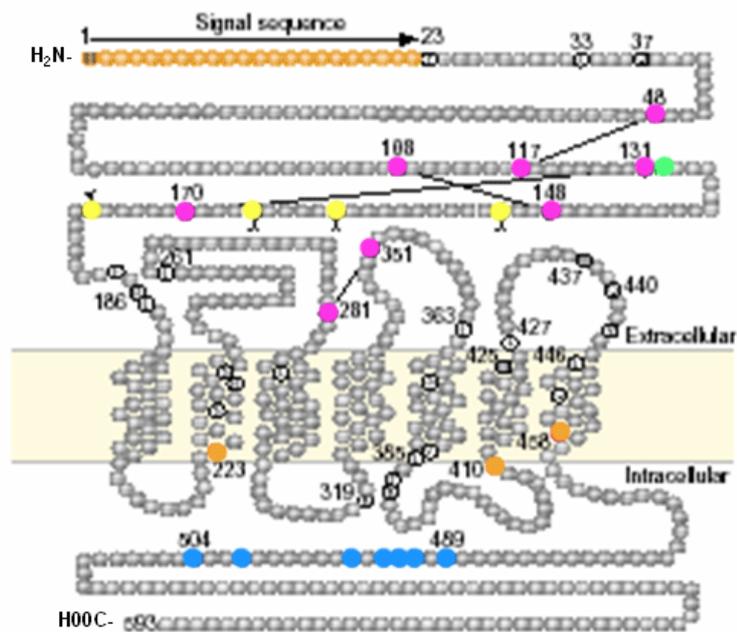


Figure I-7 : Structure du R-PTH1 humain (593 acides aminés) montrant l'organisation en sept domaines transmembranaires. Les résidus Cys sont indiqués en rose avec les ponts disulfures formés. Les sites de N-glycosylation sont représentés sur la boucle N-terminale extra-cellulaire en jaune. Les sites de phosphorylation sont indiqués en bleu. Les chondrodysplasies humaines de Bloomstrand ou de Jansen résultent de mutations notées respectivement en vert et en orange. D'après Gardella et Jüppner¹⁹⁸.

Structure du gène

L'organisation du gène du R-PTH1 est hautement conservée entre l'homme, le rat et la souris¹⁹⁹. Chez l'homme, ce gène est situé sur le bras court du chromosome 3 dans la région désignée par 3p21.1-p24.2²⁰⁰, alors que chez le rat et la souris, il est situé respectivement sur les chromosomes 8 et 9²⁰¹.

Le gène humain de ce récepteur s'étend sur 22 kb et contient 15 exons et 14 introns (figure I-8). Il présente à son extrémité 5' trois exons non codants U1, U2 et U3 suivis de l'exon SS codant la méthionine et le peptide signal²⁰². Ils sont suivis de quatre exons E1, E2, E3 et E4 codant le domaine extra-cellulaire du récepteur, E4 étant spécifique des 4 sites potentiels de glycosylation²⁰³. Les domaines transmembranaires sont sous la dépendance de 8 exons T, alors que la queue cytoplasmique du récepteur ainsi que sa région 3' non traduite sont codées par l'exon le plus long de ce gène à savoir l'exon C²⁰³. Cette région 3' non traduite ne possède pas la séquence consensus de polyadénylation AATAAA¹⁹⁹ présente dans les gènes eucaryotiques. Mais, dans différentes espèces, une queue poly-A a été identifiée, ce qui suggère l'existence de sites de polyadénylation alternatifs à l'extrémité 3' du gène conduisant à un clivage du transcrite suivi d'une élongation poly-A^{199,204}. Par contre, contrairement à l'ARNm de la PTHrP, les motifs « AU » responsables d'une plus grande instabilité du transcrite sont inexistant au niveau du récepteur.

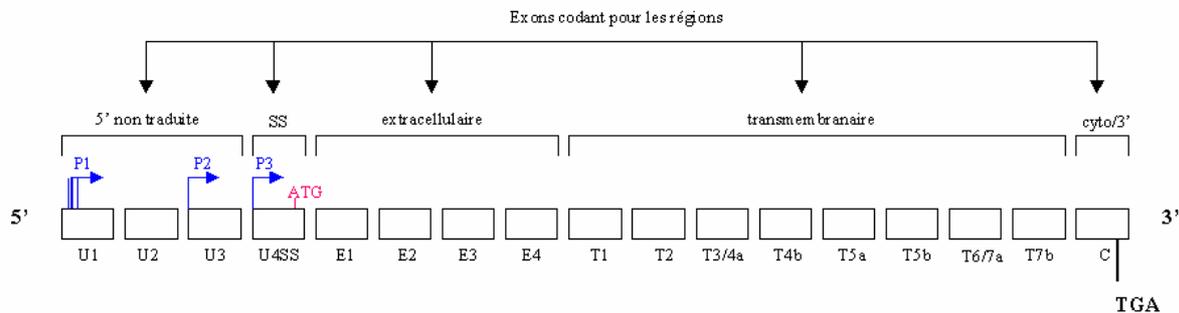


Figure I-8 : Représentation schématique de la structure du gène du récepteur PTH1. La position des promoteurs P1, P2 et P3 est indiquée par les flèches bleues. Le codon initiateur ATG marque le début de la traduction. Les exons codant pour les séquences 5' non traduites, la séquence signal, les domaines extracellulaires, les domaines transmembranaires et la région cytoplasmique sont indiqués respectivement par U, SS, E, T et C. D'après Lee et coll. ²⁰⁵.

Trois promoteurs régulent l'expression du gène du R-PTH1 chez l'homme (P1, P2 et P3) alors que deux seulement sont présents chez le rat, la souris et le porc (P1 et P2) (figure I-9). Aucun de ces trois promoteurs ne possède de séquence consensus « TATA » en amont du site d'initiation de la transcription. Le promoteur P1, situé en amont de l'exon U1, consiste en une séquence avec 50 % de nucléotides G et C, et présente de nombreux sites d'initiation de la transcription qui s'étendent sur une centaine de bases. Ce promoteur est spécifiquement actif dans le rein, mais il comporte chez l'homme une séquence consensus AP-1 qui n'a pas été identifiée chez la souris, suggérant une régulation spécifique ²⁰⁶. Il semble bien en être ainsi puisque l'activité de P1 est responsable à 90 % de l'expression du R-PTH1 rénal chez la souris, en particulier dans les CMLV et les cellules endothéliales des capillaires périrubulaires ^{204, 207, 208}, alors que les transcrits issus de P1 représentent moins de 10 % de l'expression du récepteur rénal chez l'homme ²⁰⁹.

L'organisation des promoteurs P2 et P3 présente une remarquable similarité ²⁰² (figure I-9). Les régions précédant les promoteurs contiennent des sites de liaison pour SP1, pour la famille des régulateurs de transcription ETF et pour MAZ (myc-associated zinc finger protein) ^{202, 206}. La combinaison de motifs SP1 et MAZ ou SP1 et ETF est importante pour la fonction des promoteurs sans séquences TATA mais riche en G+C et contrôlant des gènes domestiques. La distribution ubiquitaire du promoteur P2 correspond bien à cette fonction, avec une activité faible ou moyenne dans la plupart des tissus (tableau I-4). Ceci explique l'expression large du R-PTH1 dans l'organisme. Par ailleurs, ce promoteur est également actif pendant la vie fœtale. Par contre, la régulation de P3 est inhabituelle puisque son activité, bien que présente dans de nombreux tissus, est particulièrement élevée dans le rein et est inexistante pendant la gestation ²⁰⁹. La présence d'un activateur tissu-spécifique a été évoquée, mais n'est actuellement pas démontrée. Une région riche en A, présente en amont des régions régulées par SP1, MAZ ou ETF, exerce une fonction de répression sur l'activité de P3 qui pourrait expliquer l'inactivité de P3 pendant la vie fœtale ²⁰² (tableau I-4).

Chez le rat, l'épissage alternatif des exon non traduit en 5' ainsi que l'utilisation alternative des différents promoteurs, permettent de générer au moins 4 transcrits différents du récepteur PTH1²⁰⁷. Les transcrits initiés par P1 sont spécifiques du rein alors que celui initié par P2 a une distribution ubiquitaire. Il est intéressant de noter que le transcrit III ne comporte pas de séquence signal et conduit à la synthèse d'un récepteur glycosylé et peu exprimé dans la membrane plasmique²⁰⁷. Ceci pourrait en faire un bon candidat pour un hypothétique R-PTH1 intracellulaire/nucléaire dont la fonction reste à être déterminée.

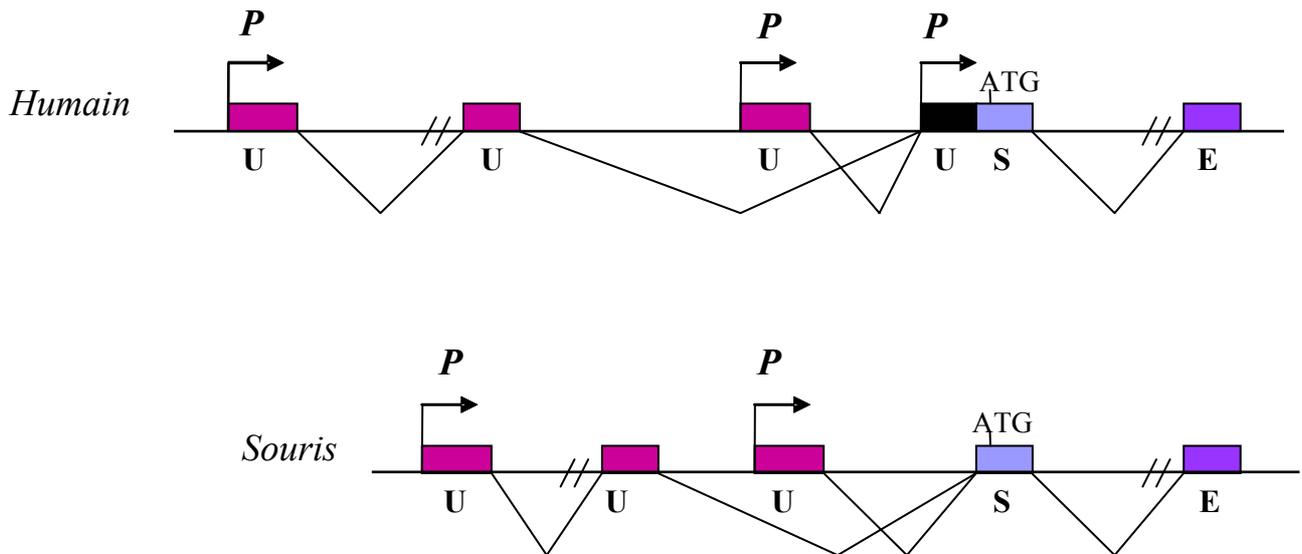


Figure I-9 : Représentation schématique des promoteurs P1, P2 et P3 chez l'homme et la souris.

Tissu/Type cellulaire		P1	P2	P3
foetus (19 semaines)	rein	-	++	-
	os	-	+	-
adulte	rein	+	+++	++++
	intestin	-	+	+
	fibroblastes	-	+	+
	rate	-	+	++

Tableau I-4 : Distribution tissulaire de l'activité des promoteurs P1, P2 et P3 du gène codant le récepteur PTH1 chez l'homme. D'après Bettoun et coll.²¹⁰

Relations structure-activité

Par leur partie N-terminale commune, la PTH(1-34) et la PTHrP(1-34), sont tous deux des agonistes équivalents du récepteur PTH1. Cette partie est indispensable à la fixation au récepteur, alors que les deux premiers acides aminés N-terminaux sont responsables de l'activation des voies de transduction. En effet, l'absence des premiers acides aminés dans la PTH(3-34) ou (7-34) conduit à une activité antagoniste des peptides correspondants. Bien que les régions (14-34) de la PTH et de la PTHrP ne partagent qu'une homologie restreinte (trois acides aminés identiques), leur structure tridimensionnelle doit être comparable pour que les deux peptides se fixent au R-PTH1 avec une affinité similaire^{211,212}.

□ Domaine N-terminal extra-cellulaire

Les études réalisées à partir de chimères, de formes mutantes du R-PTH1 et les études de photoaffinité ont mis en évidence des sites d'interactions entre le domaine N-terminal du récepteur et la portion C-terminale de la PTH et PTHrP(1-34) (figures I-10 et I-11) :

- le premier site correspond à l'interaction de l'Ala²³ du ligand (PTH ou PTHrP) avec les résidus Thr³³ et Glu³⁷ du R-PTH1 ;

- le second site correspond à l'interaction de la Lys¹³ du ligand avec l'Arg¹⁸⁶ et les résidus environnants Phe¹⁸⁴, Leu¹⁸⁷ et Ile¹⁹⁰. Les deux interactions servent chronologiquement à la reconnaissance du ligand qui se lie par son extrémité C-terminale au site 1, puis au rapprochement et à la liaison de la partie intermédiaire du ligand au site 2^{197,213}.

□ Région juxtamembranaire

Plusieurs études utilisant des formes chimériques du R-PTH1, montrent que l'interaction entre la partie N-terminale de la PTH et la région juxtamembranaire du récepteur est importante pour son activation. En effet, la Ser³⁷⁰, la Val³⁷¹ et la Leu⁴²⁷ localisées à l'extrémité extra-cellulaire des domaines transmembranaires TM5 et TM6 sont déterminants pour l'activité agoniste^{197,214}. De plus, la mutation des Trp⁴³⁷ et Gln⁴⁴⁰ situés dans la 3^{ème} boucle extra-cellulaire, empêche la liaison de la PTH(1-34) au récepteur, mais pas de la PTH(3-34), impliquant que ces acides aminés présentent des sites d'interactions avec les résidus 1 et 2 du ligand²¹⁵.

D'autres interactions transmembranaires entre les domaines TM2 et TM7 (Arg²³³-Glu⁴⁵¹) ou TM3 et TM6 (His³⁰⁷-Arg⁴⁰⁸) jouent un rôle primordial respectivement dans la liaison du ligand et le couplage aux protéines G¹⁹⁷. Ces structures sont spatialement proches lorsqu'on considère la structure tridimensionnelle du R-PTH1 (figure I-11).

L'ensemble de ces résidus forme une poche essentielle à l'activation du R-PTH1 par un agoniste, alors que le domaine N-terminal extracellulaire sert à la reconnaissance et au rapprochement du ligand du site actif¹⁹⁷. D'ailleurs, en accord avec cette idée, la délétion de la plus grande partie N-terminale du R-PTH1 (absence du fragment 24-181), ne modifie pas la capacité de la PTH(1-34) à stimuler la formation d'AMPC²¹⁶. En outre, il devient évident que la PTH tronquée (1-14) garde son activité agoniste, surtout lorsque ce peptide peut adopter, ou est figé, dans une conformation en hélice α ^{216,217}. La figure I-

11 montre en trois dimensions le positionnement du ligand dans le R-PTH1, avec le plongeon de son extrémité N-terminale dans la poche d'activation du récepteur. Ce type d'interaction ligand-récepteur semble commun aux récepteurs couplés aux protéines G de classe II.

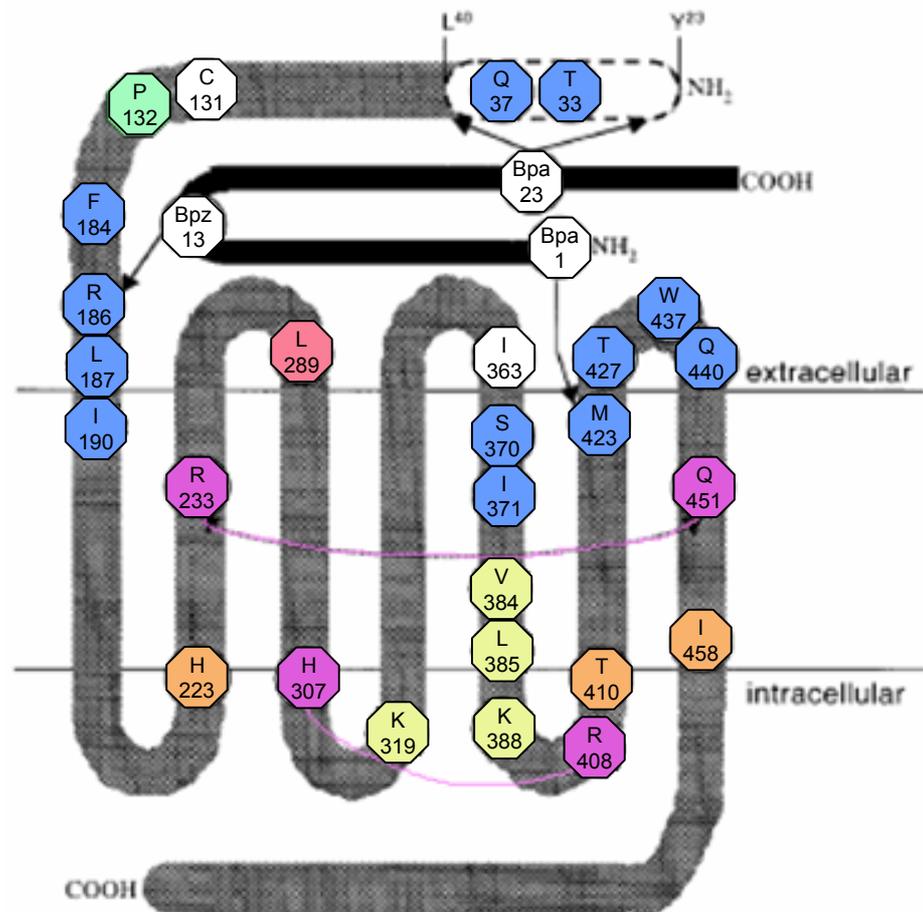


Figure I-10 : Structure du R-PTH1 humain visualisant les sites clés pour l'interaction avec les ligands PTH(1-34) ou PTHrP(1-36) (bleu) ; sites impliqués dans la chondrodysplasie de Blomstrand (vert) ou de Jansen (orange) ; résidus essentiels pour le couplage aux protéines G (jaune) ; sites où les résidus correspondants du R-PTH2 jouent un rôle discriminant entre PTH et PTHrP (rouge) ; interactions interdomaines stabilisant le récepteur (rose). Pour les études de photoaffinité, un groupement photoréactif et hydrophobe, la p-benzoyl-phénylalanine (Bpa), a été introduit dans certaines positions du ligand PTH(1-34) ou PTHrP(1-36). D'après Gardella et Jüppner¹⁹⁷.

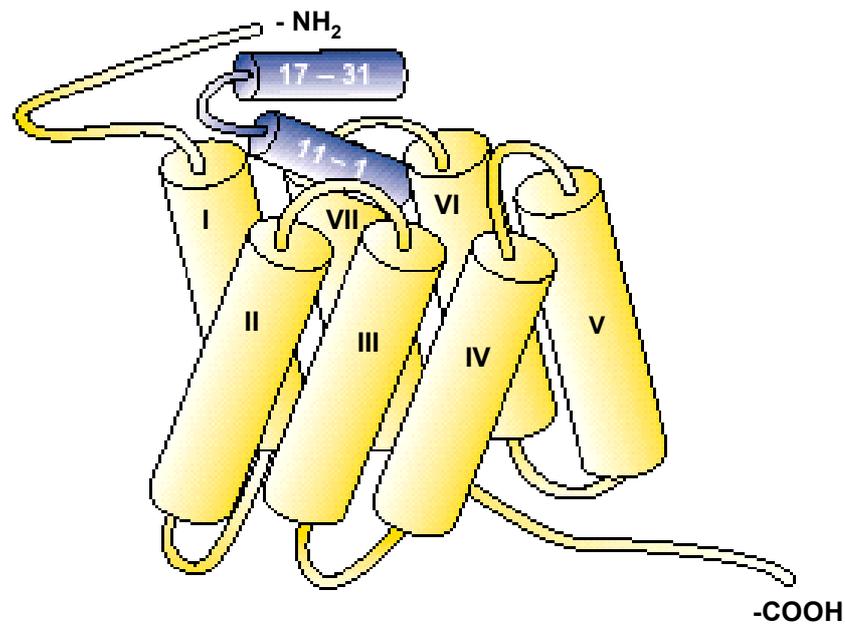


Figure I-11 : Interaction de la PTH(1-34) avec le R-PTH1. Elle comporte deux composantes : 1) une interaction du domaine C-terminal de la PTH(1-34), soit les résidus 17-31, avec la partie N-terminale extracellulaire du récepteur ; 2) une interaction entre le domaine N-terminal de la PTH, résidus (1-11) et la région juxtamembranaire du récepteur. Les deux composantes interviennent respectivement dans la liaison au récepteur et dans son activation ¹⁹⁸.

□ Dimérisation

Le récepteur se comporte comme un dimère maintenu par des ponts disulfures. Chacun des monomères a un poids moléculaire de 85 kD à l'état glycosylé et 55 kDa à l'état non glycosylé ^{218,219}. Par analogie à d'autres systèmes de transduction du signal, la dimérisation pourrait être une étape essentielle dans l'activation du récepteur.

□ Résidus cystéine extra-cellulaires

L'action d'un agent réducteur tel que le dithiothréitol conduit à une perte totale de la capacité de liaison du récepteur PTH/PTHrP ²²⁰ indiquant qu'un ou plusieurs ponts disulfures maintiennent sa structure tertiaire. Des études de mutagenèse ponctuelle montrent que les 6 résidus Cys de la partie N-terminale extra-cellulaire sont indispensables pour la liaison des agonistes au récepteur.

□ Sites de N-glycosylation

Le clonage du récepteur PTH/PTHrP de 4 espèces (rat, opossum, souris et homme) a révélé la présence de séquences consensus (Asn-Xxx-Ser/Thr) caractéristiques de sites potentiels de N-glycosylation. Ces sites sont localisés sur le domaine N-terminal extra-cellulaire du récepteur au niveau des acides aminés en position 151, 161, 166 et 176 chez l'homme ¹⁹⁴ (figure I-7). De nombreux récepteurs couplés aux protéines G sont N-glycosylés et leurs chaînes oligosaccharidiques interviennent directement dans la fonctionnalité du récepteur. Les travaux de Bisello sur le R-PTH1 humain transfecté

dans les cellules embryonnaires rénales montrent que le récepteur non glycosylé est correctement exprimé sur la membrane plasmique, et lie le ligand qui active normalement les voies de transduction intracellulaires²¹⁹. La N-glycosylation ne semble ainsi pas nécessaire à la fonction normale du R-PTH1 ; son rôle physiologique reste à être déterminé.

Activation du récepteur, signalisation intracellulaire

La liaison d'un ligand agoniste induit un changement conformationnel du récepteur qui favorise l'interaction des protéines G avec les boucles cytoplasmiques. Ce mouvement, commun aux récepteurs de la classe I et II implique les domaines transmembranaires 3 et 6, où l'interaction His³⁰⁷-Arg⁴⁰⁸ que nous avons déjà évoquée est essentielle (figure I-10).

Les récepteurs de la classe II partagent aussi la capacité d'activer de multiples voies de seconds messagers. Ainsi, il est bien établi que le R-PTH1 stimulé par la PTH(1-34) ou la PTHrP(1-36) active à la fois la voie de l'AC/PKA et celle de la PLC/PKC. L'activation de l'AC met en jeu la protéine Gs²²¹⁻²²⁴, l'accumulation d'AMPc étant alors directement responsable de la réduction de calcium cytosolique et d'une relaxation des muscles lisses²²⁵. Une inhibition de l'AC, *via* une protéine Gi, a également été rapportée^{223,226}.

L'activation de la PLC met en jeu la protéine Gq ; elle conduit, *via* l'augmentation d'inositols 1,4,5-triphosphate (IP3) et de diacylglycerol (DAG), à une majoration du calcium cytoplasmique^{224, 227-234}. La PTH minimale (1-14) active à la fois les voies de l'AC et de la PLC²¹⁶, mais un analogue N-substitué, la (Gly¹)PTH(1-28), semble sélectif de l'AC²³⁵. Ce résultat n'a pour l'instant pas été confirmé.

Le R-PTH1 ne stimule cependant pas les deux voies de signalisation de manière identique. En effet, l'agoniste active généralement la voie de l'AC/PKA avec une plus grande affinité et efficacité apparente que la voie de la PLC/PKC²³⁶. Le type cellulaire semble jouer un rôle important dans cette stimulation privilégiée de l'une ou l'autre voie. Ainsi, seule la voie de l'AC est activée dans les CMLV ou ostéoblastiques Ros 17/2.8²³⁷⁻²³⁹, celle de la PLC dans les kératinocytes²⁴⁰, les cardiomyocytes ou les cellules endothéliales²³⁹, alors que les deux voies sont activées dans les cellules épithéliales rénales LLC-PK²⁴¹. Un déficit relatif en protéines G α q a été évoqué pour expliquer l'absence d'activation de la voie PLC/PKC dans les CML aortiques puisque la surexpression de ces protéines dans les cellules A10 restaure une réponse PLC/PKC-dépendante de la PTHrP²³⁸. Plus récemment, Friedman²⁴² a proposé une explication plus séduisante, *via* l'interaction du domaine C-terminal du R-PTH1 avec des protéines adaptatrices, cytoplasmiques, NHERF1 ou NHERF2 (pour « Na/H exchanger regulatory factor »).

Interaction du R-PTH1 avec NHERF

La régulation fonctionnelle des récepteurs couplés aux protéines G par des protéines interagissant avec leur extrémité C-terminale cytoplasmique commence à être de mieux en mieux connue²⁴³. Le R-PTH1 n'échappe pas à cette régulation, notamment *via* NHERF²³⁹. NHERF est une protéine de 50 kDa comportant deux domaines PDZ, PDZ1 et PDZ2. Ces domaines sont capables de lier simultanément la PLC β 1 et l'extrémité C-terminale du R-PTH1 (motif ETVM), respectivement *via* PDZ1 et PDZ2. Dans les cellules exprimant NHERF1 et 2 (cellules endothéliales), le R-PTH1 forme un complexe avec NHERF qui recrute la PLC et oriente la réponse à la PTH vers l'activation de la voie de la PKC²³⁹. Par contre, dans les cellules n'exprimant pas NHERF (cellules ROS 17/2.8), la PTH induit une stimulation massive de l'AC. La situation est plus complexe dans le tubule proximal où le R-PTH1 est présent à la fois sur la membrane basolatérale et luminale, mais est couplé respectivement aux voies de l'AC/PKA et de la PLC/PKC. L'activation des deux récepteurs conduit à l'internalisation du cotransporteur Na/Pi et inhibe l'absorption des phosphates²⁴⁴. Là encore, la spécificité des voies de signalisation dépend de la présence de NHERF sur la bordure de ces cellules polarisées²⁴⁵. L'extrapolation de ces régulations à d'autres types cellulaires ne peut cependant pas être faite. Ainsi, au niveau des CMLV, NHERF serait présent sans que le R-PTH1 ne soit couplé à la voie de la PLC/PKC (Friedman, résultats personnels).

Cette régulation des voies de signalisation du R-PTH1 par la formation d'un complexe avec NHERF rejoint la régulation de l'expression membranaire du R-PTH1 et de son internalisation qui relève là encore d'interactions protéine/protéine avec la β -arrestine et probablement aussi avec NHERF.

Désensibilisation et internalisation du R-PTH1

La désensibilisation des récepteurs correspond à une perte de leur capacité à répondre à l'agoniste. Ce phénomène est un mécanisme physiologique général des RCPG qui leur permet d'interrompre la réponse en cas de stimuli continus ou répétés. Ce processus comporte une suite chronologique d'événements débutant par l'activation du récepteur par un agoniste, sa phosphorylation au niveau de l'extrémité C-terminale par des protéines kinases spécifiques, l'internalisation du récepteur après formation d'un complexe avec la β -arrestine, dans des vésicules riches en clathrine, puis son recyclage vers la membrane plasmique ou sa dégradation²⁴⁶. Les principales étapes de la désensibilisation/resensibilisation des RCPG sont résumées sur la figure I-12.

Les processus de désensibilisation/internalisation ont aussi été décrits pour le R-PTH1. Mais, compte tenu des données les plus récentes obtenues avec des récepteurs mutés, l'expression des récepteurs dans divers types cellulaires et la possibilité de suivre en temps réel le trafic intracellulaire du R-PTH1, des ligands et d'autres protéines marquées à la GFP (« green fluorescent protein »), le schéma ci-dessous nécessite d'être revu.

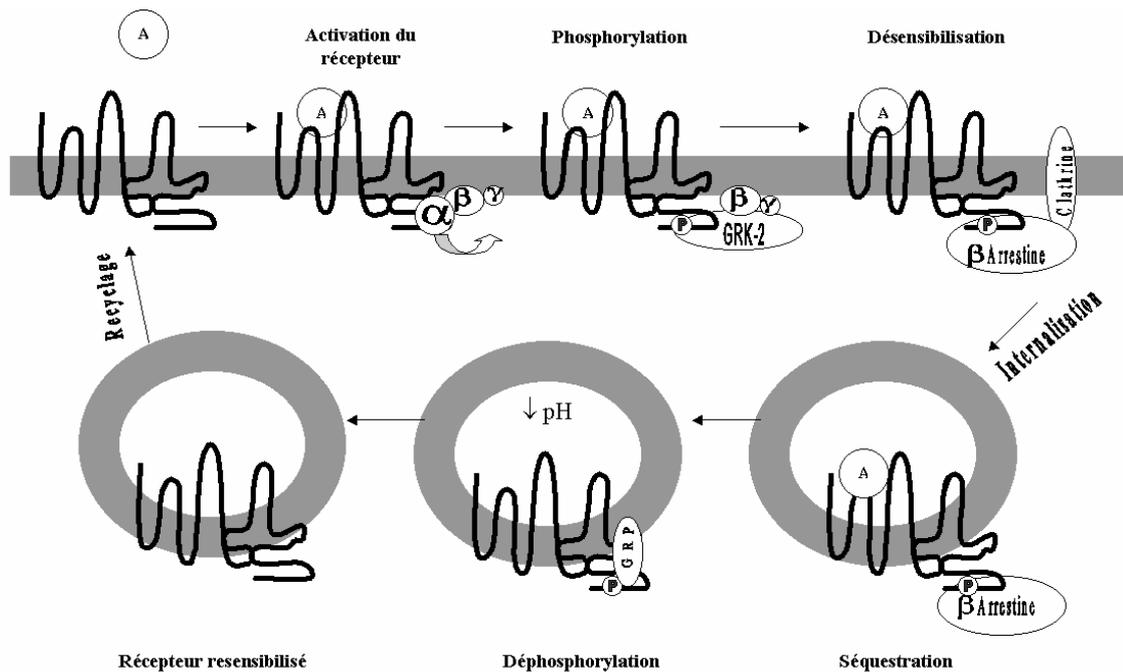


Figure I-12 : Les principales étapes de la désensibilisation/internalisation des RCPGs.

La fixation de l'agoniste (A) à son récepteur provoque un changement conformationnel permettant à la sous-unité α de la protéine G de se lier et d'activer les effecteurs secondaires. Les résidus sérine localisés dans les boucles intracellulaires du récepteur sont susceptibles d'être phosphorylés par les GRKs, la PKA et/ou la PKC. La phosphorylation est suivie de la liaison des β -arrestines, liaison qui provoque l'activation de l'internalisation du récepteur dans des vésicules d'endocytose recouvertes de clathrine. La diminution du pH dans l'endosome permet la déphosphorylation du récepteur qui peut ensuite être redirigé vers la membrane et remplir son rôle de récepteur, soit être dégradé.

- L'interaction d'un agoniste avec le récepteur reste le cas général où la désensibilisation/internalisation du R-PTH1 est observée, en quelques 20-30 minutes^{247,248} ; mais elle dépend de l'induction d'une conformation adéquate du récepteur qui est différente de celle qui favorise la liaison aux protéines G et l'activation des voies signalétiques AC/PLC^{249,250}.
- L'activation de la voie de l'AC/PKA n'est pas nécessaire à l'internalisation du R-PTH1 ; le rôle de la voie de la PLC/PKC reste plus discuté que ce soit sur des cellules HEK-293, des cellules LLC-PK ou des cellules épithéliales distales rénales²⁴⁷⁻²⁵¹.
- La phosphorylation du R-PTH1 sur les sérines du domaine C-terminal intracellulaire (figure I-7) a été décrite *via* la PKA, la PKC et la GRK-2, une kinase des RCPGs²⁵²⁻²⁵⁴ ; cependant, cette phosphorylation n'est pas indispensable puisque la délétion de la queue intracellulaire sur des récepteurs tronqués, la mutation des sérines, ou la surexpression de GRK-2 ne modifient pas l'endocytose

^{248, 253, 255} ; il faut cependant remarquer que l'interaction de la β -arrestine avec un récepteur phosphorylé donne un complexe plus stable ²⁴⁸.

- L'interaction du R-PTH1 avec un antagoniste, la PTH(7-34), conduit aussi à une endocytose du récepteur, mais uniquement dans les cellules n'exprimant pas NHERF telles que les cellules tubulaires distales ou d'ostéosarcome murin ²⁵⁵ ; cet effet est observé sans activation de la PKA ou de la PKC ; il se particularise aussi par le fait de ne pas impliquer la β -arrestine.

- L'induction d'une conformation adéquate par l'agoniste favorise la fixation de la β -arrestine 2 cytosolique au récepteur membranaire en quelques minutes ²⁴⁸ ; par analogie à d'autres RCPGs, elle pourrait se fixer sur la 3^{ème} boucle intracellulaire du récepteur ^{256, 257} et par encombrement stérique, favoriser le détachement des protéines G et l'inactivation du récepteur.

- Le complexe ligand-R-PTH1- β arrestine 2 migre dans le cytosol par un processus impliquant des invaginations riches en clathrine ^{247, 255}.

- Le complexe est localisé dans l'appareil de Golgi et non dans les lysosomes ²⁵⁸ ; le R-PTH1 se recycle rapidement vers la membrane cellulaire après la suppression de l'agoniste ²⁴⁷.

L'ensemble de ce processus apparaît ainsi comme un mécanisme qui inactive transitoirement le R-PTH1 en l'internalisant. Environ 50-60 % des récepteurs sont généralement concernés.

Régulation de l'expression du R-PTH1

Nous avons vu que l'expression du R-PTH1 est sous le contrôle de trois promoteurs P1, P2 et P3. Les caractéristiques respectives de ces promoteurs conduisent à une expression ubiquitaire de l'ARNm du R-PTH1, avec une expression particulièrement élevée dans le rein et l'os ²⁵⁹, cibles traditionnelles de la PTH associées à son rôle dans l'homéostasie phosphocalcique. Cette large distribution, comme celle de la PTHrP elle-même, laissent présager des rôles physiologiques très variés.

Différents agents pharmacologiques sont susceptibles de modifier l'expression du R-PTH1. Ils sont représentés sur le tableau I-5.

Les données montrent que les régulations du R-PTH1 sont spécifiques du type cellulaire. Ainsi, par exemple, la PTH, la PTHrP ou tout agent majorant l'AMPc, diminue l'expression du R-PTH1 (ARNm) sur des cellules de type ostéoblastique, mais non sur des CMLV ou des cellules épithéliales, alors que l'inverse est vrai pour l'Ang II. Sur les CMLV et les cellules épithéliales OK, la PTH et la PTHrP conduisent à une désensibilisation partielle du R-PTH1, se traduisant par une baisse de la liaison au récepteur membranaire (Bmax) et/ou de la réponse adénylate cyclase (AC).

Globalement, les régulations du R-PTH1 ont surtout été étudiées sur les cellules ostéoblastiques et fort peu sur les CMLV.

Stimuli pharmacologiques	Type cellulaire/tissu	ARNm R-PTH1	Protéine R-PTH1	Bibliographie
PTH ou Nle PTH, forskoline, dbcAMP	Cell. épithéliales OK	ND	↓Bmax	260
	Cell. épithéliales OK	→	↓Bmax	261
	Cell. ostéoblastiques SaOS-2	↓	ND	262
	Cell. ostéoblastiques ROS 17/2.8	→	↓Bmax	261
	Cell. ostéoblastiques UMR 106.01	↓	↓Bmax	263
PTHrP, forskoline, dbcAMP	CMLV aortiques	→	↓AMPc	264
	Cell. ostéoblastiques UMR 106	↓	↓Bmax	264
TGF-β1	Cell. épithéliales OK	↓	↓Bmax	265
	Cell. ostéoblastiques ROS 17/2.8	↑	↑Bmax	115
	Ostéoblastes MC3T3-E1	↓	ND	266
Collagène type IV	Cell. épithéliales OK	↓	↓Bmax	267
Collagène type I	Cell. ostéoblastiques UMR 106.06	↑	↑Bmax	268
Collagène type I et V	Cellules cancéreuses du sein	↑	ND	269
Ang II, PMA, endothéline	CMLV aortiques	↓	↓AMPc	264
	Cell. ostéoblastiques UMR 106	→	→	264
	HUVEC cell. endothéliales	→	→	264
Glucocorticoïdes	Cell. épithéliales OK	→	→	261
	Cell. ostéoblastiques ROS 17/2.8	↑	↑Bmax	261
1,25(OH) ₂ vit D ₃	Cell. épithéliales tubule distal	↑	↑Bmax	270
	Cell. ostéoblastiques ROS 17/2.8	↓	↓AMPc	271
	Cell. ostéoblastiques UMR 106.01	↓	↓AMPc	263
Acide rétinoïque	Cell. ostéoblastiques UMR 106.01	↓	↓Bmax	268
Oestrogène	Rein	→	→AMPc	272
TNF α	Cell. ostéoblastiques UMR 106.01	ND	↓Bmax	273
TNF α , IL-1 β	Cell. ostéoblastiques UMR 106	ND	↓BmaxAMP	274

Tableau I-5 : Facteurs pharmacologiques régulant l'expression de l'ARNm du R-PTH1 ou de la protéine elle-même dans divers tissus ou cellules en culture.

ND : Non Déterminé ; dbcAMP : dibutyryl AMPc ; PMA : phorbol 12-myristate 13-acétate ; Bmax : nombre de sites de liaison à la protéine.

R-PTH1 et désordres génétiques

Deux maladies génétiques ont été associées à des mutations du gène du R-PTH1. Il s'agit des chondrodysplasies de Jansen et de Blomstrand, associées respectivement à des mutations activatrices et inhibitrices de l'activité du R-PTH1.

- La chondrodysplasie de Jansen est un désordre autosomique dominant caractérisée par un raccourcissement des membres associé à une hypercalcémie et une hypophosphatémie indépendantes de l'agoniste. Les mutations du R-PTH1 ont été caractérisées en positions H223R, T410P et I458R (figure I-10), sur trois résidus généralement conservés à travers les espèces, témoignant de leur importance fonctionnelle. Elles conduisent à un R-PTH1 constitutivement actif. Les cellules COS-7 transfectées

transitoirement par le R-PTH1 muté sur l'une ou l'autre de ces positions montrent une accumulation basale d'AMPc supérieure à celle obtenue dans les cellules transfectées par le R-PTH1. Le phénotype observé chez les patients atteints de la maladie de Jansen ressemble au phénotype observé chez les souris transgéniques exprimant le mutant H223R sous le contrôle du promoteur $\alpha 1$ du collagène. L'expression chez la souris invalidée pour le gène de la PTHrP du transgène H223R sous le contrôle du promoteur $\alpha 1$ permet de retarder la différenciation des chondrocytes et sauve ces souris d'une mort prématurée ²⁷⁵. Plus récemment, l'expression chez la souris invalidée pour le gène du R-PTH1 de ce même transgène sous le contrôle du promoteur $\alpha 1$ du collagène a permis de restaurer un développement normal du squelette. Cependant, ces souris mouraient tout de même prématurément, montrant l'implication vitale du R-PTH1 dans d'autres processus physiologiques ²⁷⁶.

- La chondrodysplasie de Blomstrand, létale dans les premiers mois de grossesse, est un désordre autosomique récessif caractérisé par une mort prématurée des chondrocytes. Les os longs deviennent courts avec une densité augmentée et une absence de plaques de croissance ²⁷⁷. Dans ce cas, le phénotype des fœtus atteints de cette maladie ressemble au phénotype des souris invalidées pour le gène du R-PTH1. Les fœtus présentent par ailleurs un défaut, voire une absence de développement des glandes mammaires et des dents ²⁷⁸. Les défauts génétiques du R-PTH1 observés dans cette maladie incluent un mutant de délétion (délétion des résidus 373-383), une mutation en position P132L (figure I-10), et la délétion d'un G en position 1122 (résultant du décalage du cadre de lecture et la synthèse d'une protéine tronquée à partir du résidu 364 ²⁷⁸). Ils conduisent à un R-PTH1 inactif. La transfection de cellules COS-7 par des vecteurs d'expression contenant ces divers mutants du R-PTH1 montre une réduction significative de l'action de la PTH sur la production d'AMPc, par rapport à des cellules transfectées par le R-PTH1 sauvage.

Ces deux formes de chondrodysplasie ont permis de révéler l'importance du R-PTH1 pour le développement normal du squelette et d'autres organes chez l'homme.

Le Récepteur PTH-2 ou R-PTH2

En 1995, Usdin ²⁷⁹ a identifié et cloné un second membre des récepteurs de la PTH : le R-PTH2. Ce récepteur a été isolé à partir d'une banque d'ADNc de cortex cérébral de rat. Des séquences d'acides aminés hautement conservées issues des 3^{ème} et 7^{ème} domaines transmembranaires des récepteurs de la sécrétine, de la calcitonine et du R-PTH1 ont servi de matrice et d'amorces pour le clonage. Sa séquence en acides aminés présente 52 % d'homologie avec le R-PTH1 humain. En effet, dans la partie N-terminale, 33 résidus sur 67 sont identiques entre le R-PTH2 et le R-PTH1. Ce récepteur présente aussi une grande homologie (37-42 %) avec d'autres récepteurs de la classe II des RCPGs (sécrétine, VIP1, VIP2 et calcitonine), mais non avec les RCPGs appartenant aux autres classes ²⁸⁰. Cette analyse de séquence place ainsi ce nouveau récepteur dans la famille des récepteur à la sécrétine (classe II).

□ Structure du R-PTH2

Sa structure rappelle les caractéristiques des RCPGs de classe II : une séquence signal, une large extrémité N-terminale extracellulaire, plusieurs séquences d'acides aminés hautement conservées à l'intérieur des domaines transmembranaires, six résidus cystéines très conservés dans le domaine N-terminal. La structure primaire de ce récepteur est représentée sur la figure I-13. Le poids moléculaire du R-PTH2 varie selon son état de glycosylation, mais les expériences de Western blot démontrent la présence d'une forme majoritaire de 84 kD ²⁸¹.

Malgré leur grande homologie de séquences, les gènes du R-PTH1 et R-PTH2 sont localisés sur des chromosomes différents. En effet, chez l'homme le gène codant pour le R-PTH2 se situe sur le chromosome 2, alors que celui codant pour le R-PTH1 est localisé sur le chromosome 3 ²⁷⁹.

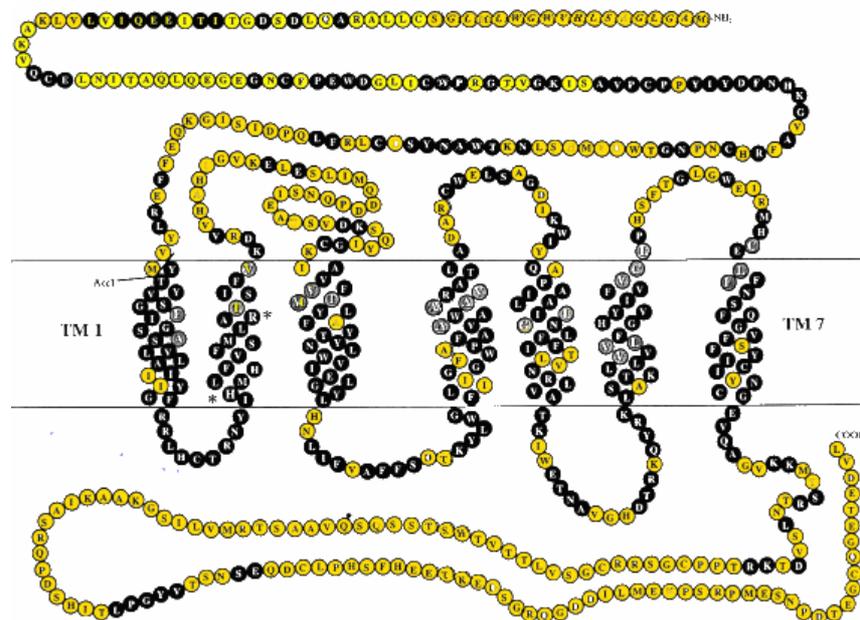


Figure I-13 : Structure primaire du récepteur PTH2 humain. Le R-PTH2 est composé de sept hélices transmembranaires (TM 1 à TM 7). Les cercles noirs représentent les acides aminés conservés par rapport à la séquence du R-PTH1 de l'opossum. Sont également représentés en cercles jaunes, les résidus non conservés entre les R-PTH1 et les R-PTH2. Les cercles gris représentent les acides aminés mutés dans les expériences de Turner et coll. ²⁸². D'après Turner et coll. ²⁸².

□ Profil pharmacologique

Le profil pharmacologique du R-PTH2 humain est fondamentalement différent de celui du R-PTH1, puisque ce récepteur est activé par la PTH mais non par la PTHrP ¹⁶³. La PTH pouvait apparaître potentiellement comme le ligand endogène de ce récepteur, mais, de par sa taille, elle est incapable de franchir la barrière hémato-encéphalique ²⁸¹ et la PTHrP n'est pas un bon ligand du R-PTH2 ²⁸³ initialement décrit dans le système nerveux central. Ceci a conduit à rechercher un ligand naturel du R-PTH2 directement dans l'hypothalamus, où l'expression du R-PTH2 est très élevée. Ainsi fut isolé et identifié le peptide tubéro-infundibulaire de 39 résidus, appelé TIP 39. Ce peptide ne présente que peu

d'homologie avec la PTH(1-34) bovine, avec seulement 9 acides aminés identiques sur 39²⁸⁴. Le TIP 39 est un agoniste sélectif du R-PTH2. Il est capable de se lier au R-PTH1 par son extrémité C-terminale mais exerce alors une activité antagoniste²⁸⁵. Le TIP(7-39) par contre s'avère être l'antagoniste le plus puissant actuellement du R-PTH1 (pKb=7)²⁸⁶, montrant par là la proximité structurale des deux récepteurs. L'activité agoniste de la PTH sur le R-PTH2 relève essentiellement de la présence des résidus Ile⁵ et Trp²³. En effet, la synthèse d'une PTHrP(1-36) modifiée sur ces 2 résidus en font un agoniste du R-PTH2. Le tableau I-5 résume les caractéristiques des principaux agonistes et antagonistes connus des R-PTH1 et R-PTH2.

□ Voies de signalisation

L'analyse des voies de signalisation après activation du R-PTH2 a été réalisée sur des cellules embryonnaires rénales humaines (HEK-293) ou des cellules COS-7 en culture, transfectées de façon stable par le gène du R-PTH2 humain. Comme d'autres RCPGs de classe II, la stimulation du R-PTH2 active deux voies de transduction, la voie de l'AC et celle de la PLC^{279,287-289}.

ligands	ligand	hR-PTH1		hR-PTH2	
		CI ₅₀ (nM)	CE ₅₀ (nM)	CI ₅₀ (nM)	CE ₅₀ (nM)
PTH(1-34)	PTH(1-34)	1-10	< 1	10-100	< 1
PTHrP(1-36)	PTH(1-34)	100-1000	< 1	> 1000	> 1000
[Ile ⁵ , Trp ²³]PTHrP(1-36)	PTH(1-34)	10-100	< 1	1-10	< 1
[Trp ²³]PTHrP(1-36)	PTH(1-34)	10-100	< 1	10-100	> 1000
[His ⁵]PTH(1-34)	PTH(1-34)	> 1000	< 1	100-1000	> 1000
PTHrP(7-34)	PTH(1-34)	10-100	-	100-1000	-
TIP39 humain	PTH(1-34), PTHrP(1-36), TIP39	100-1000	> 1000	10-100	< 1, 1-10
TIP(3-39)	PTH(1-34), PTHrP(1-36)	10-100	0	10-100	0
TIP(7-39) humain	TIP(7-39), PTH(1-34)	1-10	-	10-100	-
TIP(9-39)	PTH(1-34), PTHrP(1-36), TIP39	10-100	0	10-100, > 1000	> 1000

Tableau I-5 : Principaux agonistes / antagonistes des R-PTH1 et R-PTH2 humains d'après^{285,290-292}. Les ligands radioiodinés utilisés sont notifiés dans la colonne 2 du tableau.

□ Distribution tissulaire et fonctions

L'expression du R-PTH2 a essentiellement été décrite dans le cerveau où ce récepteur est le plus abondant. Dans la plupart des autres tissus, son expression est plus limitée.

• Système nerveux central

Le R-PTH2 est largement exprimé dans le cortex cérébral, avec une intensité plus importante dans les aires limbiques que somatosensorielles. L'hypothalamus représente une autre aire d'expression

du R-PTH2, spécialement les neurones hypothalamiques périventriculaires. On le trouve enfin dans les terminaisons nerveuses de l'éminence médiane, les couches superficielles de la corne dorsale de la moelle épinière ainsi que la partie caudale du noyau sensoriel trigéminé^{195,293}. Il semble jouer un rôle dans l'anxiété, la dépression et la nociception^{294,295}.

- **Système endocrine**

Le R-PTH2 est exprimé dans de nombreuses cellules endocrines. Sa présence a été détectée dans les cellules γ des îlots pancréatiques qui synthétisent la somatostatine²⁸¹, ce qui suggère que ce récepteur puisse réguler la synthèse ou la libération de ce peptide et par conséquent affecter la libération d'insuline ou de glucagon. Le R-PTH2 a également été détecté dans la glande thyroïde²⁸¹, notamment dans les cellules C parafolliculaires, ainsi que dans l'épithélium du tractus gastrointestinal, principalement dans les cellules sécrétrices de gastrine ou somatostatine. A un moindre degré, un marquage a été observé au niveau des glandes surrénales^{195,281}.

- **Système cardio et rénovasculaire**

Le R-PTH2 est exprimé dans l'endothélium vasculaire de la majorité des tissus ainsi que dans les CMLV, particulièrement dans les vaisseaux de gros calibre²⁹⁶. Le cœur est également marqué, essentiellement au niveau de la membrane plasmique des cardiomyocytes²⁸¹. Au niveau rénal, l'expression du R-PTH2 semble être limitée à quelques cellules situées au pôle vasculaire glomérulaire susceptibles d'appartenir à l'appareil juxtaglomérulaire. Mais des résultats récents de notre laboratoire montrent cependant que le TIP 39 ne stimule pas la sécrétion de rénine, *in vitro*, sur le rein isolé de rat (thèse Samuel Fritsch, 2003). Notre laboratoire a par ailleurs montré que l'ARNm du R-PTH2 était présent dans les artérioles intra-rénales de rat, mais en proportion bien plus faible que l'ARNm du R-PTH1. Nous n'avons pas pu mettre en évidence de réponse vasculaire clairement liée à l'activation du R-PTH2²⁹⁷.

- **Autres cellules périphériques**

Au niveau du poumon, le R-PTH2 est présent à la fois dans les vaisseaux et les bronchioles. Son ARNm a aussi été détecté dans les testicules et plus précisément dans le sperme et l'épididyme²⁹⁶. La protéine réceptrice est aussi abondamment exprimée au niveau des chondrocytes (surtout dans le cartilage thyroïdien) et globalement nous pouvons noter que son expression est particulièrement élevée dans l'os au cours du développement.

Le Récepteur PTH-3 ou R-PTH3

L'ADNc codant pour un troisième type de récepteur de la PTHrP a été isolé chez le poisson zèbre : le R-PTH3^{298,299}. Ce récepteur, activé spécifiquement par la PTHrP(1-36) humaine, est plus proche du R-PTH1 que du R-PTH2. Contrairement à ce dernier, il ne répond pas au TIP 39 et son affinité pour la PTHrP(1-36) est 20 fois supérieure à celle pour la PTH(1-34). Il est lié à une activation de l'AC

mais non de la PKC. Son équivalent chez les mammifères, de même que son activité biologique, n'ont à ce jour pas encore été déterminés ¹⁹⁷.

Les Récepteurs hypothétiques pour des fragments de la PTHrP

L'activation spécifique de la voie de la PKC et non de celle de l'AC par des fragments **N-terminaux de la PTH ou de la PTHrP**, avait conduit à suggérer l'existence de récepteurs spécifiques. Ces réponses « non classiques » ont été observées au niveau des cellules β -pancréatiques, des lymphocytes et des kératinocytes. La caractérisation du récepteur spécifique de la partie N-terminale de la PTHrP n'a pas encore été établie, mais des éléments laissent suggérer qu'il serait issu d'un gène distinct de celui du R-PTH1 ^{12,300}.

Les fragments intermédiaires, PTHrP(38-94), (38-95) et (38-101) sont présents à forte concentration dans le sérum de patients HHM. Ils augmentent la concentration de Ca^{++} intracellulaire dans différents types de cellules (CMLV, A10, cellules cancéreuses, cellules pancréatiques) par activation de la PKC. Orloff et ses collaborateurs ⁶⁷ ont montré que ces effets étaient reproduits par la PTHrP(67-86), à très faible concentration (10^{-12} M) et non par la PTHrP(7-34). Ils semblent liés à l'activation d'un récepteur reconnaissant spécifiquement les fragments intermédiaires de la PTHrP. Les autres effets de ces fragments de PTHrP seraient d'augmenter le transport de Ca^{++} au niveau du placenta, du tubule rénal et de diminuer la croissance des cellules cancéreuses du sein.

L'existence d'un récepteur pour **la partie C-terminale de la PTHrP** est également fortement suggérée, étant donné les effets directs de la PTHrP(107-111) et (107-139) sur divers types de cellules en culture. Des concentrations picomolaires de ces peptides suffisent à induire une augmentation de Ca^{++} cytosolique et activer la PKC ^{75,301}. L'activation de ce récepteur conduit à une diminution de l'activité des ostéoclastes et inhibe la prolifération des kératinocytes, des cellules ostéoblastiques et des cellules de carcinome du sein ^{301,302}. Sur les cellules d'ostéosarcomes UMR106, la PTHrP(107-139) potentialise la réponse calcique induite par la PTHrP(1-36) elle-même ⁷⁵. Comme ces fragments C-terminaux sont présents dans la circulation dans l'HHM, ils participent probablement aux effets délétères de la PTHrP sur l'os.

Le couple PTHrP/R-PTH1 dans le système cardiovasculaire

Expression dans le coeur

La PTHrP a été identifiée dans le coeur fœtal et adulte de nombreuses espèces de mammifères ^{45,90,144,145,172}. Son expression est plus importante dans les oreillettes que dans les ventricules, sans qu'aucune différence n'ait été notée entre les chambres droites et gauches ¹². Dans les cardiomyocytes auriculaires, la PTHrP est co-localisée avec le facteur natriurétique atrial (ANP), une hormone libérée en

réponse à une augmentation de l'étirement de la paroi auriculaire³⁰³. Deftos⁹⁰ a montré par microscopie immuno-électronique, qu'à ce niveau, la PTHrP était empaquetée dans des granules de sécrétion, suggérant une libération régulée sur le mode neuroendocrine. Au niveau ventriculaire, la présence de PTHrP serait liée à son expression dans l'endothélium des coronaires puisqu'elle n'est pas exprimée dans les cardiomyocytes eux-même³⁰⁴. La PTHrP d'origine coronaire y représente la source majeure de PTHrP active localement. Elle est faiblement mais constamment libérée à partir de la circulation coronaire, que ce soit *in vivo* (cœur isolé perfusé de rat, circulation coronaire du porc) ou *in vitro* (cellules endothéliales coronaires en culture)³⁰⁴. Sa libération est sensible aux variations de débit, *via* les forces mécaniques qui s'exercent sur les cellules endothéliales, mais indépendante des forces de cisaillement activant la voie du NO. La PTHrP est aussi libérée massivement par l'hypoxie³⁰⁴. Son expression est majorée *in vitro* par la stimulation des récepteurs α_{1A} -adrénergiques mais non par l'Ang II³⁰⁵. Enfin, la concentration de PTHrP dans le sinus coronaire est augmentée chez des patients atteints d'insuffisance cardiaque³⁰⁶.

L'expression du/des récepteurs de la PTH/PTHrP n'a pas été formellement évaluée au niveau moléculaire dans les cardiomyocytes ou les cellules endothéliales coronaires. Compte tenu des réponses biochimiques et fonctionnelles, on peut conclure à la présence probable de 3 types de récepteurs sur les cardiomyocytes : le R-PTH1, couplé à la voie AC/PKA, impliqué dans la contraction des cardiomyocytes^{304,307} ; un récepteur reconnaissant la PTHrP(107-111) et un récepteur reconnaissant la PTH(28-48), tous deux couplés à la PKC et impliqués dans les effets trophiques des peptides³⁰⁷. Compte tenu de l'importance de l'endothélium dans la régulation des fonctions cardiaques, Schluter propose que la PTHrP soit considérée au niveau cardiaque comme un facteur endothélial exerçant ses effets sur les cardiomyocytes voisins ou les cellules musculaires lisses sous-jacentes^{304,308}.

Fonctions cardiaques

La PTHrP joue un rôle primordial dans le développement cardiaque. En effet, Quian et ses coll.⁴ ont montré que les souris doublement transgéniques, surexprimant à la fois la PTHrP et le R-PTH1, meurent dès le 9^{ème} jour du développement embryonnaire. Ces souris présentent une hypertrophie du cœur, des contractions ventriculaires non synchronisées ainsi que des anomalies ventriculaires. L'analyse histologique montre une réduction de la paroi des ventricules, l'absence de trabécules et une désorganisation des cardiomyocytes^{4,5}. De même, l'étude des souris invalidées pour le R-PTH1, létale *in utero* en raison de malformations essentiellement osseuses, a révélé une mort massive des cardiomyocytes suite à des malformations mitochondriales. Ainsi, chez ces souris, la principale cause de létalité est la dégénérescence du cœur³⁰⁹. Ces données sont en faveur d'un rôle primordial de la PTHrP dans le développement cardiaque.

La PTHrP(1-34) exerce des effets inotropes et chronotropes positifs sur le cœur. Ces effets ne sont pas la conséquence de réflexes induits par la vasodilatation périphérique en réponse à la PTHrP, puisqu'ils peuvent être démontrés aussi bien sur le cœur isolé. L'effet chronotrope résulte de l'action directe de la PTHrP sur l'automatisme des cellules cardionectrices, étant donné que l'addition de PTHrP à

des cellules de Purkinje en culture potentialise la dépolarisation de ces cellules ³¹⁰. Quant à l'effet inotrope, Ogino ³¹¹ suggère que cet effet soit indirect *via* l'augmentation du flux coronaire suite à une vasodilatation locale induite par la PTHrP. Sur le cœur isolé, la PTHrP induit effectivement une augmentation du flux coronaire de l'ordre de 60 à 70 % ³¹². Un effet direct de la PTHrP sur la contraction des cardiomyocytes a cependant aussi été rapporté ultérieurement ^{304,307}. Dans les modèles physiopathologiques développés par le groupe de Schluter, le rôle de la PTHrP a été recherché, notamment après sa surexpression. Ainsi, la libération basale de PTHrP participe à la régulation de l'hémodynamique locale puisqu'un antagoniste du R-PTH1 augmente la résistance coronaire ³¹³. Dans un modèle d'ischémie-reperfusion, la PTHrP libérée participerait au maintien des fonctions contractiles du myocarde ³¹⁴. Dans l'insuffisance cardiaque congestive ³⁰⁶, la PTHrP produite par le cœur est corrélée aux taux plasmatiques de noradrénaline, d'Ang II, d'endothéline 1 et de BNP (« Brain Natriuretic Peptide ») mais aussi à la fraction d'éjection ventriculaire gauche, évoquant un possible rôle fonctionnel. Globalement, la contribution de PTHrP serait bénéfique et préserverait les fonctions myocardiques.

Expression dans les vaisseaux

Il a été démontré très rapidement après sa découverte que la PTHrP est abondamment exprimée dans la média comme dans l'intima, ainsi que dans les cellules musculaires lisses et endothéliales en culture, que les cellules soient d'origine artérielle ou veineuse ^{121,124,125,225}. Le R-PTH1 est généralement présent dans les mêmes structures.

Dans les CMLV en culture, l'expression de la PTHrP endogène est stimulée par le sérum ¹²¹. Le facteur incriminé est essentiellement l'Ang II, dans la mesure où la saralazine, un antagoniste non sélectif des R-AT, bloque la surexpression de PTHrP induite par le sérum. L'Ang II augmente l'expression de la PTHrP à la fois *via* une majoration de sa transcription et une majoration de la stabilité de son ARNm. L'ARNm de la PTHrP a une demi-vie courte (45 min), probablement du fait de nombreux motifs AUUUA dans la région 3' non traduite ; la demi-vie est augmentée de 2 à 3 fois par l'Ang II ¹²⁴. D'autres agents vasoactifs tels que la thrombine, la sérotonine, l'endothéline, la noradrénaline ou encore la bradykinine sont susceptibles d'augmenter l'expression vasculaire de la PTHrP ^{124,264}.

Les forces mécaniques constituent le second stimulus majeur de la production endogène de PTHrP dans les CMLV ^{125,315}. Ainsi, l'oscillation cyclique du milieu de culture ou la déformation du fond des boîtes de culture (en association avec l'Ang II), mais aussi la distension de l'aorte par un ballonnet *in vivo* ¹²⁵, sont des stimuli qui augmentent l'expression de la PTHrP, avec un maximum 2h après le début de la stimulation. Cet étirement mécanique n'affecte pas la demi-vie de l'ARNm de la PTHrP, mais agit uniquement sur le taux de transcription. Rappelons que l'étirement des muscles lisses de la paroi de différents organes (utérus, vessie, oviducte, intestin) conduisait de même à une surexpression de la PTHrP.

La présence du R-PTH1 dans les CML aortiques a été démontrée très tôt par Northern blot, avec un transcrite de même taille que dans le rein ²³⁷. La régulation de l'expression du R-PTH1 dans les CMLV est fondamentalement différente de celle décrite dans les ostéoblastes. En effet, l'expression du R-PTH1

est abaissée spécifiquement dans les CMLV aortiques par l'Ang II et l'activation de la voie PKC, mais non par la PTHrP exogène ou par l'activation de la voie PKA, alors que l'inverse est vrai sur les cellules ostéoblastiques UMR-106²⁶⁴. Les CMLV se particularisent par ailleurs par une expression de la PTHrP dépendante du cycle cellulaire (accumulation en G₂+M) et un couplage du récepteur exclusivement à la voie AC/PKA (couplage double PKA et PKC dans les cellules UMR-106)^{237,264} (tableau I-5).

La PTHrP a été localisée dans les cellules endothéliales par des techniques immunohistochimiques²²⁵, avant que sa synthèse n'ait été analysée sur des cellules endothéliales en culture provenant de la veine ombilicale³¹⁶ ou de coronaires³⁰⁴. La régulation de son expression a surtout été analysée au niveau coronaire comme nous venons de le voir. Le R-PTH1, non détecté dans les premiers travaux³¹⁶, a été mis en évidence par Southern blot et RT-PCR sur des cellules endothéliales de veine ombilicale³¹⁷, et de vaisseaux pulmonaires³¹⁸, en accord avec les études fonctionnelles qui montraient que la PTHrP(1-34) y modulait la libération d'endothéline³¹⁹.

Effets sur la pression artérielle

Les effets hypotenseurs d'extraits parathyroïdiens sont connus depuis 1925 où Collip et Clarck administraient ces extraits à des chiens³²⁰. La PTH est hypotensive et vasodilatatrice³²¹, mais il n'était pas clair comment concilier cet effet (CE₅₀=0,1-50 nM)³²² avec les concentrations circulantes de PTH extrêmement basses chez l'homme et le rat (0,025 nM). Il est apparu très rapidement après sa purification, son séquençage, son clonage moléculaire et sa synthèse en 1987 que la PTHrP partageait les propriétés hypotensives de la PTH. En effet, l'injection de PTHrP(1-34) ou PTH(1-34) par voie intraveineuse chez le rat diminue la pression artérielle et augmente la fréquence cardiaque de manière similaire³¹². Par des techniques utilisant des microsphères radioactives, Roca-Cusachs³²³ montre que l'hypotension artérielle s'accompagne d'une majoration du débit cardiaque, témoignant de la baisse de la résistance vasculaire systémique. L'évaluation des débits locaux montre alors que la PTH et la PTHrP n'affecte pas les différents territoires de manière identique. Ainsi, face à une diminution de la pression artérielle, les débits coronaire et rénaux sont maintenus voire augmentés, au détriment des débits splanchniques³²³

Les souris transgéniques pour la PTHrP ou le R-PTH1 n'étant pas viables, il n'a malheureusement pas été possible d'obtenir par cette voie une démonstration claire du rôle du système PTHrP/R-PTH1 dans la régulation physiologique de la pression artérielle. Une démarche complémentaire a consisté à surexprimer la PTHrP ou le R-PTH1 spécifiquement dans les CML. Dans ces modèles expérimentaux, le promoteur SMP8 (codant pour l' α -actine du muscle lisse) a été choisi pour cibler sélectivement la PTHrP ou son récepteur dans les CML. Les souris surexprimant la PTHrP ou le R-PTH1 présentent une réduction significative de la pression artérielle systémique comparée à celle de souris témoins^{4,5,324}. Le phénotype cardiovasculaire de ces souris démontre que le système PTHrP/R-PTH1 endogène participe à la régulation de la pression artérielle.

Une autre démarche est actuellement à l'étude dans notre laboratoire. Elle consiste à générer des souris avec une excision conditionnelle de la PTHrP dans les CML grâce au système Cre/lox conditionnel

développé par Daniel Metzger à l'IGBMC. Pour générer ces animaux, deux types de souris sont utilisés : d'une part, des souris floxées pour la PTHrP, développées par l'équipe de Karaplis au Canada³²⁵ (figure I-14), et d'autre part, des souris exprimant la Cre-recombinase spécifiquement dans les CML et dont l'activité est conditionnelle³²⁶. Brièvement, les souris floxées portent deux séquences loxP de part et d'autre de l'exon 4, codant pour la majeure partie de la PTHrP. La Cre-recombinase est capable de recombiner les sites loxP, conduisant ainsi à l'excision de l'exon 4 et à la synthèse d'une PTHrP altérée et inactive. Les souris utilisées expriment spécifiquement dans les CML (sous la dépendance du promoteur du gène SM22 α), une Cre-recombinase fusionnée à un récepteur aux stéroïdes muté (CRE^{ERT2}), activable par le tamoxifène. Le croisement des deux types de souris devrait générer des souris double transgéniques où le traitement par le tamoxifène à l'âge adulte permettra d'invalider sélectivement la PTHrP dans les CML, en évitant les effets délétères de cette invalidation au cours du développement embryonnaire. Ces souris ne sont pas encore disponibles actuellement. Nous avons par contre utilisé dans notre travail expérimental les souris floxées sur le gène de la PTHrP³²⁵ pour obtenir des CMLRv et Ao en culture primaire. Il a alors été possible *in vitro* d'inactiver le gène de la PTHrP par transfection des cellules par la Cre-recombinase.

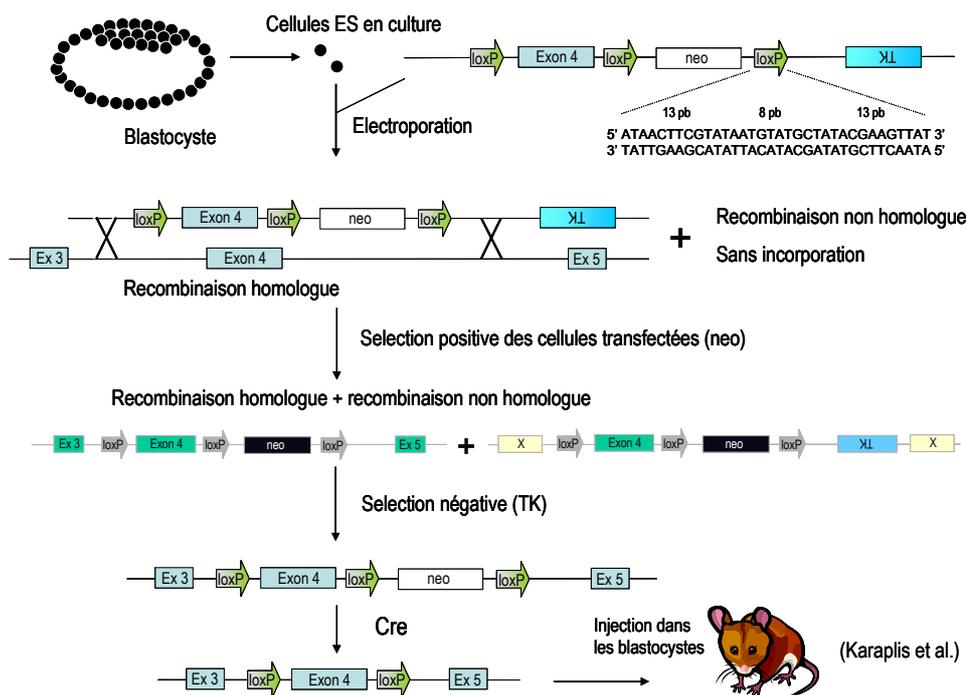


Figure I-14 : Elaboration des souris dont l'exon 4 de la PTHrP est entouré de séquences LoxP.

Les cellules souches ES sont transfectées par électroporation par la construction possédant l'exon 4 de la PTHrP, des sites loxP, 2 ntr, des gènes de sélection. Les cellules transfectées sont sélectionnées par la résistance à la néomycine puis les recombinaisons homologues sont sélectionnées par le gène de résistance TK. Le gène de résistance à la néomycine est excisé par recombinaison par la Cre recombinase et les cellules présentant uniquement l'exon 4 de la PTHrP entouré par les séquences loxP sont injectées dans les blastocystes.

Bien qu'il soit à présent communément admis que la PTHrP exerce un effet hypotenseur, Nagao¹⁷¹ a démontré que l'administration intra-cérébro-ventriculaire de PTHrP augmente la pression artérielle par activation du système sympathique. L'étude récente de Yamamoto³²⁷ montre par ailleurs que l'injection intracérébroventriculaire de PTHrP(1-34) stimule l'expression de l'arginine vasopressine, un puissant vasoconstricteur, dans les noyaux supra-optiques de l'hypothalamus chez le rat conscient avec comme conséquence une augmentation des taux plasmatiques du peptide. L'importance physiopathologique de cette action centrale de la PTHrP, inverse de son action périphérique, n'est actuellement pas du tout connue³²⁷.

Effets vasorelaxants

Testée *in vitro* sur des artères isolées et précontractées, la PTHrP s'avère être un vasodilatateur souvent plus puissant que la PTH elle-même. Cette réponse est rapide, dose-dépendante et directe sur diverses artères (aorte, artère caudale ou rénale de rat, aorte de lapin)^{312,328,329}. La PTH et la PTHrP sont actives par leur partie N-terminale, avec une affinité comparable pour des sites de liaison spécifiques sur les microvaisseaux intrarénaux de lapin³³⁰. La voie de signalisation majeure impliquée dans cette réponse est celle de l'AC/PKA, mais la contribution de l'endothélium est très discutée, ainsi que le rôle du calcium intracellulaire.

□ La voie de l'AC/PKA

Au niveau cardiovasculaire, les propriétés vasodilatatrices de la PTH et de la PTHrP sont dépendantes de l'activation du système AC/PKA dans les CMLV^{1,12}. Il en est ainsi sur l'aorte^{237,264}, les coronaires, le lit vasculaire mésentérique, la circulation cérébrale et les artères rénales et caudales¹². Cette voie de signalisation a particulièrement bien été décrite dans l'aorte. Sur des CML aortiques, la PTHrP augmente la production d'AMPc^{237,264}. Sur des préparations d'anneaux d'aorte de rat, une relation directe est décrite entre l'accumulation d'AMPc et la réduction de la tension isométrique³³¹. Dans les artérioles rénales isolées de rat, la PTHrP stimule l'activité de l'AC avec une CE₅₀ nanomolaire. Des travaux réalisés dans notre laboratoire ont montré la relation entre la stimulation de l'AC et la vasorelaxation rénale³³². Dans les CMLV, le R-PTH1 est d'ailleurs exclusivement couplé à la voie de l'AC, bien que la voie de la PLC existe²³⁸.

□ La voie PLC/PKC et le calcium intracellulaire

Une autre voie de propagation intracellulaire du signal pourrait être celle de la PLC. Mais l'implication de cette voie dans la réponse vasodilatatrice à la PTHrP est encore mal définie. Cependant, les travaux ayant tentés d'élucider le rôle du calcium intracellulaire dans les CMLV indiquent que la PTHrP ne semble pas affecter directement les taux cytosoliques de calcium dans ces cellules¹². En réalité, la PTHrP s'oppose à la mobilisation du calcium induite par des constricteurs tels que l'Ang II sur des CMLV de rat en culture^{237,333}. Cette absence d'effet de la PTHrP sur la voie des inositols phosphates dans ces cellules pourrait résulter d'un défaut de couplage entre le R-PTH1 et la protéine G_{αq}. En effet, la

surexpression des protéines $G_{\alpha q}$, $G_{\alpha 11}$ et $G_{\alpha 14}$ dans les CML aortiques en culture rétablit la capacité de la PTHrP à activer la formation d'IP3 et à augmenter les concentrations cytosoliques de calcium²³⁸.

□ La voie NO-synthase/guanylyl cyclase soluble

La cascade de l'AC/PKA ne semble pas être la seule voie de transduction intervenant dans les réponses vasodilatatrices induites par la PTHrP. Dans le rein isolé de lapin perfusé à débit constant et préconstricte par la noradrénaline, notre laboratoire a pu montrer grâce à l'utilisation d'un large panel d'outils pharmacologiques, que les mécanismes cellulaires impliqués dans l'action vasorelaxante rénale de la PTHrP impliquent non seulement la voie AC//PKA mais aussi partiellement la voie de la NO-synthase/NO/GCs/GMPc^{334,335}. A l'aide de méthodes de dé-endothélialisation (traitement des reins par perfusion de CHAPS ou par perfusion d'un mélange facteur VIII/complément) notre laboratoire a pu montrer que cette action était, de façon inattendue, indépendante de la présence de l'endothélium. Enfin, ces travaux montraient également que les effets de l'inhibition des voies de l'AMPc et de la NO-synthase n'étaient pas additifs, impliquant les deux systèmes dans une même cascade de signalisation cellulaire en réponse à la PTHrP. Autrement dit, chez le lapin, l'action vasodilatatrice rénale de la PTHrP impliquerait des mécanismes cellulaires complexes d'origine non endothéliale, faisant intervenir une interaction entre la voie de l'AMPc et celle de la NO-synthase. Récemment Kalinowski³³⁶ a montré, par une méthode de mesure directe du NO par des sondes porphyriniques, que les fragments N-terminaux (1-34) de la PTH et de la PTHrP à des concentrations nanomolaires stimulent la libération de NO à partir de cellules endothéliales et que cette réponse dépend de la voie de l'AMPc et du système calcium/calmoduline. Ces résultats contrastent avec l'étude réalisée récemment par Sutliff chez la souris³³⁷, où le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF), mais non le NO, participe à la réponse vasculaire induite par la PTHrP.

Par conséquent, l'implication d'un endothélium intact et/ou de la voie de la NO-synthase dans la vasorelaxation induite par la PTHrP n'est actuellement pas complètement élucidé. Les réponses semblent dépendre étroitement du lit vasculaire étudié ainsi que de l'espèce animale.

Effets trophiques de la PTHrP

Les effets trophiques de la PTHrP ont été particulièrement bien étudiés sur les CMLV.

□ Inhibition autocrine/paracrine de la prolifération des CMLV

Les études montrant une augmentation de l'expression de la PTHrP dans des pathologies comme l'athérosclérose³³⁸ ou lors d'exposition des cellules à des agents mitogènes, suggèrent que la PTHrP puissent également jouer un rôle autre que vasoactif, en intervenant sur la prolifération cellulaire³³⁹. Thierry Massfelder³⁴⁰ a testé l'ensemble des fragments de la PTHrP disponibles et susceptibles d'être générés par modifications post-traductionnelles, à savoir les PTHrP(1-36), (1-86), (1-108), (1-141), (38-94), (67-86), (107-138), et (109-138), ainsi que les PTH(1-34) et (1-84) pour leur capacité à modifier

l'incorporation de la ³H-thymidine dans les CML aortiques A10. Parmi ces peptides appliqués de manière exogène, seuls ceux contenant la région N-terminale de la PTHrP inhibaient l'incorporation de ³H-thymidine et diminuaient la densité cellulaire ^{95,238,341}. Cet effet était dose-dépendant et réversible en présence de l'antagoniste du R-PTH1, la PTHrP(7-34). Par ailleurs, les expériences menées par Ishikawa ¹⁰¹ ont montré que la PTHrP(1-34) inhibait également la migration des CMLV de façon dose-dépendante. Cet effet, inhibé par la PTHrP(7-34), était mimé par le dibutyryl-AMPc, mais pas par le dibutyryl-GMPc ³⁴¹. Ces résultats suggèrent que l'effet inhibiteur autocrine/paracrine de la PTHrP sur la migration et la prolifération des CMLV est lié à l'activation des R-PTH1 et de la voie de l'AMPc.

□ **Stimulation intracrine de la prolifération des CMLV**

A l'inverse de la PTHrP administrée par voie exogène, la transfection des CMLV A10 pour la séquence complète de la PTHrP(1-139) augmente fortement la multiplication de ces cellules. Cet effet mitogénique dépend en réalité de la translocation de la PTHrP vers le noyau ⁹⁵. La possibilité pour ce peptide d'être transloqué vers le noyau a été rapporté pour la première fois par Henderson ⁷¹ dans les chondrocytes. Cette translocation semble jouer un rôle important dans le sens où elle protège les cellules de l'apoptose. En effet, sur les chondrocytes, la surexpression de la PTHrP(1-139) et sa localisation dans le noyau retardaient l'apoptose induite par la privation de sérum ⁷¹.

• **Ciblage de la PTHrP vers le noyau**

Au niveau des chondrocytes, Henderson ⁷¹ a montré par immunomarquage la présence de PTHrP endogène dans les composantes fibrillaires denses du nucléole, une structure sub-nucléaire représentant le site majeur de transcription des gènes codant pour les ARN ribosomiques. Ces observations ont été confirmées dans les lignées cellulaires de kératinocytes humains HaCaT ³⁴² et dans les CML aortiques A10 en culture ⁹⁵. Afin d'élucider le rôle de la PTHrP endogène, des expériences de transfection de la PTHrP(1-139) ont été réalisées sur les cellules A10. Dans ce cas, la prolifération cellulaire était stimulée et le pourcentage de cellules positives pour la PTHrP nucléaire était multiplié par 20. Mais cette localisation nucléaire de la PTHrP était diffuse et non exclusivement nucléolaire. Par ailleurs, la localisation de la PTHrP n'est pas homogène au cours du cycle cellulaire ^{342,343}. Dans les CMLV, le marquage nucléaire de la PTHrP est observé principalement dans les cellules en mitose. Le transfert de la PTHrP du noyau vers le cytoplasme semble s'opérer en-dehors de la phase de division et serait dépendant de la phosphorylation du résidu Thr⁸⁵ de la PTHrP par la p34^{cdc2} kinase ^{96,344}, une kinase impliquée dans la régulation de l'import nucléaire de diverses protéines ³⁴⁵.

• **Séquence de localisation nucléaire de la PTHrP**

La région (88-106) de la PTHrP est requise pour son ciblage nucléaire ⁷¹. Cette région, riche en séquences multibasiques, est analogue à la séquence trouvée dans la majorité des protéines nucléaires ; elle est responsable du passage de ces protéines à travers les pores nucléaires. De telles séquences, également trouvées dans les protéines rétrovirales ou dans le FGF (« Fibroblast growth factor »), sont appelées NLS pour « Nuclear Localisation Signal ». Cette séquence est formée de deux groupes

multibasiques (88-91) et (102-106), séparés par un bloc de résidus non basiques capable de transloquer une protéine typiquement cytoplasmique, la β -galactosidase, vers le noyau. Les deux régions multibasiques sont requises pour le ciblage nucléaire de la PTHrP. En effet, la délétion de l'une ou des deux séquences, abolit la translocation de la PTHrP vers le noyau des CML aortiques, ainsi que l'accélération de la prolifération cellulaire⁹⁵.

L'ensemble de ces résultats montre ainsi que la PTHrP endogène est capable de stimuler la prolifération des CMLV par translocation nucléaire *via* une séquence NLS bipartite (voie intracrine), selon un processus qui dépend du cycle cellulaire. Un marquage nucléaire prépondérant dans les cellules en division ou en voie de se diviser suggère que cette translocation nucléaire a lieu au niveau des phases G2/M du cycle cellulaire.

Le système PTHrP/R-PTH1 dans le rein

Expression de la PTHrP

La PTHrP est exprimée dans l'ensemble du système vasculaire rénal, depuis l'artère arciforme jusqu'aux artères post-glomérulaires, à la fois dans la média et dans l'endothélium^{1,346}. Elle est également présente dans les tubules proximaux et distaux, dans les cellules juxtaglomérulaires, dans la macula densa, ainsi que dans les podocytes glomérulaires et la capsule de Bowman^{1,346,347} (figure I-15).

Le R-PTH1 est présent dans les mêmes structures rénales. Les études d'hybridation *in situ*³⁴⁸ ont révélé la présence d'ARNm du récepteur dans les tubules proximaux et distaux, dans la portion corticale de la partie large ascendante de l'anse de Henlé, les podocytes glomérulaires et les vaisseaux intra-rénaux (média et endothélium). Par contre, l'ARNm du R-PTH1 n'a pas été détecté dans la partie fine de l'anse de Henlé, les tubules collecteurs et les cellules mésangiales. L'expression du R-PTH1 est surtout abondante dans les sites tubulaires des actions classiques de la PTH, tubule proximal et distal. L'absence du R-PTH1 dans les cellules mésangiales a un temps été suspectée, mais sa présence est maintenant bien établie par RT-PCR³⁴⁹. L'expression de la PTHrP et du R-PTH1 a été retrouvée dans les différents types cellulaires en culture, les cellules tubulaires épithéliales³⁴⁹, les CMLV intrarénales^{8,350}, les podocytes³⁵¹ et les cellules mésangiales³⁴⁹. Il faut cependant remarquer que les cellules mésangiales quiescentes *in vivo* n'expriment pas normalement la PTHrP, mais l'expression du peptide est majorée dans diverses situations pathologiques comme nous le verrons plus loin³⁴⁷.

Effets tubulaires

La PTH exerce ses effets dits « classiques » dans la régulation de l'équilibre phosphocalcique au niveau des tubules proximaux et distaux où le R-PTH1 est abondamment exprimé. La PTHrP peut produire les mêmes effets, notamment dans l'HHM où elle agit comme une hormone. L'augmentation de la

réabsorption tubulaire du calcium et la réduction de la réabsorption du phosphate, avec une majoration concomitante de l'AMPC néphrogénique, caractérisent en effet le tableau clinique de l'HHM³⁵².

Au niveau du tubule contourné proximal, la PTH et la PTHrP activent la 1α -hydroxylase responsable de la synthèse de $1,25\text{-(OH)}_2$ vitamine D₃. Cette forme active de la vitamine D₃ est essentielle à l'absorption phosphocalcique intestinale, régule la libération de PTH et favorise la calcification de l'os. La PTH régule également la réabsorption des phosphates et du sodium, en inhibant le co-transport Na^+/Pi et l'échange Na^+/H^+ (NHE 3) sur la membrane apicale des cellules épithéliales du tubule proximal. L'activation du R-PTH1 inhibe la réabsorption des phosphates et du sodium en provoquant l'internalisation des transporteurs³⁵³.

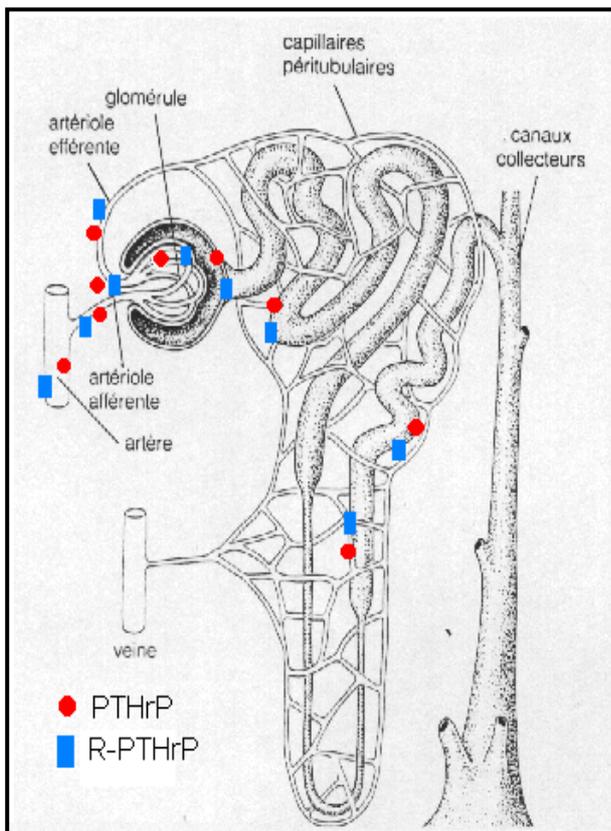
Effets vasculaires et glomérulaires

C'est dans le rein que les effets de la PTHrP sur le tonus vasculaire ont été le plus intensément étudiés et notre laboratoire a largement contribué à ces études. Ce lit vasculaire apparaît comme une cible privilégiée de la PTHrP administrée par voie intra-veineuse chez le rat³²³ ou chez l'homme². Chez le volontaire sain, en effet, la perfusion intra-veineuse de PTHrP (0,9 à 14,9 nmol.min⁻¹) majore de façon concentration-dépendante le débit plasmatique rénal de plus de 50 %, sans affecter la pression artérielle moyenne.

Sur le rein isolé de rat ou de lapin, perfusé à débit constant et précontracté (prostaglandine F_{2 α} ou phényléphrine), la vasodilatation induite par la PTHrP a pu être quantifiée (CE₅₀=3 nM) et analysée quant à la contribution des voies de transduction AC/PKA ou NOS/GC^{334,335,354}. Cet effet vasodilatateur de la PTHrP a ensuite été visualisé sur la préparation du rein hydronéphrotique, et localisé le long de l'arbre artériel intra-rénal : l'effet était majeur dans les artères interlobulaires et la partie proximale de l'artériole afférente du glomérule ; la vasodilatation était moindre dans la partie distale de l'artériole afférente et était totalement masquée dans l'artériole efférente du glomérule du fait de la stimulation concomitante d'une libération de rénine³⁵⁵. La vasodilatation rénale induite par la PTHrP s'accompagne d'une majoration du débit de filtration glomérulaire et de la diurèse^{332,355}.

En dépit d'une expression basale évidente de PTHrP et de son récepteur dans l'ensemble du lit vasculaire rénal, et bien que l'administration exogène de PTHrP induise une vasodilatation rénale importante, il reste à démontrer que la PTHrP endogène participe réellement à la régulation physiologique du débit sanguin rénal et/ou de la pression artérielle. L'administration d'antagonistes du R-PTH1 n'affecte en effet pas le débit sanguin rénal, que ce soit chez l'animal anesthésié, ou dans le modèle du rein isolé perfusé^{335,354}.

Les souris transgéniques invalidées pour le gène de la PTHrP ou du R-PTH1 meurent *in utero* ou à la naissance d'ostéochondrodysplasie. L'examen histologique a révélé une diminution de la prolifération des chondrocytes associée à une maturation prématurée, et une accélération de la formation de l'os^{149,163}. Ces travaux démontraient l'importance de la PTHrP dans le développement osseux normal, mais empêchaient l'étude de l'effet de l'invalidation du gène de la PTHrP ou du R-PTH1 sur les fonctions cardiovasculaires et rénales.



V G T	✓ Expression PTHrP, RPTH1
V G	✓ Effets sur le tonus <ul style="list-style-type: none"> • Vasodilatatrice <i>in vitro/in vivo</i> • Stimule libération de rénine
V G T	✓ Effets sur la prolifération <ul style="list-style-type: none"> • CMLV (inhibition paracrine via le RPTH1 et stimulation intracrine via la SLN) • Cellules mésangiales (stimulation) • Cellules tubulaires proximales (stimulation via PLC/PKC)
V G T	✓ Aspects physiopathologiques <ul style="list-style-type: none"> • Expansion volumique • Réparation tissulaire • Hypertension artérielle • Choc septique • Cancer du rein

Figure I-15 : La PTHrP dans le rein. Sur le schéma de gauche sont représentés les sites d'expression de la PTHrP (en rouge) et du R-PTH1 (en bleu) le long du néphron. La PTHrP et le R-PTH1 sont exprimés dans les trois compartiments tissulaires du rein : les vaisseaux intrarénaux (V), les glomérules (G, cellules mésangiales et podocytes) et les tubules (T). La PTHrP exerce des actions anti- et/ou pro-mitogénique dans les trois compartiments V, G, T. Le système PTHrP/R-PTH1 est impliqué dans la pathogénèse de diverses atteintes rénales par ses actions sur le tonus et/ou la prolifération des cellules constituant les trois compartiments tissulaires.

Une démarche complémentaire, qui consiste à surexprimer le R-PTH1, nous donne cependant d'ors et déjà des indications. Ainsi, les souris surexprimant le R-PTH1 dans le muscle lisse sous le contrôle du promoteur SMP8 de l' α -actine ont une pression artérielle abaissée, mais des fonctions rénales normales³²⁴. Elle réagissent cependant différemment à deux stimuli, l'expansion volémique et la perfusion d'Ang II. En effet, la vasodilatation rénale induite par l'expansion volémique était majorée chez les souris transgéniques et la vasoconstriction rénale induite par l'Ang II était minorée. Dans ces études, le débit plasmatique rénal était mesuré par la clairance de l'acide p-amino-hippurique chez les souris anesthésiées. Ces résultats sont en faveur d'une contribution de la PTHrP endogène comme facteur vasorelaxant endogène modulant les réponses rénales à divers stimuli.

Dans notre laboratoire, nous avons montré que le transfert *in vivo* chez le rat de l'ADNc plasmidique nu codant pour le R-PTH1 humain conduit à une surexpression du récepteur dans le cœur, l'aorte et les artéoles intrarénales, s'accompagnant d'une baisse de la pression artérielle et de la

résistance vasculaire rénale ⁶. Le système rénine-angiotensine était également modifié, nous y reviendrons.

L'ensemble de ces données est actuellement en faveur d'une participation de la PTHrP endogène dans la régulation des fonctions rénales, du moins face à un R-PTH1 surexprimé.

Système rénine-angiotensine

Mon laboratoire d'accueil a, là encore, joué un rôle déterminant pour démontrer que la PTHrP et la PTH étaient capables de stimuler la libération de rénine. Cette démonstration a été faite dans un premier temps *in vitro*, sur la préparation du rein isolé perfusé de rat, rendu non filtrant pour éliminer les régulations *via* la macula densa, et perfusé à pression constante afin d'éviter les régulations *via* les barorécepteurs. La stimulation de la libération de rénine induite par la PTHrP et la PTH apparaît aux concentrations de peptides actives sur le lit vasculaire rénal (nanomolaires) mais avec une CE₅₀ 30 fois plus faible pour la PTHrP (CE₅₀ respectivement de 0,1 et 3 nM) ³⁵⁶. Elle relève d'un effet direct sur les cellules juxtaglomérulaires puisqu'elle est retrouvée sur des glomérules isolés de lapin ou sur une préparation enrichie en cellules juxtaglomérulaires ³⁵⁷. L'activation du R-PTH2 par contre, ne modifie pas la libération de rénine (Samuel Fritsch, thèse 2004), bien que ce récepteur soit exprimé dans les cellules juxtaglomérulaires ^{296,358}.

Le transfert *in vivo* de l'ADNc codant pour le hR-PTH1 conduit à des résultats différents, selon que ce transfert est réalisé chez le rat Wistar normotendu ou le SHR ^{6,8}. En effet, la surexpression cardiovasculaire du hR-PTH1 chez le SHR entraîne une majoration de l'activité rénine plasmatique (ARP) (+10 jours), évoquant un rôle de la PTHrP endogène dans la régulation de la libération de rénine. Le transfert du hR-PTH1 chez le rat Wistar conduit par contre à une baisse de l'ARP (+21 jours) ⁶. Ce résultat inattendu s'explique probablement par la baisse concomitante de l'angiotensinogène plasmatique (d'origine hépatique) qui deviendrait alors le facteur limitant du système rénine-angiotensine circulant. Les raisons de cette disparité entre rats Wistar et SHR ne sont actuellement pas connues.

La complexité des relations entre le système PTHrP et le système rénine-angiotensine est encore renforcée par la régulation que nous avons déjà évoquée, de l'expression de la PTHrP et du R-PTH1 par l'Ang II elle-même. Nous reconsidérerons dans leur globalité ces divers aspects qui sont au centre de nos préoccupations dans ce travail de thèse, à la fin de cette partie bibliographique.

PTHrP et prolifération des cellules vasculaires, tubulaires et mésangiales

Nous avons déjà largement détaillé les effets de la PTHrP sur la prolifération des CML, à propos des CML aortiques A10 en culture. Ces effets sont identiques sur des CMLV originaires d'artérioles intrarénales. Ainsi la PTHrP exerce une double action : une inhibition de la prolifération *via* une action autocrine/paracrine passant par le R-PTH1, et une majoration de cette prolifération *via* une action intracrine ³⁵⁰.

La PTHrP stimule aussi la prolifération des cellules épithéliales tubulaires proximales en culture ^{359,360}, par une voie mettant en jeu le R-PTH1, et par conséquent autocrine/paracrine. Curieusement, cet effet mitogénique semble médié par des mécanismes impliquant l'AMPc ou la PKC ³⁶¹.

Les effets de la PTHrP sur la prolifération des cellules mésangiales ont été très peu étudiés. Deux études montrent cependant que la PTHrP exogène majore la prolifération des cellules mésangiales, évaluée par l'incorporation de ³H-thymidine ^{346,362}. Cet effet était observé avec la PTHrP(1-36) mais aussi la PTH(1-34), évoquant la participation du R-PTH1. Ce résultat peut apparaître surprenant puisque par ailleurs, la PTHrP et la PTH se comportent sur ces cellules comme des « facteurs de relaxation », s'opposant à la contraction et à la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine induite par le PAF (pour « platelet-activating factor »). Cette pseudo-relaxation impliquait la voie de l'AC/PKA, la PTHrP étant effectivement capable d'augmenter la synthèse d'AMPc sur ces cellules ³⁶².

La PTHrP stimule de même la voie de l'AC/PKA sur les cellules épithéliales podocytaires, *via* le R-PTH1 ³⁵¹. Son effet sur la prolifération de ces cellules n'a pour l'instant pas été élucidé.

Le système PTHrP/R-PTH1 en physiopathologie (autre que HTA)

La régulation du système PTHrP/R-PTH1 a été rapportée dans de nombreuses situations pathologiques, touchant principalement le rein, les vaisseaux et le cœur. Les données sont rassemblées sur le tableau I-6.

Insuffisance rénale chronique

Une dérégulation du R-PTH1 a de longue date été rapportée dans l'insuffisance rénale chronique tant en clinique que sur des modèles expérimentaux chez le rat. Cette situation est considérée comme un hyperparathyroïdisme secondaire puisque les taux de PTH circulante sont élevés du fait de la baisse de la calcémie et de la majoration de la concentration plasmatique en phosphates (Pi). Cependant le rein semble résistant aux effets physiologiques de la PTH circulante. Une désensibilisation du R-PTH1 a été évoquée, documentée par la baisse du R-PTH1 sur les membranes corticales rénales par des études de liaison spécifique ³⁶³. L'accumulation des fragments C-terminaux de la PTH, comme la PTH(7-34) pourrait aussi jouer un rôle. La PTH(7-34) est un antagoniste du R-PTH1 mais semble aussi activer des récepteurs spécifiques sur les ostéoblastes, responsables de la baisse de calcémie ³⁶⁴. Cependant, il est maintenant bien établi que la synthèse même du récepteur est en cause (↓ARNm). Cette dérégulation est un phénomène général touchant tous les organes, où l'accumulation de calcium intracellulaire joue un rôle déterminant ³⁶⁵. La contribution de l'Ang II n'a pas été analysée dans ce contexte.

Insuffisance rénale aigüe

Dans les modèles testés expérimentalement, surcharge en protéines, acide folique et cyclosporine, auxquels on peut rajouter l'ischémie rénale, l'expression de la PTHrP est toujours augmentée dans le rein, avec une expression qui peut apparaître dans les cellules mésangiales n'exprimant normalement pas la PTHrP. L'expression du R-PTH1 est généralement diminuée dans les mêmes circonstances. Un lien possible avec le système rénine-angiotensine a été suggéré du fait de l'induction simultanée de l'expression de l'enzyme de conversion de l'Ang II et d'une majoration de l'Ang II^{347,366}. La PTHrP étant un facteur mitogène sur les cellules épithéliales tubulaires, il a été proposé qu'elle participe aux processus de régénération tubulaire^{346,359,366}. Cependant, dans une étude récente³⁶⁷, la surexpression de PTHrP dans les cellules tubulaires proximales n'a pas été capable de protéger le rein contre les répercussions d'une insuffisance rénale aigüe ischémique ou induite par l'acide folique.

Ischémie

Les même perturbations (\uparrow PTHrP et \downarrow R-PTH1) sont rapportées dans d'autres modèles d'ischémie, que ce soit au niveau cardiaque ou cérébral. La surexpression locale de la PTHrP semble contribuer, par ses effets vasodilatateurs sur la circulation cérébrale ou coronaire, à protéger les organes contre les répercussions de l'ischémie. En effet, l'administration exogène de PTHrP ou de PTH réduit la taille de la zone infarctée, alors qu'un antagoniste du R-PTH1 l'augmente^{314,368}. Tout récemment cependant, l'équipe de Schlüter a rapporté que cet effet « bénéfique » de la PTHrP sur la récupération du cœur après une ischémie n'existe plus chez le rat âgé³⁶⁹. La PTHrP endogène exercerait même des effets délétères puisqu'un antagoniste du R-PTH1 améliore la récupération. L'apparition de cet effet « paradoxal » de la PTHrP serait accélérée chez le SHR où les effets délétères de la PTHrP sont présents chez le SHR adulte et âgé.

Resténose artérielle et athérosclérose

L'angioplastie est souvent suivie d'une resténose. Cette situation est reproduite expérimentalement en gonflant un ballonnet dans une artère ou en plaçant un manchon autour d'une artère, deux situations qui induisent une prolifération anormale des CMLV. Une surexpression de la PTHrP a été décrite dans la néointima en prolifération^{370,371}, alors que l'expression du R-PTH1 y était abaissée³⁷⁰. L'application locale, exogène de PTHrP(1-36) autour du manchon placé sur l'artère fémorale s'oppose au développement de la néointima alors qu'un antagoniste du R-PTH1 la majore. En utilisant des transfections avec des formes tronquées de la PTHrP, Nathalie Fiaschi-Taesch³⁷² montre au contraire que la PTHrP, par la voie intracrine, est un facteur essentiel dans la prolifération anormale des CMLV de la néointima. L'altération de l'expression du R-PTH1 favorise probablement l'activité de la PTHrP par la voie intracrine dans cette situation.

Une sténose des vaisseaux apparaît aussi progressivement dans l'athérosclérose, dans les artères où se développent les plaques athéromateuses. Divers auteurs ont recherché si la PTHrP était aussi surexprimée dans ces artères. Il en est effectivement ainsi sur des coronaires et des carotides athérosclérotiques humaines^{338,370,371,373}, avec une surexpression de PTHrP localisée dans la néointima, d'autant plus importante que le degré de sténose du vaisseaux était élevé³³⁸ suggérant là encore que la PTHrP contribue à la prolifération des CMLV. L'expression du R-PTH1 n'a été évaluée que dans une étude où une surexpression a été trouvée³⁷³. Les auteurs suggèrent que la PTHrP soit un médiateur pro-inflammatoire dans les lésions athérosclérotiques. Ceci a été clairement démontré récemment sur des CMLV en culture, où la PTHrP(1-36), *via* l'activation du R-PTH1, majore l'expression du MCP-1 (« Monocyte chemoattractant protein-1 ») et du NF κ B, comme le fait le lipopolysaccharide (LPS). De manière intéressante, dans des carotides de patients, la PTHrP, le R-PTH1 et MCP-1 sont surexprimés et colocalisés dans des plaques athéroscléroseuses³⁷³. Il est intéressant de noter que l'Ang II est un acteur important dans les deux pathologies vasculaires détaillées ci-dessus^{374,375}.

Pathologies inflammatoires

Dans d'autres pathologies à forte composante inflammatoire, telles que l'arthrite rhumatoïde, les pathologies dégénératives du cartilage ou le choc endotoxémique, la PTHrP est surexprimée, souvent en réponse au TNF α , à IL-1 ou IL-6. Elle pourrait alors agir comme un médiateur pro-inflammatoire.

Régime alimentaire

En modifiant la concentration en phosphates (Pi) dans le régime alimentaire, ou en instaurant une restriction alimentaire, les taux plasmatiques de PTH sont modifiés. La régulation du R-PTH1 semble tout à fait indépendante de la PTH plasmatique. On peut remarquer que la surcharge en Pi produit une situation ressemblant à l'hyperparathyroïdisme secondaire décrit dans l'insuffisance rénale chronique, caractérisé par une résistance rénale à la PTH.

Age

Enfin, l'expression du R-PTH1 et les réponses liées à son activation, diminuent avec l'âge, sans que le mécanisme en ait été élucidé.

Pathologie	Régulation de la PTHrP	Régulation R-PTH1 (ARNm, prot, liais R à membrane)	Remarques	Références
Insuffisance rénale chronique		↓ARNm (rein, foie, cœur, os)	Hyperparathyroïdisme secondaire (↓plasma Ca ⁺⁺ , ↑PTH, ↑plasma Pi)	365,376
Nephrectomie 5/6 (rat)	↑PTH plasma	↓ARNm, prot (cortex rénal) →ARNm, prot (medulla rénale) ↓ARNm (rein) ↓Bmax (cortex rénal)	Réversible après PTX	377 378 379 380
Patients	↑PTH C-terminale	↓ARNm (ostéoclastes en culture) ↓ARNm (biopsies rénales)		381 382
Diabète à la streptozotocine (rat, souris)	↑ARNm, prot (glomérules)	↑ prot (rein total) ↓ARNm (tubule proximal)		383
Diabète non insulino-dépendant (patients)	↑PTHrP, ↑ARNm, prot plasma		Calcémie stable	384
Insuffisance rénale aigüe				
Surcharge en prot (rat)	↑ARNm, prot (cortex rénal) (cell mésengiales)	↓ARNm, prot (cortex rénal) (tubules, glomérules)	↑ ECA	347
Acide folique (rat)	↑ARNm (tubules,glomérules)	↓ARNm, prot (tubules, glomérules)	↑ ECA et Ang II PTHrP mitogène sur cell épithéliales tubulaires	366
Cyclosporine (rat)	↑ARNm, prot (cortex rénal) (tubules corticaux)	→ARNm (cortex rénal)		385
Ischémie rénale (rat)	↑ARNm (tubule proximal)	↓ARNm (rein)	Rôle dans la phase de récupération	346
Déplétion en ATP Cell tubulaires proximales	↑ARNm, prot		Rôle dans prolifération des cell	359

iPTH : PTH immunoréactive ; PTX : parathyroïdectomie ; ECA : Enzyme de conversion de l'Ang II ; Pi : Phosphate.

Tableau I-6a : Régulations physiologiques de la PTHrP et du R-PTH1. Les flèches ↓ → ou ↑ ↓ indiquent respectivement une baisse, une stabilité ou une augmentation du paramètre considéré.

Pathologie	Régulation PTHrP	Régulation R-PTH1 (mRNA, prot, liais R à membrane)	Remarques	Références
Ischémie				
Coeur perfusé (rat)	↑PTHrP libérée			304
Cell endothéliales coronaires en culture	↑prot			304
Insuffisance cardiaque chronique (patients)	↑prot (sang du sinus coronaire)			306
Cérébrale (rat)	↑ARNm	↓ARNm (vaisseaux cérébraux)	PTHrP exogène diminue la taille de la zone infarctée	368
Resténose artérielle				
Angioplastie (rat) (aorte, carotide, fémorale)	↑ARNm, prot (néointima)	↓ARNm	PTHrP intracrine :Rôle de la PTHrP dans la prolifération des CMLV PTHrP exogène : antiproliférative	370 ,371 ,372
Athérosclérose				
Plaque d'athérome (coronaire et carotide humaines)	↑iPTHrP	↑ prot	PTHrP, un facteur pro-inflammatoire	338 ,370 ,371,373
Arthrite rhumatoïde				
Liquide synovial genou (ho)	↑iPTHrP		Parallèle à IL-6	386
Fibroblastes synoviaux (ho)	↑ARNm, prot		via IL-1, IL-6, TNF α , PGE $_2$	387 ,388
Cartilage articulaire	↑ARNm, prot			389

iPTH : PTH immunoréactive ; PTX : parathyroïdectomie ; ECA : Enzyme de conversion de l'Ang II ; Pi : Phosphate.

Tableau I-6b : Régulations physiologiques de la PTHrP et du R-PTH1. Les flèches ↓ → ou ↑ ↓ indiquent respectivement une baisse, une stabilité ou une augmentation du paramètre considéré.

Pathologie	Régulation PTHrP	Régulation R-PTH1 (mRNA, prot, liais R à membrane)	Remarques	Références
Endotoxémie/LPS				
Rein, foie, coeur, rate	↑ARNm	↓ARNm	via TNF α et IL-1 β	87 ,390 ,391 ,392
TNF α , IL-1 β et HUVEC	↑ARNm, prot			393
Régime alimentaire				
Déplétion en Pi	↓PTH plasma	↓ARNm (tubule proximal) ↓phosphaturie et excrétion d'AMPc		394
Surcharge en Pi (Hyperparathyroïdisme secondaire)	↑PTH plasma	↓ARNm (rein total) ↓excrétion AMPc	Avec ↓plasma Ca ⁺⁺ dérégulation du R-PTH1	395
Restriction alimentaire	↑iPTH	↑ARNm (rein, os)	Régulation du R-PTH1 maintenue après PTX (indépendante de iPTH)	396
Age				
CML aortiques	↓PTHrP libérée	↓réponse (AMPc, vasodilatation) induits par la PTHrP		397
Ostéoblastes humains	↓PTHrP libérée	↓réponse AMPc		398
Entérocytes, duodénum	↓PTHrP libérée	↓protéine, ↓Bmax		399

iPTH : PTH immunoréactive ; PTX : parathyroïdectomie ; ECA : Enzyme de conversion de l'Ang II ; Pi : Phosphate.

Tableau I-6c : Régulations physiologiques de la PTHrP et du R-PTH1. Les flèches ↓ → ou ↑ ↓ indiquent respectivement une baisse, une stabilité ou une augmentation du paramètre considéré.

Le système PTHrP/R-PTH1 dans l'HTA

Avant d'aborder mon propre sujet de recherche dans ce domaine, je ferai le point sur les résultats obtenus antérieurement par notre laboratoire et d'autres équipes. Il me paraît par ailleurs nécessaire de resituer ce travail dans le contexte actuel des connaissances sur le lien étroit entre HTA, rein et système rénine-angiotensine, puisque mes résultats m'ont conduit à impliquer l'Ang II comme facteur essentiel dans la régulation du R-PTH1.

Le rein dans l'hypertension artérielle

□ Le rein et la régulation physiologique de la pression artérielle

Le rein joue un rôle central dans la régulation à long terme de la pression artérielle par la régulation de l'excrétion d'eau et de sodium, contrôlant ainsi le volume des liquides extracellulaires. Il remplit cette fonction en adaptant le niveau des excrétions au niveau de la pression de perfusion rénale selon la courbe bien connue de « natriurèse de pression » ou de « diurèse de pression » décrite par Guyton⁴⁰⁰. Selon cette courbe, toute augmentation de la pression artérielle conduit à une majoration de l'excrétion hydroosée, ce qui ramène la pression à une valeur normale. L'hypothèse avancée est que l'augmentation de pression de la perfusion rénale augmente la pression et le débit sanguin médullaire. Cette augmentation de pression dans les vasa recta élève la pression interstitielle qui en retour inhibe la réabsorption de sodium au niveau des tubules proximaux et de l'anse de Henlé et induit une perte du gradient cortico-médullaire de sodium⁴⁰¹. Ainsi, dans des conditions de fonctionnement normales, le rein ne tolère pas que la pression artérielle reste élevée. Seule une perturbation de la courbe de natriurèse de pression permettra l'installation d'une HTA. Ceci ne signifie pas que l'HTA est une pathologie d'origine rénale mais qu'elle doit obligatoirement être associée à une anomalie rénale de la courbe de natriurèse de pression, pour pouvoir perdurer.

Dans diverses situations pathologiques, la courbe de natriurèse de pression est déplacée vers la droite, de sorte que le niveau d'excrétion de sodium normal ne puisse être obtenu que grâce à une majoration de la pression artérielle. Il en est ainsi dans quatre situations rencontrées fréquemment dans l'HTA, comme l'augmentation de la résistance vasculaire rénale, l'activation permanente du système rénine-angiotensine-aldostérone, la réduction de la masse rénale ou la réduction du coefficient de filtration glomérulaire. La courbe obtenue dans l'HTA essentielle ressemble à celle établie en cas de majoration de la résistance vasculaire rénale.

□ Les expériences de transplantations rénales croisées

Dans l'HTA essentielle et dans les souches de rats hypertendus, l'augmentation de la pression artérielle est probablement associée à une anomalie rénale. En effet, dans les expériences de transplantations croisées, c'est le rein qui véhicule l'HTA entre différentes souches d'animaux génétiquement hypertendus et leurs contrôles normotendus. En effet, greffer un rein de donneur

hypertendu à un receveur normotendu induit chez ce dernier une HTA soutenue. Ceci est vrai pour toutes les souches de rats hypertendus testés à ce jour, le SHR⁴⁰², SHR stoke prone^{403,404}, rats hypertendus milanais⁴⁰¹, rats Dahl sensibles au sel^{405,406,407} ou rats hypertendus de Prague⁴⁰⁸. A l'inverse, la transplantation du rein d'un animal normotendu à un SHR reverse, voire prévient, le développement de l'HTA^{402,404}. La capacité du rein d'un animal hypertendu à induire une hypertension chez le receveur n'est pas consécutive aux dommages causés par son exposition préalable à l'HTA, puisque la greffe d'un rein provenant d'un animal hypertendu sous traitement anti-hypertenseur aboutit au même degré d'HTA chez un receveur normotendu. Une HTA est également obtenue en greffant le rein d'un jeune raton (stade pré-hypertensif) à un rat normotendu^{403,404}. De même, en clinique, la transplantation de reins de donneurs normotendus normalise de façon permanente la pression artérielle de 6 patients hypertendus en phase terminale de néphrosclérose⁴⁰⁹.

Dans les modèles animaux d'HTA mentionnés ci-dessus, il est bien établi que la majoration de la pression artérielle est liée à un défaut d'excrétion du sodium. Des preuves indirectes d'une altération de la natriurèse de pression ont été obtenues chez des patients hypertendus⁴¹⁰, ou chez des enfants normotendus de parents hypertendus qui majorent anormalement leur pression artérielle en cas de surcharge volémique ou en sodium⁴¹¹.

Toutes ces études de transplantation, chez l'homme ou chez l'animal indiquent qu'une altération rénale participe à l'induction et au maintien de l'HTA.

❑ Le rein, coupable et victime

Le rein est toujours coupable, nous venons de le voir. Mais il est aussi victime⁴¹². Les effets délétères de l'HTA dans les capillaires intraglomérulaires ont été largement documentés par l'équipe de Brenner⁴¹³. Dans leur hypothèse « hémodynamique » de la néphropathie diabétique, cette HTA constituerait au cours de la phase précoce du diabète sucré, le signal initial délétère qui conditionne l'évolution ultérieure vers la glomérulosclérose et l'insuffisance rénale. L'HTA est aussi un facteur aggravant de l'évolution d'une insuffisance rénale, même si l'augmentation de la pression artérielle n'est que de 10 mmHg.

D'un point de vue expérimental, il est ainsi souvent difficile de cerner ce qui relève d'une anomalie rénale « primitive » ou n'est qu'une répercussion de l'effet de l'HTA sur le rein. Nous aurons à envisager ces deux situations dans la problématique de ce travail de thèse, concernant la dérégulation du R-PTH1 dans le lit vasculaire du SHR.

Modèles animaux de l'HTA

Dans le domaine de l'HTA, nous disposons à la fois de modèles de rats spontanément et génétiquement hypertendus et de la possibilité d'induire une HTA expérimentale. Citons pour mémoire quelques exemples :

- HTA génétique : SHR, rat hypertendu lyonnais

- HTA génétique d'origine rénale avérée : le rat milanais qui porte une mutation sur le gène de l' α -adducin, une protéine du cytosquelette ; elle majore l'activité de la Na/K-ATPase dans les cellules tubulaires rénales et augmente la réabsorption du sodium. Des variants de l' α -adducin sont de même associés à une HTA primaire, sensible au sel chez l'homme ⁴¹⁴. Chez le rat Dahl-S et son contrôle-R, la sensibilité au sel tient à des anomalies dans la régulation de leur débit sanguin dans la médulla rénale ⁴¹⁵.

- HTA rénovasculaire selon Goldblatt (2K1C ou 1K1C), liée du moins dans sa phase initiale, à une majoration de la sécrétion de rénine en aval du clamp sténosant posé sur l'artère rénale ; la perfusion continue d'Ang II conduit de même à une HTA stable.

- HTA mimant l'hyperaldostéronisme primaire chez l'homme : rat DOCA-sel.

Les rats DOCA-sel et surtout SHR ont été utilisés dans mon travail expérimental. Je vais par conséquent m'attarder un instant sur ces deux modèles.

□ Rats spontanément hypertendus (SHR)

Les SHR développent spontanément une HTA sévère entre la 5^{ème} et la 15^{ème} semaine d'âge avec une pression artérielle systolique atteignant 200 mmHg. Cette souche de rat a été sélectionnée par Okamoto et Aoki dans les années 60, à partir de deux rats Wistar de leur élevage à Kyoto présentant une pression artérielle relativement élevée. Le fait de parvenir à générer une telle souche hypertendue uniquement par reproduction démontre l'extrême importance du facteur génétique dans la transmission de cette pathologie. L'hypertension chez le SHR est une maladie multifactorielle : trois gènes majeurs impliqués dans la régulation de la pression artérielle. Mais de nombreux autres gènes candidats sont susceptibles de participer à l'installation et au maintien de cette pathologie. Un de ces gènes, appelé Bp1, est situé sur le chromosome 10 et est étroitement lié au gène codant pour l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE). De même a été identifié un locus Bp2 situé sur le chromosome 18 ⁴¹⁶. Le troisième gène majeur impliqué dans la régulation de la pression artérielle est le gène SA localisé sur le chromosome 1. Exprimé de manière 10 fois plus importante chez le SHR par rapport au rat WKY normotendu, ce gène est essentiellement exprimé dans le rein et contribue à l'HTA et à la sensibilité élevée au sel ^{417,418,419}. Sur un plan fonctionnel, le SHR présente une élévation des résistances vasculaires rénales avec un déplacement vers la droite de la courbe de pression-natriurèse. L'incapacité à excréter normalement le sodium est une des causes de l'installation de l'hypertension chez le SHR ⁴²⁰. Ainsi, dans la phase pré-hypertensive (5^{ème} à la 8^{ème} semaine), le SHR présente une augmentation de l'activité de la pompe Na⁺/K⁺-ATPase avec une élévation de la réabsorption du sodium. L'activité de l'isoforme 3 de l'échange Na⁺/H⁺ (NHE-3) situé sur la bordure en brosse des cellules tubulaires proximales est également majorée. Par ailleurs, la dopamine n'exerce plus correctement son action inhibitrice sur NHE-3. Des anomalies dans leur système rénine-angiotensine seront discutées plus loin. Des facteurs neurogéniques contribuent également à la résistance vasculaire élevée du SHR ⁴²¹. Nous reviendrons ci-dessous sur les anomalies hémodynamiques rénales du SHR et leur similitude avec l'HTA essentielle chez l'homme. Le SHR constitue le modèle animal actuellement le plus utilisé pour l'étude de l'HTA.

☐ Rats DOCA-sel

L'excès de sécrétion de minéralocorticoïdes dans l'hyperaldostéronisme primaire est à l'origine d'une forme d'HTA chez l'homme. L'administration d'aldostérone, d'acétate de désoxycorticostérone (DOCA) ou d'autres minéralocorticoïdes, associés à une surcharge en sel (le plus souvent une boisson contenant 0,9% de NaCl) sont les modèles d'HTA minéralocorticoïde les plus étudiés chez l'animal. L'élévation de la pression artérielle est obtenue chez ces animaux par augmentation de la rétention de sodium ⁴²².

En 1975, Gavras et coll. ⁴²³ ont décrit l'évolution de l'hypertension dans ce modèle : la pression artérielle augmente progressivement et atteint un plateau après 3 semaines de traitement DOCA-sel ; la pression artérielle systolique est alors de 190 mmHg. Cette phase est caractérisée par une baisse de la rénine plasmatique, une balance sodée positive, une diurèse élevée et un gain de poids. Cependant, l'élévation de la pression artérielle reste réversible.

La DOCA est administrée à une dose d'environ 50 mg/kg chez le rat par voie sous-cutanée. L'association à une boisson salée accélère le développement de l'HTA. Par ailleurs, une uninephrectomie peut compléter ce protocole, ce qui permet un développement plus rapide et des niveaux d'HTA plus élevés. Cette accélération de l'HTA par l'uninephrectomie pourrait cependant être la conséquence d'une insuffisance rénale due à la réduction de la masse rénale. L'utilisation d'animaux intacts (sans uninephrectomie) est donc préférable car plus proche des cas cliniques.

Nous avons choisi l'HTA DOCA-sel comme modèle d'HTA typiquement associé à une rénine basse.

Les altérations hémodynamiques rénales dans l'HTA

Les altérations morphologiques et fonctionnelles du lit vasculaire rénal contribuant au développement et au maintien de l'hypertension du SHR ont été largement documentées ^{411,424}. Chez le SHR sont décrites : une augmentation de la résistance vasculaire rénale (RVR), une altération de la relation pression-natriurèse, une augmentation du rétrocontrôle tubuloglomérulaire (RTG), une réponse modifiée aux vasoconstricteurs ainsi qu'aux vasodilatateurs, une hypertrophie/hyperplasie des artères préglomérulaires et une réponse excessive des CMLV aux agents mitogènes. L'existence, dans l'HTA, d'un stress oxydatif vasculaire permet actuellement de mieux comprendre certaines de ces altérations.

☐ Augmentation de la RVR

Une augmentation générale des résistances des vaisseaux périphériques contribue fortement à l'augmentation de pression artérielle dans l'HTA génétique. Elle est attribuée à la fois à des changements structuraux des vaisseaux de résistance et à une réactivité accrue aux agents constricteurs ⁴²⁵. De nombreuses études font état d'une augmentation de la RVR chez le SHR par rapport au rat WKY ⁴²⁴. Ceci est vrai pour des RVR mesurées *in vivo* ⁴²⁶ ou *in vitro* dans le rein isolé perfusé ^{427,428}. En outre, les RVR mesurées à un stade préhypertensif sont déjà élevées et le débit de filtration glomérulaire est abaissé. De

la même façon, les patients ayant une HTA essentielle établie présentent une RVR élevée et un débit sanguin rénal diminué ⁴²⁴. Les jeunes patients issus de familles d'hypertendus présentent déjà une RVR élevée avant même de développer une HTA.

❑ Altération de la natriurèse de pression

Il est à présent bien établi qu'une rétention exagérée de sodium constitue l'une des principales causes de l'hypertension, qu'elle soit génétique chez l'animal ou dite essentielle chez l'homme. Chez l'homme et dans les modèles d'HTA chez le rat, la courbe pression-natriurèse est décalée vers la droite ⁴⁰¹. Elle est associée à une réduction du flux sanguin médullaire rénal. Le tonus vasculaire s'oppose alors à l'augmentation normale de la pression interstitielle nécessaire à la natriurèse de pression ⁴¹¹. Le débit sanguin médullaire est principalement modulé par le NO, qui s'oppose notamment aux effets vasoconstricteurs d'hormones circulantes (Ang II, vasopressine) ^{429,430}. La perfusion interstitielle locale d'un inhibiteur de la NOS, diminue le débit médullaire, réduit l'excrétion de sodium et induit une HTA, démontrant par là le rôle essentiel antihypertenseur du NO médullaire. Une altération de ce système est probablement une constante dans toutes les formes d'HTA, compte tenu du stress oxydatif vasculaire qui réduit le NO disponible ⁴³¹. S'y rajoute chez le rat Dahl-S, une sous-expression des trois isoformes de la NOS ainsi que de la superoxyde dismutase (SOD) ⁴¹⁵.

Chez le SHR, la courbe de natriurèse de pression est perturbée avant le développement de l'HTA ⁴⁰¹. Le débit médullaire est abaissé. Sa restauration par l'administration locale intramédullaire de captopril rétablit la natriurèse de pression ⁴²⁹. L'ensemble de ces données établit l'importance du débit médullaire et de la natriurèse de pression dans l'installation de diverses formes d'HTA.

❑ Augmentation du rétrocontrôle tubuloglomérulaire

Chez l'animal normal, une augmentation du taux de filtration glomérulaire et du débit tubulaire en NaCl au niveau de la macula densa provoque une augmentation de la vasoconstriction de l'artériole afférente et une diminution du taux de filtration glomérulaire, avec pour conséquence une diminution de l'excrétion et une augmentation de la réabsorption du sodium. Dans certaines situations (hémorragies, déshydratation), la réactivité de ce rétrocontrôle tubuloglomérulaire (RTG) augmente afin d'éviter les pertes excessives de sodium, et inversement se désactive lorsque le sodium est en excès comme dans les régimes riches en sel. Chez le SHR, l'activité du RTG est élevée malgré l'augmentation de la pression artérielle, ce qui ne permet pas l'excrétion du sodium en excès ⁴¹¹. En fait, l'augmentation du RTG est indépendante de la pression artérielle dans la mesure où elle a lieu même chez un SHR dont la pression artérielle a été corrigée par une constriction aortique. Réciproquement, l'inhibition de l'activité du RTG induite par une surcharge en sel est moindre chez le SHR de 12 semaines comparé au WKY de même âge.

❑ Réponse aux vasoconstricteurs et vasodilatateurs : rôle des protéines G et de l'endothélium

Les anomalies observées dans l'hémodynamique rénale au cours de l'hypertension sont fréquemment associées à une augmentation de la réactivité vasculaire aux constricteurs. En effet, le lit vasculaire rénal est plus réactif aux constricteurs comme l'angiotensine II, l'arginine-vasopressine ou la noradrénaline⁴³²⁻⁴³⁵. La majoration de la réponse vasoconstrictrice rénale à l'Ang II a été largement documentée chez le rat, tant *in vivo* qu'*in vitro*⁴³⁶⁻⁴³⁸. Cette anomalie existe déjà chez le SHR jeune⁴³². Elle n'est liée ni à une différence d'expression des récepteurs à l'Ang II, ni à une dérégulation de l'expression des protéines G (tableau I-7). La surexpression de Gi, décrite au niveau de l'aorte, n'a pas été retrouvée sur le lit vasculaire rénal. La majoration de la vasoconstriction induite par l'Ang II est probablement liée à une moindre atténuation par le NO compte tenu du stress oxydatif, et par d'autres vasodilatateurs activant la voie de l'AC comme la PGE₂ ou la dopamine^{433,434,439,440}. Ces vasodilatateurs induisent une moindre réponse vasodilatatrice chez le SHR, non pas par dérégulation de l'expression de Gs (tableau I-6), mais par défaut de couplage entre les récepteurs et Gs^{411,441}.

❑ Hypertrophie/hyperplasie des parois vasculaires rénales

L'hypertrophie et/ou l'hyperplasie des parois musculaires lisses des artères préglomérulaires participent également à l'augmentation des RVR rencontrée chez le SHR. A l'exception des artéioles afférentes, toutes les artères préglomérulaires (artères interlobaires, arciformes et interlobulaires) du SHR adulte présentent une épaisseur élevée de la média par rapport au diamètre de la lumière de ces vaisseaux^{435,442-444}. L'analyse des CML indique la présence d'un nombre important de couches de cellules et/ou une augmentation du volume de ces cellules dans ces artères. De plus, l'hypertrophie des parois musculaires des artères préglomérulaires apparaît avant le développement de l'HTA et persiste une fois l'HTA établie⁴⁴².

❑ Réponse exagérée aux agents mitogènes

L'hypertrophie des parois musculaires lisses des artères préglomérulaires chez le SHR peut s'expliquer par la réponse exagérée des CMLV de SHR aux agents mitogènes (sérum, Ang II) comme cela a été démontré sur des CML aortiques. Cette prolifération accrue est caractérisée par une entrée accélérée en phase S, une inhibition de contact anormale et une balance apoptose/prolifération en faveur de la prolifération cellulaire⁴⁵⁶⁻⁴⁵⁹. En présence de sérum ou d'agents mitogènes (Ang II), les CMLV de SHR prolifèrent plus vite que celles de rat WKY^{458,460-462} et sont moins sensibles à l'action d'inhibiteurs de la prolifération comme le TGF-β1⁴⁶³. L'hypertrophie des artères préglomérulaires contribue ainsi aux perturbations à long terme de l'hémodynamique rénale et à l'HTA.

L'ensemble de ces données expérimentales chez le SHR, mais aussi plus généralement dans l'HTA, met en évidence une majoration du tonus vasculaire rénal, préglomérulaire, probablement par des mécanismes multiples (majoration du rétrocontrôle tubuloglomérulaire, réactivité aux vasoconstricteurs et vasodilatateurs, hypertrophie des artéioles). Cette majoration du tonus touche aussi la circulation dans la

médulla rénale. Conjointement ces deux effets contribuent à l'altération de la courbe de natriurèse de pression et à l'installation de l'HTA.

SHR : Stade préhypertensif ou SHR jeune (4-7 sem)

Tissus	Protein Gs	Protein Gi α	Protein Gq	Références
Cortex rénal	↓	↓	↓	445
Medulla rénale	↓	↓	↓	445
Tubules	↑	↓	↓	445
Membranes rénales	→	→	→	446
Artères préglomérulaires	→	→	→	441
Cœur, aorte	→	↑	ND	447

SHR : Adulte 3 mois ou plus

Tissus	Protein Gs	Protein Gi α	Protein Gq	Références
Cortex rénal	→	→	→	448
Tubule proximal	→	↑(α_2, α_3)	↓	449
Membranes rénales	↓	→	→	446
Artérioles rénales	→	→	ND	450
CMLV préglomérulaires	→	→	→	451
Artérioles mésentériques	→	→	ND	452
Cœur	→	↑	ND	453
Aorte	→	↑	ND	454
Lymphocytes	→	→	→	455

Tableau I-7 : Expression des différentes protéines G dans le rein, le cœur et l'aorte de SHR, à un stade préhypertensif et à l'âge adulte. L'expression des protéines G a été évaluée au niveau de leur ARNm et/ou des protéines elles-même.

HTA, stress oxydatif et Ang II

Au cours des années récentes, l'existence d'un stress oxydatif dans l'HTA a été amplement documentée, tant dans l'HTA expérimentale que chez l'homme⁴⁶⁴⁻⁴⁶⁶. L'HTA est en effet associée à une majoration des espèces réactives de l'oxygène (ROS), l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). De multiples traitements antioxydants réduisent l'HTA génétique ou expérimentale. Nous allons voir plus précisément 1) quelle est l'origine des ROS vasculaires, 2) la régulation des NADPH oxydases par l'Ang II et 3) les données existant chez le SHR.

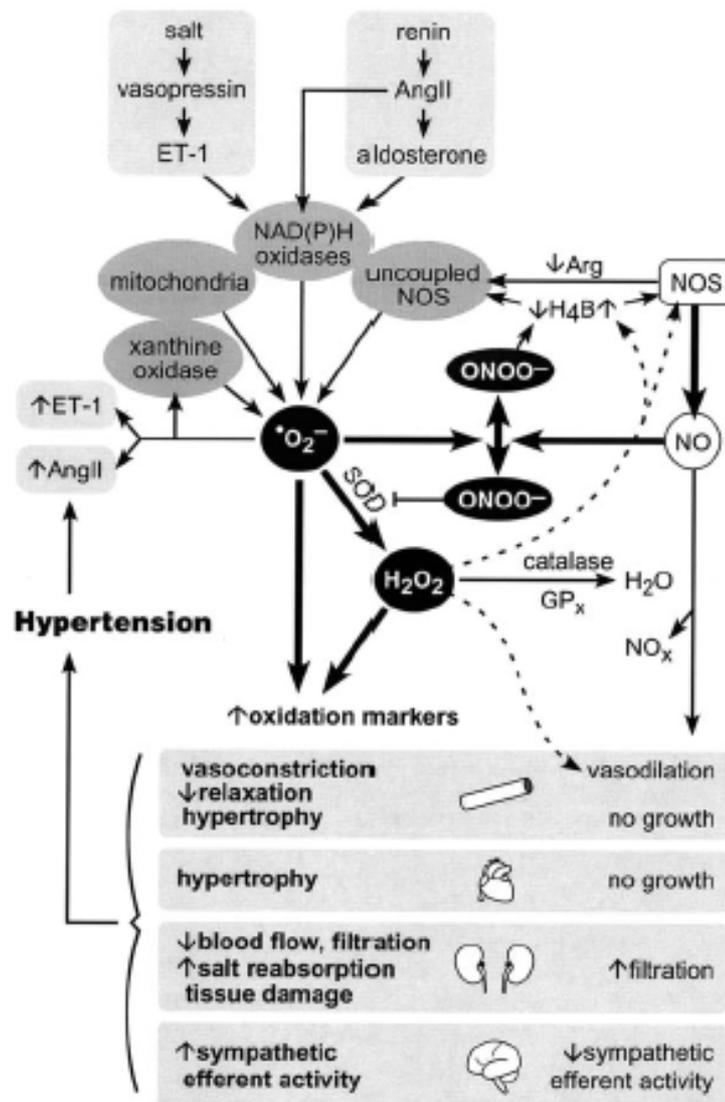


Figure I-16 : Principaux mécanismes conduisant à l'HTA par la formation d'espèces réactives de O_2 (ROS) comme l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le peroxyde d'azote ($ONOO^{\cdot-}$). Les facteurs initiateurs peuvent être l'Ang II, la rénine, l'aldostérone, le sel, l'endothéline-1. La production de ROS met en jeu la NADPH oxydase, la NOS découplée par défaut de L-Arg ou de tétrahydrobioptérine (BH_4), la xanthine oxydase ou la respiration mitochondriale. La surproduction de ROS déséquilibre la balance $O_2^{\cdot-}/NO$, altère les réponses NO-dépendantes et inactive la superoxyde dismutase (SOD) inactivant normalement $O_2^{\cdot-}$. Les ROS induisent alors vasoconstriction, hypertrophie, rétention de sodium et majorent l'activité sympathique, conduisant au développement de l'HTA. D'après Lassègue et Griendling (2004)⁴³¹.

❑ Origine des ROS vasculaires

Les NADPH oxydases sont la source majeure des ROS dans les vaisseaux, bien que ceux-ci peuvent aussi être générés par l'activité de la xanthine oxydase, l'activité mitochondriale ou le découplage de l'activité de la NOS en cas de déficit en cofacteur, la tétrahydrobioptérine (figure I-16). Les NADPH oxydases sont présentes dans les cellules endothéliales, les CML, mais aussi les fibroblastes périvasculaires ⁴⁶⁷. Elles sont formées de complexes membranaires, comprenant NOX (avec l'activité NADPH oxydase ; NOX1, NOX2, NOX4 et NOX5), associé à p22^{phox} (« phagocyte oxydase ») ; leur activation nécessite la phosphorylation de p47^{phox} et de Rac-1 qui migrent alors vers le complexe membranaire (figure I-17). Les NADPH oxydases réduisent O₂ en O₂⁻. Celui-ci agit soit directement, soit *via* la formation de peroxynitrate (ONOO⁻) en réagissant avec le NO. Ceci participe au dysfonctionnement endothélial largement documenté dans l'HTA et d'autres pathologies vasculaires inflammatoires (figure I-16) ^{465,467}. Dans les conditions normales, l'activité des NADPH oxydases vasculaires est constitutivement faible, permettant à l'organisme de cataboliser le O₂⁻ formé par la superoxyde dismutase SOD et la catalase (figure I-16).

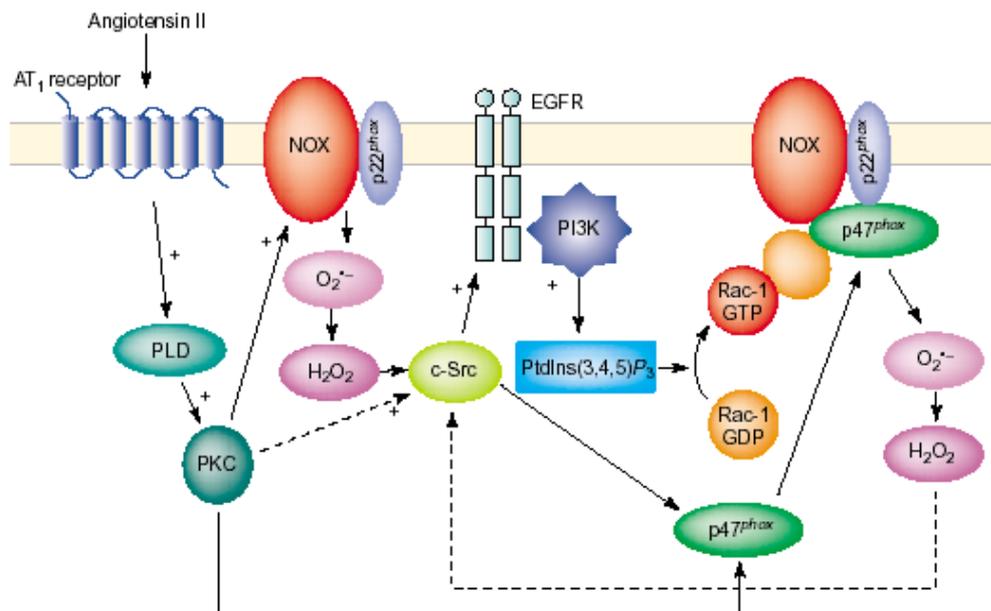


Figure I-17 : Conséquences de l'activation de la NADPH oxydase par l'Ang II. D'après Cai et coll., ⁴⁶⁵.

❑ Régulation des NADPH oxydases par l'Ang II

Les NADPH oxydases vasculaires sont activées par les forces mécaniques, des facteurs de croissance (PDGF), des agents vasoactifs (Ang II, endothelin-1, thrombine, sérotonine) et des cytokines (IL-1, TNF α). Elles sont sur-activées dans diverses pathologies où ces mécanismes sont impliqués, telles que le diabète, l'athérosclérose, l'insuffisance cardiaque, l'ischémie-reperfusion et bien sûr l'HTA ^{467,468}. Les effets de l'Ang II ont été particulièrement bien étudiés dans l'HTA où elle semble contribuer largement à l'activation des NADPH oxydases vasculaires ⁴⁶⁹. L'Ang II, initialement connu pour ses effets

vasoconstricteurs, est reconnu maintenant comme une hormone multifonctionnelle influençant une multitude de fonctions cardiovasculaires, par des voies signalétiques complexes. L'activation du récepteur AT1 est responsable des effets de l'Ang II dans la contraction vasculaire, la croissance cellulaire, les réponses inflammatoires, la rétention d'eau et de sodium. Le récepteur AT2 est impliqué dans l'induction de l'apoptose, la vasodilatation et la natriurèse, mais il est normalement peu exprimé sauf pendant la vie foetale. Les effets induits par l'Ang II *via* le récepteur AT1 sont médiés par de multiples voies de signalisation^{470,471} (figures I-18 et I-19) :

- La voie des phospholipases, notamment celle de la PLC/PKC/Ca²⁺ responsable de la vasoconstriction ;
- la voie des petites protéines G, comme RhoA-kinase sensibilisant la machinerie contractile au calcium libéré ;
- la voie des tyrosines kinases, essentiellement c-Src, impliquée (*via* les MAPKs) dans l'hypertrophie et le remodelage vasculaire ;
- la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) : l'Ang II est capable de stimuler les NADPH oxydases vasculaires ; elle phosphoryle p47^{phox} *via* c-Src, lui permettant de migrer vers la membrane pour se lier au complexe NOX/p22^{phox} ; Rac-1 complète l'activation de l'oxydase membranaire ; cette voie génère O₂^{•-} impliqué dans une réponse inflammatoire (*via* NF_κB) et le remodelage vasculaire (figure I-19).

L'Ang II apparaît ainsi comme un acteur important dans le stress oxydatif vasculaire. Elle devient un acteur clé de processus inflammatoires⁴⁷².

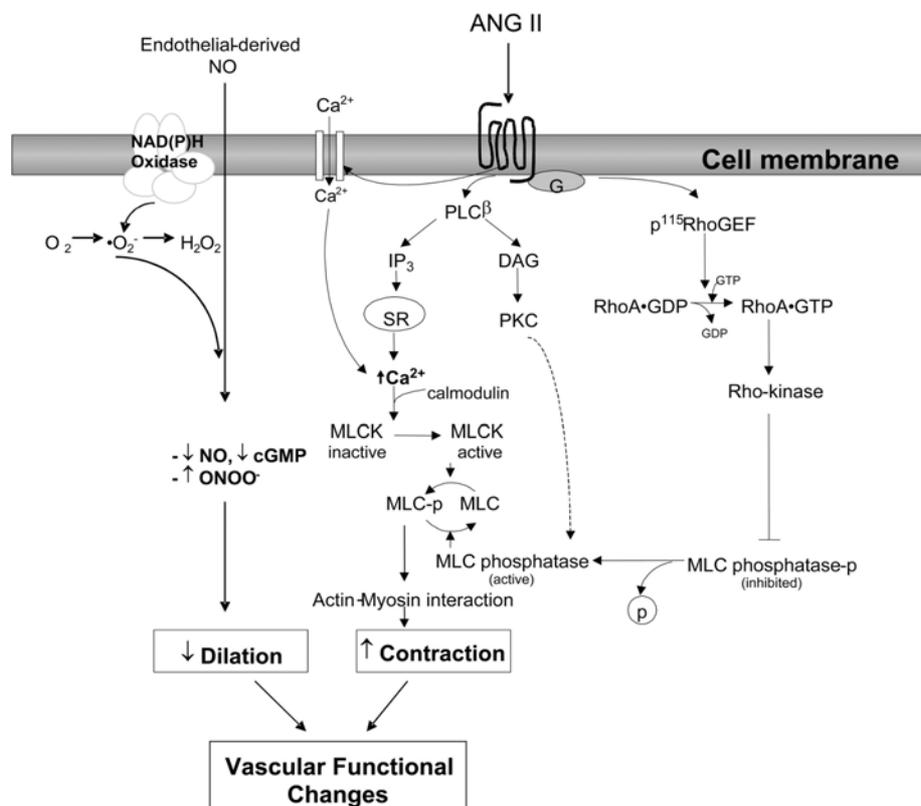


Figure I-18 : Mécanismes moléculaires et cellulaires par lesquels l'Ang II influence les fonctions vasculaires dans l'hypertension.

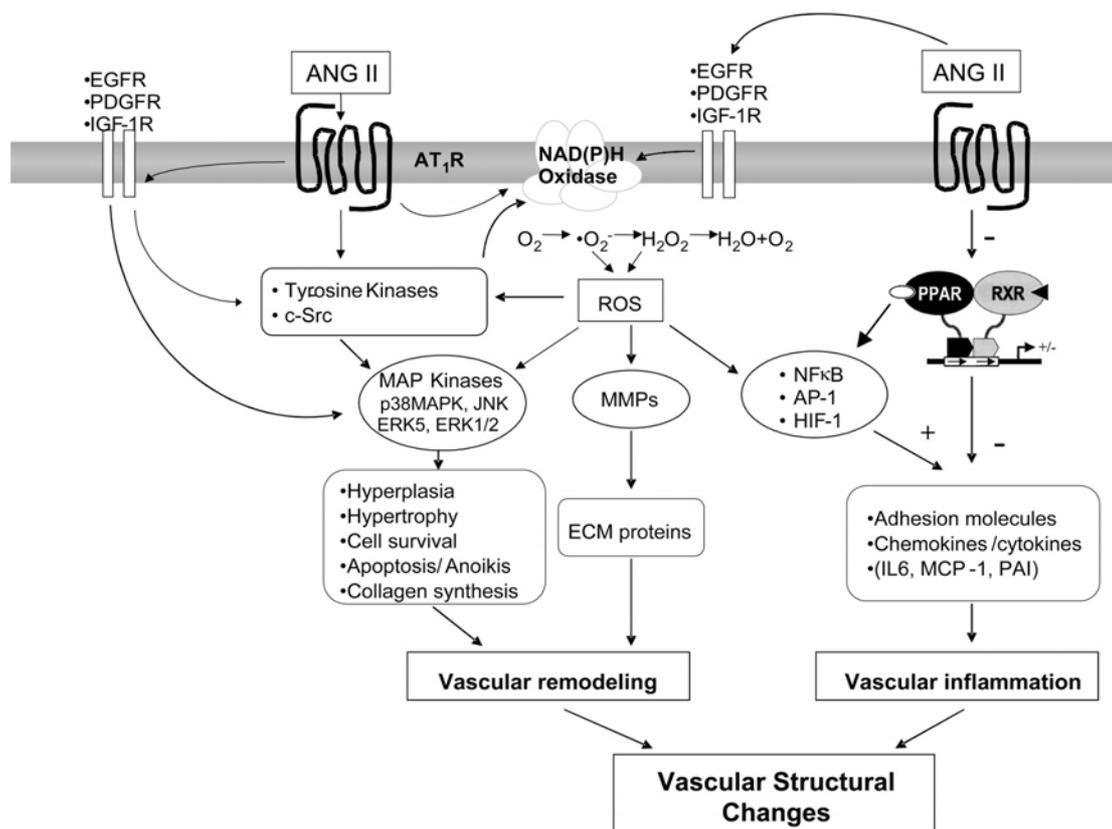


Figure I-19 : Mécanismes moléculaires et cellulaires par lesquels l'Ang II influence la structure vasculaire dans l'hypertension.

□ Stress oxydatif et Ang II chez le SHR

Une production excessive de $O_2^{\cdot -}$ a été rapportée *in vivo* chez le SHR⁴⁷³, mais aussi sur des artères provenant de SHR⁴⁷⁴. Divers composants de la NADPH oxydase (p47^{phox}, p22^{phox}, NOX, Rac-1) sont surexprimés dans le rein de SHR, notamment dans les vaisseaux⁴⁷⁵, conjointement à une sous-expression de l'isoforme 3 de la SOD⁴⁷⁶. La production de NO est altérée chez le SHR comme d'ailleurs dans l'HTA essentielle chez l'homme^{476,477}. Nous avons vu précédemment le rôle de ce défaut en NO dans l'augmentation de la RVR préglomérulaire et médullaire du SHR. De manière intéressante, le traitement du SHR avec un SOD-mimétique (tempol) normalise la pression artérielle et la RVR, tout comme un traitement antioxydant qui diminue la formation de ROS^{478,479,480}. L'ensemble de ces données expérimentales démontre le rôle essentiel du stress oxydatif dans l'HTA du SHR. Comme l'Ang II est capable d'induire le même stress oxydatif chez le rat normal, et qu'un antagoniste des récepteurs AT1 restaure les anomalies du SHR au même titre que l'apocynine, un inhibiteur de la NADPH oxydase^{476,481}, le stress oxydatif du SHR semble étroitement lié au système rénine-angiotensine. Chez le rat DOCA-sel, le stress oxydatif existe également bien que ce modèle d'HTA présente une rénine basse⁴³¹. Sa normalisation par un antagoniste des récepteurs V1 de la vasopressine ou des récepteurs ETA montre que la vasopressine et l'endothéline-1 sont alors des acteurs importants.

□ Système rénine-angiotensine rénal chez le SHR

Le système rénine-angiotensine (SRA) est important pour le maintien de l'HTA des SHR puisque son inhibition est connue de longue date comme normalisant leur pression artérielle à l'âge adulte ou empêchant son développement chez le SHR jeune. Cette inhibition restaure une RVR normale et normalise la courbe de natriurèse de pression. Nous avons déjà vu que les effets de l'Ang II sont amplifiés sur le lit vasculaire rénal, tant du point de vue fonctionnel (vasoconstriction) que structural (hypertrophie), en raison d'une modulation de ces réponses par le stress oxydatif et non d'une surexpression des récepteurs AT1⁴⁸². Il est intéressant de noter que cette hyperactivité rénale à l'Ang II précède l'installation de l'HTA⁴⁸³, apparaît en l'absence d'exposition des vaisseaux à l'HTA (SHR traités par le captopril depuis leur jeune âge) et qu'elle est spécifique du lit vasculaire rénal (inexistant sur le lit mésentérique)⁴³⁶.

Qu'en est-il de l'expression et/ou de l'activité des différents composants du SRA, en d'autres termes, y a-t-il une anomalie du SRA chez le SHR ? Les variations en angiotensinogène (AGT), rénine, enzyme de conversion de l'Ang I (ECA) et Ang II ont été analysées chez le SHR jeune et adulte, tant au niveau plasmatique (SRA circulant) que tissulaire (rein, cœur, aorte). Les données sont résumées sur le tableau I-8. Il faut constater qu'il n'y a aucun signe d'activation du SRA plasmatique, l'activité rénine plasmatique et les taux d'Ang II circulants étant normaux ou même abaissés par rapport aux rats normotendus (WKY ou Donryu), tant chez le SHR jeune qu'adulte. Seul Tamura⁴⁸⁴ rapporte une augmentation de l'AGT plasmatique qui semble corrélée à la pression artérielle systolique. Au niveau tissulaire, notamment sur le rein du SHR jeune, l'activation du SRA suggérée en fonction des variations d'AGT et de rénine ne semble pas conduire à une majoration des concentrations locales en Ang II lorsque les mesures sont faites dans des conditions optimales⁴⁸⁵. Les taux d'Ang II sont même souvent abaissés chez le SHR adulte, que ce soit dans le rein, le cœur ou l'aorte.

Il faut noter cependant que les concentrations en Ang II sont particulièrement élevées dans le rein par rapport au plasma et aux autres tissus^{486,487}. Ceci pourrait alors favoriser un stress oxydatif rénal majeur chez le SHR où les différents composants de la NADPH oxydase sont surexprimés. Enfin, des données récentes mettent aussi en lumière l'infiltration du rein de SHR par des lymphocytes et des macrophages qui expriment différents composants du SRA et contribuent à l'accumulation interstitielle d'Ang II⁴⁸⁸.

Globalement, il apparaît que l'HTA et les anomalies rénales du SHR ont un lien étroit avec le stress oxydatif vasculaire, probablement *via* l'Ang II dont les effets sont amplifiés sous divers aspects. Dans cette thèse sur la dérégulation du R-PTH1 vasculaire rénal chez le SHR, nous avons centré notre recherche dans la seconde partie sur le rôle de l'Ang II dans cette dérégulation. Bien que nous n'ayons pas abordé la contribution du stress oxydatif dans cette dérégulation, il est intéressant de noter que le système PTHrP/R-PTH1 est dérégulé dans de nombreuses situations pathologiques comportant un stress oxydatif. Cet aspect méritera à l'avenir d'être analysé.

Tissus	AGT	Rénine ^{1/}	ECA ^{2/}	Ang II	Références
SHR jeune (2-6 sem)					
Plasma	→	→↓	↓	→↓	485 ,489 ,490
Rein total	↑↓	↑	↓	→↓	485 ,489 ,490,491
Cortex rénal, tubule proximal	ND	→	↓	ND	490,491
Coeur	ND	↑	→	→	485 ,490
Aorte	↓	→	→	↓	485 ,490
SHR adulte					
Plasma	↑→	→↓	↑→↓	→↓	484 ,485 ,489 ,490,492
Rein total	↓	→↓	↓	↓→	485 ,489 ,490
Cortex rénal, tubule proximal	ND	→	→↓	↓	490,493
Coeur	↑	↓	→	↓	485 ,489 ,490,491
Aorte	↓	↓	→	↓→	485 ,489 ,490,491

AGT : angiotensinogène, Ang II : angiotensine II ; 1) Rénine sous forme activité rénine plasmatique, concentration en rénine active ou ARNm ; 2) ECA : activité de l'enzyme de conversion de l'Ang I, Bmax ou ARNm.

Tableau I-8 : Variation des différents paramètres du système rénine-angiotensine chez le SHR jeune ou adulte, comparativement aux rats normotendus : WKY (cas général) ou Donryu⁴⁸⁵. Les flèches ↑ → ↓ indiquent respectivement les variations positives, absentes ou négatives chez le SHR.

PTH, PTHrP et R-PTH1 dans l'HTA

Un faisceau de données, obtenu *in vivo* et sur des CMLV en culture, laisse à penser que le système PTHrP/R-PTH1 est dérégulé dans l'HTA, notamment dans les artérioles intrarénales, et contribue ainsi à l'élévation de la RVR chez le SHR.

□ Hyperparathyroïdisme primaire et HTA

En clinique, l'hyperparathyroïdisme primaire (pHPT), caractérisé par une majoration de la calcémie et de la PTH circulante, est souvent associé à une HTA qui peut être corrigée par la parathyroïdectomie⁴⁹⁴. Une relation directe entre les taux de PTH sérique et la pression artérielle systolique ou diastolique n'a cependant pas pu être établie⁴⁹⁵. La contribution de la PTH semble indirecte, *via* la stimulation du SRA que nous avons déjà évoquée⁴⁹⁶ ou *via* l'hypercalcémie qui altère la réactivité vasculaire endothélium-dépendante^{497,498}.

□ Parathyroïde et HTA

Une perturbation de la régulation de l'homéostasie du calcium a aussi été reconnue de longue date dans l'HTA, avec une augmentation de la PTH sérique, une calcémie abaissée et une excrétion urinaire de calcium anormalement élevée. Ces anomalies sont décrites en clinique, chez des patients avec une HTA débutante ⁴⁹⁹ ou une HTA essentielle établie ⁵⁰⁰. Elles sont aussi retrouvées dans de nombreux modèles d'HTA comme le montrent les expériences de parathyroïdectomies, de transplantation croisées de parathyroïde entre rats hypertendus et normotendus ou de régime enrichi en calcium : toute manoeuvre baissant la PTH circulante, améliore l'HTA. Il n'était cependant pas cohérent de penser que la PTH elle-même puisse être responsable de cette HTA, compte tenu de ses effets vasodilatateurs qu'elle partage avec la PTHrP et que nous avons largement décrits. L'existence d'un facteur circulant hypertenseur, d'origine parathyroïdienne, est dorénavant évoquée ^{501,502}. Bien que sa structure reste encore inconnue, un test ELISA permet actuellement de le doser. Il a ainsi pu être établi, sur des cellules parathyroïdiennes en culture, que sa libération est stimulée par une faible concentration en calcium extracellulaire. Cette stimulation était majeure sur des cellules provenant de SHR qui expriment davantage de récepteurs sensibles au calcium (CaSR) ⁵⁰². Ce facteur circulant est élevé chez le SHR et des patients hypertendus ⁵⁰¹. Libéré dans les mêmes conditions que la PTH, sa nature reste inconnue tout comme son mécanisme d'action.

□ Surexpression vasculaire de la PTHrP : Ang II et stretch

La description d'une surexpression de PTHrP sur des CML aortiques (CMLAo) en culture, dans des conditions mimant *in vitro* certains aspects de l'HTA *in vivo*, a conduit à proposer que la PTHrP joue un rôle dans la pathogénie de l'HTA.

L'expression de la PTHrP (ARNm et/ou protéine) est en effet majorée sur les CMLAo par des vasoconstricteurs dont l'Ang II ^{121,124,315}, un effet potentialisé par l'étirement mécanique des cellules ³¹⁵ et reproduit par l'application de forces de cisaillement ¹²⁴. La surexpression de PTHrP a également été retrouvée en soumettant des aortes *in vitro* à des étirements ⁵⁰³ ou en produisant *in vivo* une distension de l'aorte par le gonflement d'un ballonnet ¹²⁵. Enfin, les effets de l'Ang II sur l'expression vasculaire de la PTHrP ont pu être confirmés *in vivo*, mais avec des différences selon les études. Ainsi, Lorenzo ³⁴⁹ rapporte une surexpression de PTHrP (par immunohistologie) sur des artérioles rénales, rapide (4 jours) mais transitoire (absente à 7 jours) pour des faibles doses d'Ang II peu hypertensives. Pour Takahashi ⁵⁰⁴ par contre, l'Ang II seule n'induit pas de surexpression de PTHrP dans l'aorte (après 4 ou 12 jours), sauf si les animaux reçoivent également un régime riche en sodium et développent ainsi une HTA sévère.

L'ensemble de ces travaux est en faveur d'un rôle modulateur de l'Ang II et/ou du stretch sur l'expression vasculaire de la PTHrP. La production de PTHrP semblait s'intégrer dans un mécanisme de rétrocontrôle modérant localement les effets des vasoconstricteurs ou du stretch. Afin de vérifier ce fait, Noda ⁵⁰³ et Garcia ⁵⁰⁵ ont analysé l'expression de la PTHrP sur des vaisseaux exposés en continu à un stretch important comme dans l'HTA.

❑ Surexpression vasculaire de la PTHrP chez le SHR

Une surexpression de PTHrP est retrouvée au niveau de l'aorte de SHR, mais seulement chez le SHR avec une HTA établie (18 semaines) et non à un stade préhypertensif (4 semaines) pour Noda⁵⁰³, alors que Garcia⁵⁰⁵ rapporte des résultats inverses (surexpression chez le SHR préhypertensif, mais non chez le SHR adulte). Noda⁵⁰³ suggère par ailleurs que cette surexpression pourrait être générale puisqu'elle est également présente au niveau de l'artère mésentérique (vaisseau de résistance). Elle serait directement liée à la pression transmurale, car elle est amoindrie par des traitements antihypertenseurs (antagoniste des récepteurs AT1, hydralazine). Dans ces travaux, la participation de l'Ang II endogène dans la surexpression de PTHrP n'a pas été spécifiquement recherchée. Curieusement, Garcia⁵⁰⁵ rapportait que les CMLAo provenant de SHR étaient insensibles à l'Ang II tout en exprimant normalement le récepteur AT1.

❑ Dérégulation du R-PTH1 chez le SHR

La PTHrP produite par les vaisseaux est susceptible de moduler l'hémodynamique locale en induisant une vasodilatation *via* le R-PTH1. Il est étonnant que l'expression du R-PTH1 n'ait pas été analysée dans l'ensemble des travaux mentionnés ci-dessus. Dans notre laboratoire, Nathalie Fiaschi-Taesch s'est attachée à ce problème, notamment au niveau des artères intrarénales dont nous avons rappelé précédemment l'importance dans l'installation et le maintien de l'HTA. Elle a pu montrer^{7,8} chez le SHR adulte, comparé au rat WKY normotendu, que :

- l'expression du R-PTH1 rénovasculaire était diminuée (ARNm et protéine), de même que la réponse vasodilatatrice rénale induite par la PTHrP(1-36) sur le rein isolé perfusé de rat ;
- l'expression de la PTHrP immunoréactive était majorée dans les artères intrarénales, mais non dans le rein total ou sur l'aorte ;
- la surexpression de PTHrP endogène n'avait pas d'incidence sur le tonus vasculaire du SHR, puisqu'un antagoniste du R-PTH1 n'induisait aucune réponse sur le lit vasculaire du rein isolé prélevé chez un SHR.

Compte tenu de ces résultats, la place du système PTHrP/R-PTH1 dans l'HTA devenait fondamentalement différente. En effet, la PTHrP ne pouvait plus être considérée comme un facteur s'opposant à l'élévation locale des résistances vasculaires. Au contraire, la dérégulation de l'expression du R-PTH1 pouvait contribuer aux RVR élevées chez le SHR. La PTHrP était aussi susceptible de demeurer particulièrement active par voie intracrine chez le SHR et participer au remodelage vasculaire par ses effets sur la prolifération des CMLV. Ces aspects ont été analysés par notre laboratoire.

❑ PTHrP et prolifération des CML rénovasculaires (CMLRv) du SHR

Les CMLRv provenant de rats normotendus (WKY ou Wistar) répondent à la PTHrP comme les CMLAo : la PTHrP exogène diminue leur prolifération *via* l'activation du R-PTH1 membranaire, alors que la PTHrP par voie intracrine majore leur prolifération³⁵⁰. Ces effets sont paradoxalement inversés sur des CMLRv provenant de SHR, la PTHrP exogène majorant leur prolifération alors que la PTHrP par voie

intracrine la diminue. La PTHrP intracrine, probablement la seule active chez le SHR, pourrait ainsi pondérer le remodelage vasculaire rénal dans l'HTA.

□ **Transfert *in vivo* du gène du R-PTH1 chez le SHR**

Cette technique permet la surexpression transitoire d'un gène en évitant les problèmes liés i) aux interactions des gènes mutés avec le développement embryonnaire et ii) aux mécanismes de compensation souvent rencontrés dans les études sur les souris transgéniques. Ces expériences réalisées dans notre laboratoire montrent de manière fort intéressante que l'injection d'un vecteur d'expression (pcDNA3) codant pour le R-PTH1 humain (hR-PTH1) sous la dépendance du promoteur du cytomégalo virus, chez le SHR de 9 semaines conduit à :

- une expression persistante (au moins 3 semaines) du transgène dans le rein, le foie, l'aorte, le cœur, le cerveau et les poumons ; de façon importante, l'expression du transgène dans le rein semble confinée aux vaisseaux ;

- une diminution de près de 30 % des RVR *in vitro*, diminution reversée par un antagoniste du R-PTH1 ;

- un rétablissement partiel de l'action vasodilatatrice rénale de la PTHrP;

- aucun effet sur les paramètres métaboliques mesurés dans le sang et les urines recueillis pendant 24h en cage à diurèse (calcium, sodium, phosphates, potassium et créatinine) ;

- une augmentation de l'activité rénine plasmatique qui explique probablement l'absence d'effet sur la pression artérielle.

L'ensemble de ces résultats suggère que la faible abondance des R-PTH1 dans le système rénovasculaire contribue de façon significative à l'augmentation de la RVR chez le SHR.

Le travail expérimental de ma thèse s'inscrit en continuité de ces résultats obtenus antérieurement dans notre laboratoire. Je me suis plus particulièrement attachée à la compréhension des mécanismes qui sous-tendent la dérégulation du R-PTH1.

Objectifs de cette thèse

Des travaux antérieurs de notre laboratoire ^{7,350} ont montré que l'expression du R-PTH1 était abaissée dans les vaisseaux intra-rénaux du SHR. Cette dérégulation du R-PTH1 allait de pair avec une perte de la réponse vasodilatatrice rénale à la PTHrP, et contribuait à l'élévation de la résistance vasculaire rénale chez le SHR adulte ³⁵⁰.

Dans ce travail de thèse, je me suis attachée à mieux comprendre les mécanismes qui sous-tendent la régulation de l'expression du R-PTH1, en particulier dans l'hypertension artérielle où cette dérégulation contribue à l'altération de l'hémodynamique rénale. Pour ce faire, j'ai utilisé une double approche expérimentale, à la fois *in vivo/ex vivo*, en utilisant des rats hypertendus, et *in vitro*, en réalisant des études sur des CMLV en culture.

- Dans l'étude *in vivo/ex vivo*, des mécanismes de régulation du R-PTH1 chez les rats hypertendus, je me suis en particulier posée les questions suivantes :

- L'altération de la vasodilatation rénale induite par la PTHrP et mise en évidence sur le rein isolé perfusé de SHR, est-elle une réalité *in vivo* ?
- La dérégulation du R-PTH1 est-elle une spécificité vasculaire rénale ou bien touche-t-elle d'autres vaisseaux (artérioles mésentériques, aorte), le cœur (oreillette, ventricule) et la médulla rénale chez le SHR adulte ?
- La dérégulation du R-PTH1 est-elle d'origine génétique chez le SHR, en d'autres termes existe-t-elle déjà chez le SHR jeune, à un stade préhypertensif ?
- Alternativement, quelle est la contribution de l'hypertension artérielle elle-même et/ou du SRA dans cette dérégulation du R-PTH1 ?

- Les résultats obtenus mettant en évidence le rôle de l'Ang II, les mécanismes de la dérégulation du R-PTH1 par l'Ang II ont été analysés sur des CMLV en culture. Je me suis en particulier interrogée sur les points suivants :

- La régulation de l'expression du R-PTH1 par l'Ang II est-elle un processus général sur les CMLV, qu'elles soient d'origine rénovasculaire ou aortique ?
- L'Ang II exerce-t-elle ses effets de régulation sur l'expression du R-PTH1 au niveau transcriptionnel ou post-transcriptionnel ?
- La surexpression de la PTHrP, induite simultanément par l'Ang II, participe-t-elle à la dérégulation du R-PTH1 vasculaire ? Si oui, cette participation met-elle en jeu une PTHrP active par voie paracrine/autocrine ou par la voie intracrine ?
- Qu'en est-il de la régulation du R-PTH1 par l'Ang II sur des CMLV provenant de SHR ?

Afin de répondre à l'ensemble de ces questions, j'ai été amenée à utiliser, et parfois à introduire au laboratoire, des approches expérimentales diverses : réactivité vasculaire *ex vivo* sur le rein ou le lit mésentérique isolés perfusés, débimétrie *in vivo* (rénale et mésentérique) avec administration locale de molécules à tester, traitements anti-hypertenseurs des SHR, induction d'une HTA DOCA-sel à rénine

basse, expression du R-PTH1 (ARNm et protéine, par RT-PCR et Western blot), culture primaire de CML aortiques et rénovasculaires, transfection des cellules en culture. L'ensemble de ces techniques est détaillé dans le chapitre II « Matériel et Méthodes ». Quant aux mécanismes régulant l'expression du R-PTH1, les résultats obtenus au cours des études *in vivo/ex vivo* sont présentés dans le chapitre III, ceux obtenus *in vitro* sur les CMLV en culture sont présentés dans le chapitre IV.

CHAPITRE II

Matériel et Méthodes

Les animaux

Des rats WKY, Wistar et SHR mâles (Iffa-Credo, L'Arbresle, France) ont été utilisés. Ils ont séjourné au moins une semaine à l'animalerie de la Faculté de Médecine avant l'expérimentation, avec un cycle contrôlé jour-nuit de 12h/12h et un libre accès à une alimentation standard (Bouchons AO4, UAR, Villemoisson/Orge, France) et à l'eau du robinet. Ils ont été utilisés à un âge de 4-5 semaines (animaux jeunes) ou à l'âge adulte (11-13 semaines). Les expériences ont été réalisées en accord avec les recommandations de la Communauté Européenne (directive 86/609/EEC) et du Gouvernement Français (décret 87-848) concernant l'utilisation des animaux en recherche.

Les souris floxée sur le gène de la PTHrP ont été générées et mises à notre disposition par le Dr Karaplis (Lady Davis Institute for Medical Research, Montréal, Québec)³²⁵. Ces souris comportant des séquences LoxP de part et d'autre de l'exon 4 du gène de la PTHrP, ont séjourné à l'animalerie de la clinique de la souris (IGBMC, Strasbourg) jusqu'à leur utilisation.

Approches expérimentales *in vitro*

□ Le rein isolé perfusé

Ce modèle *in vitro* permet une évaluation de la réactivité vasculaire rénale, vasodilatatrice et vasoconstrictrice, à l'abri des régulations hormonales ou nerveuses systémiques. Le rein est perfusé en l'absence d'innervation rénale intacte, de système rénine-angiotensine fonctionnel et d'hormones vasoconstrictrices dans le perfusé.

• Isolement et montage du rein

La dissection et la mise sous perfusion du rein droit ont été réalisées selon une technique couramment utilisée dans notre laboratoire^{7,354,506}. Le rat est anesthésié au pentobarbital sodique (45 mg/kg i.p., Nembutal®; Sanofi Santé Nutrition Animale, Libourne), puis, après laparotomie, le rein droit est dégagé et le carrefour de l'aorte avec l'artère rénale droite et l'artère mésentérique supérieure est minutieusement disséqué sous stéréomicroscope (Nikon). Le rat reçoit 0,2 ml d'héparine (i.v.) avant la mise en place d'un cathéter dans l'artère mésentérique pour la perfusion du rein, et dans l'aorte infrarénale pour la mesure de la pression de perfusion rénale. L'uretère est coupé. La perfusion du rein débute aussitôt après la ligature de l'aorte suprarénale, sans période d'ischémie. Le rat est rapidement saigné et la chaîne sympathique latéro-vertébrale est sectionnée afin d'éviter la phase vasoconstrictrice initiale. Le rein est alors dégagé de toutes ses connexions avec l'animal et placé sur une coupelle thermostatée à 37°C (figure II-1A). La pression de perfusion rénale est mesurée à l'aide d'un capteur de pression (Statham P23Db) relié à un électro-manomètre. Elle est ajustée à 80 mm Hg, puis maintenue constante durant toute l'expérimentation. Le débit de perfusion rénal est mesuré en recueillant l'effluent veineux. Le rein controlatéral, non perfusé, est pesé.

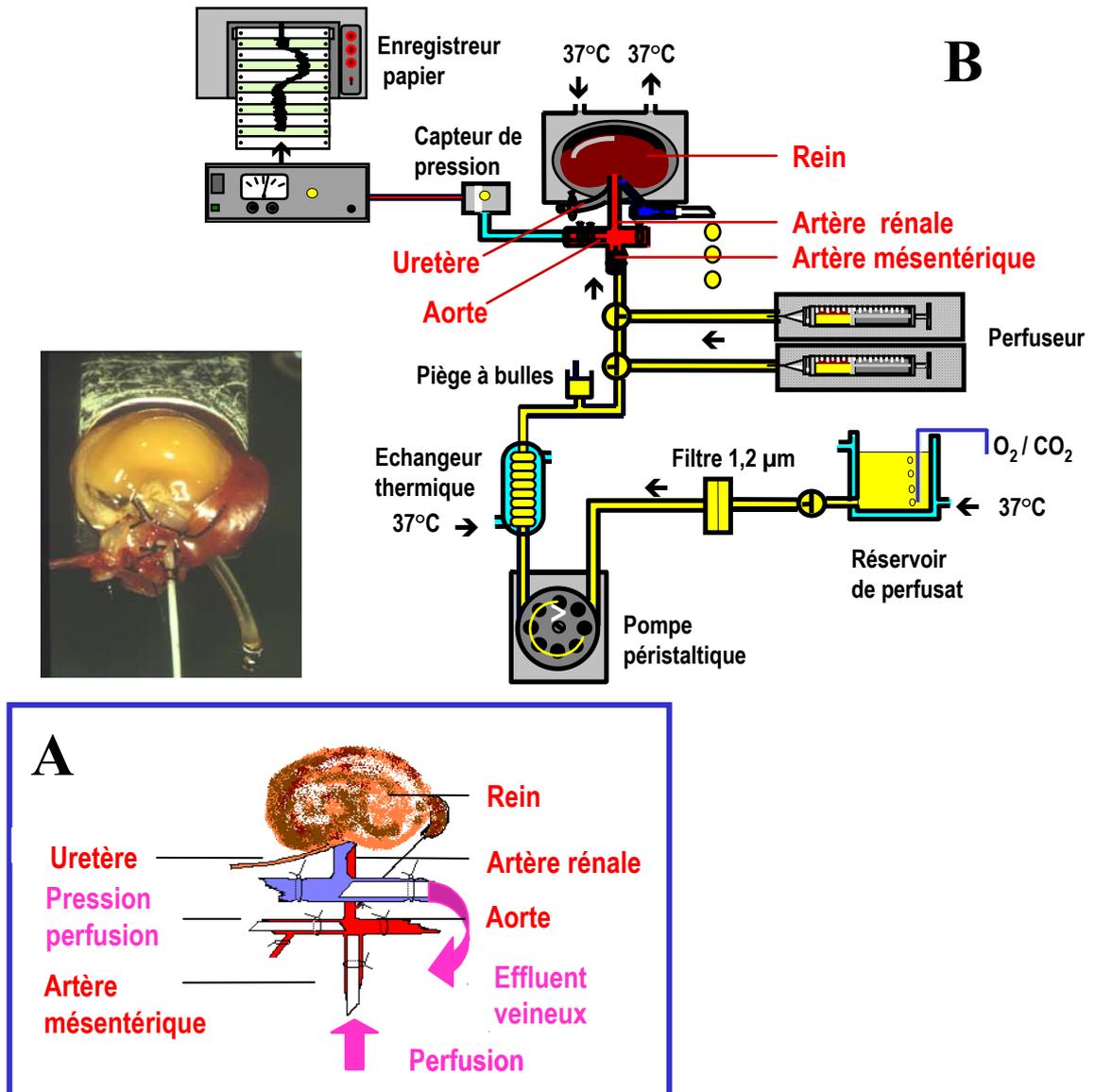


Figure II-1 : Montage expérimental du rein isolé perfusé

Le rein droit est dégagé et le carrefour aorto-réno-mésentérique est disséqué sous stéréomicroscope. A) Un cathéter est mis en place dans l'artère mésentérique pour la perfusion du rein et dans l'aorte infra-rénale pour la mesure de pression de perfusion rénale. L'uretère est cathétérisé pour permettre le libre écoulement de l'urine. La perfusion débute sans période d'ischémie, aussitôt après la ligature de l'aorte supra-rénale. B) Le rein est alors dégagé, placé sur une coupelle thermostatée à 37°C et perfusé en circuit ouvert.

- **Le circuit de perfusion**

Le rein est perfusé en circuit ouvert et à débit constant, à l'aide d'une pompe péristaltique (figure II-1B). Le milieu de perfusion est une solution de Krebs Henselheit comportant (mM): Na⁺ 145, K⁺ 5, Cl⁻ 102, Ca⁺⁺ 2.5, Mg⁺⁺ 1.5, HCO₃⁻ 25, PO₄⁻ 1.22, glucose 10, lactate 30. Ce milieu, aéré avec du carbogène

(5% de CO₂, 95% d'O₂), a un pH de 7,4. Il est thermostaté à 37°C tout au long de l'expérience. Un piège à bulle est placé sur le montage afin d'éviter toute bulle d'air dans le milieu arrivant au rein.

□ **Protocoles expérimentaux**

Au cours de la période d'équilibration de 30 minutes (phase de relaxation), le débit de perfusion est ajusté de sorte que le rein soit perfusé à une pression de 80 mm Hg. Ce débit est ensuite maintenu constant pendant toute la durée de l'expérience. Il est mesuré par le débit de l'effluent veineux rénal et permet le calcul de la résistance vasculaire rénale. Pour évaluer l'effet de substances vasodilatatrices sur ce rein séparé de ses afférences neurovégétatives, il est nécessaire de rétablir un tonus vasoconstricteur. Ceci est réalisé par des injections répétées de phényléphrine (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier) toutes les 2 minutes, de façon à obtenir des pics de constriction d'environ 50 mm Hg. Sur ce tonus induit, diverses substances vasodilatatrices ont été testées en les perfusant pendant 8 minutes dans le perfusé à proximité du rein: la PTHrP(1-36) (Néosystem, Strasbourg) de 1 à 30 nM, l'isoprotérénol (Sigma) à 100 nM et la forskoline (Sigma) à 1 µM. Les réponses vasodilatatrices ont été exprimées en pourcentage d'inhibition du tonus induit par la phényléphrine.

□ **Le mésentère isolé perfusé**

• **Isolement et montage du mésentère**

La technique du mésentère isolé perfusé que nous avons utilisée est décrite par ⁵⁰⁷. Après anesthésie du rat au pentobarbital sodique (45 mg/kg i.p.) et laparotomie, les intestins sont délicatement réclinés et enveloppés dans une compresse humide. L'artère mésentérique supérieure est disséquée, les artéριοles courtes irriguant le duodénum, ainsi que celles irriguant le colon sont ligaturées afin de ne conserver que les artéριοles de résistance irriguant l'intestin grêle. Après une injection d'héparine (0,2 ml i.v.), l'artère mésentérique est cathétérisée rapidement pour limiter la période d'ischémie. Après la mise sous perfusion du mésentère à un débit de 2 ml/min ⁵⁰⁸ à l'aide d'une pompe péristaltique, l'ensemble mésentère/intestin est dégagé de ses connections avec l'animal et placé sur une coupelle thermostatée à 37°C. Le débit de perfusion est alors augmenté progressivement et le lit vasculaire mésentérique est isolé entièrement en coupant les extrémités distales des artéριοles le plus près possible de l'intestin.

• **Circuit de perfusion**

Dans un souci de comparaison des résultats avec ceux du rein isolé perfusé, nous nous sommes placés dans les mêmes conditions expérimentales (perfusion en circuit ouvert) et avec le même milieu de perfusion (Krebs Henselheit) que précédemment.

• **Protocoles expérimentaux**

Le débit est ajusté afin de perfuser le mésentère à une pression de 80 mm Hg, une pression physiologique choisie précédemment pour la perfusion du rein isolé. Après une période d'équilibration de

30 minutes, le débit mésentérique est évalué (en fonction de la position de la pompe péristaltique préalablement calibrée) et la résistance vasculaire mésentérique est calculée. Pour évaluer l'effet de substances vasodilatatrices, un tonus vasoconstricteur est rétabli comme précédemment sur le rein isolé par des injections répétées de phényléphrine toutes les deux minutes, de façon à obtenir des pics de constriction d'environ 50 mmHg. Sur ce tonus induit, diverses substances vasodilatatrices ont été testées en les perfusant pendant 8 minutes dans le perfusât à proximité du cathéter de perfusion du mésentère : la PTHrP(1-36) (1 à 30 nM), l'isoprotérénol (100 nM) et la forskoline (1 µM). Les réponses vasodilatatrices ont été exprimées en pourcentage d'inhibition du tonus induit par la phényléphrine.

Approches expérimentales *in vivo*

□ Hémodynamique rénale et mésentérique *in vivo* : mesure des débits par débitmétrie électromagnétique

Dans ces approches expérimentales, les effets hémodynamiques rénaux et mésentériques ont été évalués après une administration locale des substances à tester (PTHrP et autres), en dehors d'effets systémiques sur la pression artérielle.

• Chirurgie et mise en place du capteur de débitmétrie

Après anesthésie au thiobutabarbital (90 mg/kg i.p.; Inactine®; Sigma-RBI), le rat est trachéotomisé. La carotide gauche est cathétérisée afin d'enregistrer en continu la pression artérielle et la fréquence cardiaque (Statham P23 XL ; Spectramed Statham, Bilthoven, Hollande). La veine jugulaire gauche est cathétérisée pour les injections ou perfusions intra-veineuses. L'artère rénale gauche ou l'artère mésentérique supérieure sont disséquées par voie rétro-péritonéale pour la mise en place d'un capteur de débitmétrie électromagnétique (MDL 1404 ; diamètre interne de 0,6 mm ; Skalar, Delft, Hollande) (figures II-2A et 2C). Les perfusions intra-artérielles (i.a.) rénales ou mésentériques sont réalisées de manière pulsées, selon une procédure décrite précédemment^{332,509} (figure II-2B).

Elle permet un mélange homogène du produit à tester avec le sang artériel rénal, alors qu'une perfusion continue conduit à un flux laminaire qui ne touche qu'une partie du rein. Un fin cathéter en téflon est introduit dans l'aorte abdominale *via* l'artère fémorale droite, et guidé dans l'artère rénale gauche, ou dans l'artère mésentérique le cas échéant. Ce fin cathéter en téflon est relié à un dispositif de cathéters multiples pour la perfusion des substances à tester (figure II-2B). Ce système aspire 4 µl de sang en 1000 ms et le réinjecte dans la circulation rénale en 100 ms avec le produit à tester. La position du cathéter en téflon est vérifiée en début et fin d'expérience par la perfusion de vert de lissamine. Les rats reçoivent par voie i.v., à la fin de la chirurgie, 2 ml de NaCl 0,9% contenant 6 % d'albumine sérique bovine (Sigma) pour compenser les pertes liquidiennes.

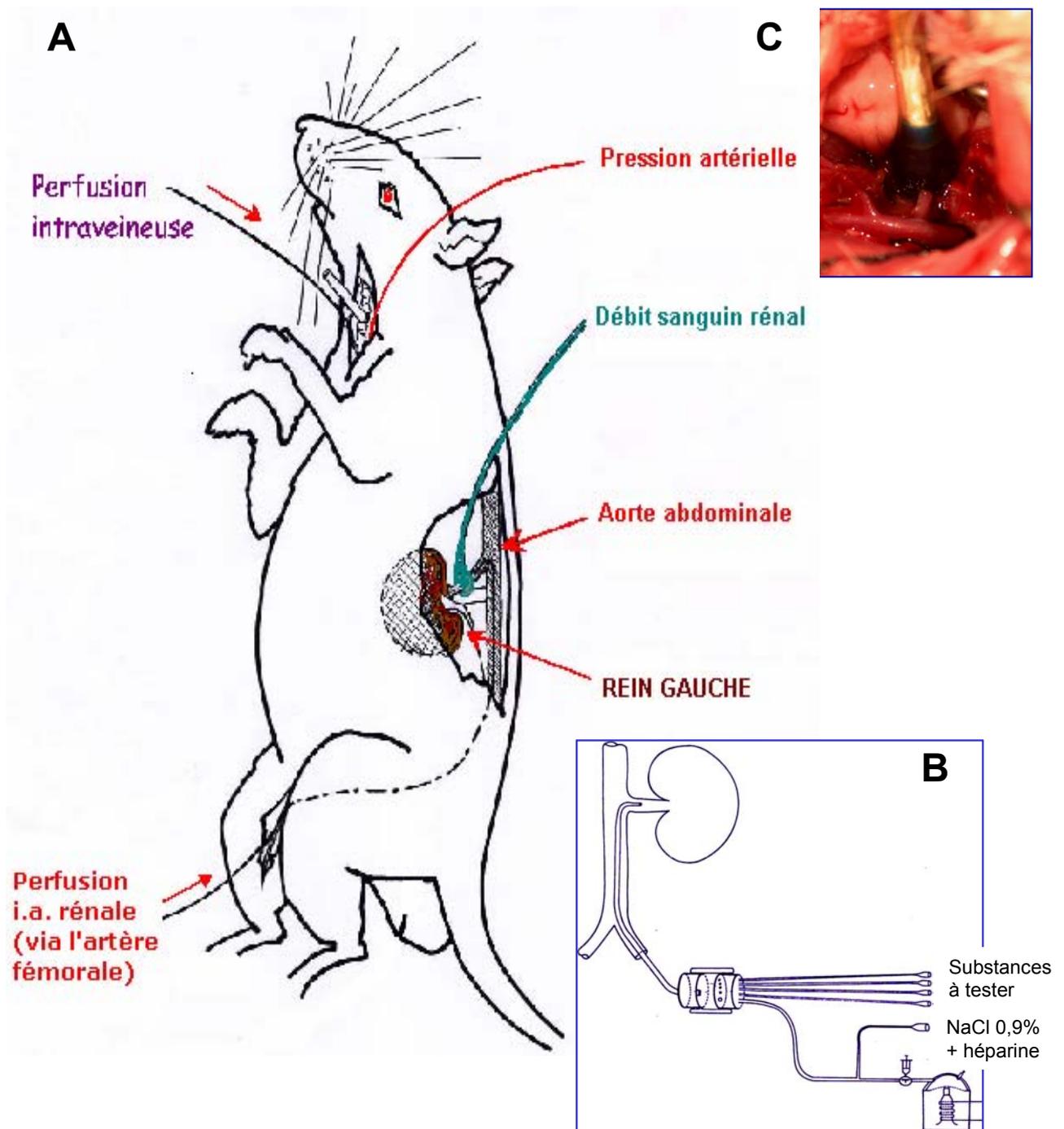


Figure II-2: Montage de l'expérimentation *in vivo*

A) Schéma expérimental de la préparation chirurgicale pour l'évaluation des effets vasculaires rénaux de la PTHrP(1-36) *in vivo*, chez le rat anesthésié. B) Représentation schématique du dispositif de cathéters multiples utilisé pour la perfusion intra-artérielle pulsée selon Parekh et coll. en 1995. Une voie permet de maintenir le système perméable par la perfusion continue de sérum physiologique hépariné, les quatre autres cathéters permettent l'administration des produits à tester. C) Photo montrant un capteur de débitmétrie en place sur l'artère mésentérique.

- **Protocoles expérimentaux**

Après une heure d'équilibration, les substances à tester sont perfusées pendant 8 min par voie i.a. rénale ou mésentérique, afin de réaliser les concentrations suivantes dans le plasma : la PTHrP(1-36) de 1 à 30 nM, l'isoprotérénol de 1 à 100 nM et la forskoline de 0,1 à 1 µM. L'hématocrite est mesuré chez chaque animal sur microcapillaire (Sigma 113 ; Bioblock, Illkirch). La pression artérielle (instantanée ou moyenne), la fréquence cardiaque et le débit sanguin (rénal ou mésentérique) sont enregistrés en continu (enregistreur WindoGraf 980, Gould Inst. System, Ballainvilliers) et permettent le calcul de la résistance vasculaire rénale (RVR) ou mésentérique (RVM). Les réponses sont exprimées en pourcentage de variation de la résistance vasculaire par rapport à leur valeur basale. Ces variations sont le reflet des variations du débit sanguin rénal ou mésentérique, en l'absence de variation de la pression artérielle systémique.

- Traitement des SHR par le losartan**

Un groupe de SHR (âgés de 9 semaines) a été traité par un antagoniste des récepteurs AT1, le losartan, à raison de 15 mg/kg/j⁵¹⁰. Le losartan est administré pendant 3 semaines dans l'eau de boisson. La consommation en eau des animaux a été contrôlée 2 fois par semaine afin d'y ajuster éventuellement les concentrations en losartan pour maintenir le traitement constant. Ces animaux ont été comparés à deux groupes contrôles, constitués de SHR et de rats Wistar non traités. Le suivi des rats pendant les 3 semaines de l'étude comportait des mesures, 2 fois par semaine, de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque. Au terme de cette période, les réactivités vasculaires rénales ont été étudiées (rein isolé perfusé) et différents organes ont été prélevés pour l'évaluation des expressions du R-PTH1 et de la PTHrP.

- Induction d'une hypertension artérielle DOCA-sel**

Une hypertension DOCA-sel a été induite chez des rats Wistar mâles selon la technique décrite par Rahmouni et coll.⁵¹¹. Des rats de 8 semaines ont été anesthésiés au pentobarbital sodique (50 mg/kg i.p.), puis trois comprimés d'acétate de désoxycorticostérone (DOCA, 3 x 25 mg) ont été implantés en sous-cutané. Les rats avaient dès lors accès à une solution de NaCl 0,9% comme boisson. Des rats contrôles ont été soumis au même stress chirurgical, mais sans implantation de comprimés de DOCA, et sans modification de leur eau de boisson. Le suivi des rats pendant les 5 semaines de l'étude comprenait des mesures hebdomadaires de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque. Au terme de cette période, à un âge de 13 semaines, les réactivités vasculaires rénales ont été étudiées (rein isolé perfusé) et différents organes ont été prélevés pour l'évaluation des expressions du R-PTH1 et de la PTHrP. L'activité rénine plasmatique (ARP) a été déterminée comme décrit précédemment⁸ sur 1 ml de sang recueilli sur EDTA à 4°C, rapidement centrifugé à 2000 g pendant 10 minutes à 4°C, puis congelé à -80°C. L'ARP est mesurée par la génération d'AngI au cours d'une incubation du plasma pendant 30 minutes à 37°C, en présence de 5 mM de 8-hydroxyquinoléine. L'Ang I est quantifiée par radioimmuno-

essai, en utilisant un anticorps généré chez le lapin et reconnaissant spécifiquement l'Ang I. L'ARP est exprimée en ng d'AngI/ml/h d'incubation.

□ Mesure de la pression artérielle par méthode sphygmomanométrique

Les mesures de pression artérielle systolique et de fréquence cardiaque ont été réalisées chez des rats conscients par une méthode sphygmomanométrique avec un appareillage Letica® (LE 5002, Panlab ; Bioseb, Chaville, France) couplé à une acquisition de données par le logiciel Powerlab® (Bioseb). Les animaux sont placés dans un environnement chaud (30-32°C) pendant 15-20 minutes avant le début des mesures afin de favoriser la dilatation de l'artère caudale. Ils sont ensuite placés dans une cage de contention chauffée, avant de fixer un manchon gonflable et un capteur de pression sur leur queue. Les mesures de la pression artérielle systolique sont réalisées en phase de dégonflage du manchon. Les animaux sont habitués à ces manipulations dès la veille du premier jour de mesure. Pour chaque valeur de pression artérielle et de fréquence cardiaque, la moyenne d'au moins 5 mesures successives ne déviant pas l'une de l'autre de plus de 10% a été retenue.

Cultures cellulaires

□ Mise en culture de cellules musculaires lisses réno-vasculaires (CMLRv)

Les CMLRV de rat utilisées dans ces expériences sont celles disponibles au laboratoire. Elles ont été obtenues selon une technique décrite en 2000⁵¹², à partir d'artérioles intra-rénales de rats Wistar ou SHR (âgés de 12 semaines), par traitement collagénasique (collagénase de type A 0,6 mg/ml, avec un inhibiteur de trypsine à 1 mg/ml dans du NaCl 0,9 %) pendant 20 minutes à 37°C. Ces vaisseaux sont ensuite rincés avec un tampon phosphate stérile et placés dans des flacons de culture de 25 cm², avec 1 ml de DMEM (« Dulbecco's modified Eagle Medium ») complété de 30% de sérum fœtal de bœuf (FBS), 100 U/ml de pénicilline et 0,1 mg/ml de streptomycine. Le fond des boîtes de culture est auparavant recouvert de collagène de type I afin de permettre aux explants de mieux se fixer. Les explants sont retirés dès qu'un nombre suffisant de cellules ont migré hors de l'explant, soit 10 à 14 jours après la mise en culture. A partir de cette culture primaire, les cellules sont multipliées par traitement à la trypsine après 2 à 3 semaines. La culture des CMLRV est alors poursuivies en présence de DMEM complété de FBS (10%), de pénicilline (100 U/ml) et de streptomycine (0,1 mg/ml), à 37°C, dans une atmosphère humidifiée contenant 10% de CO₂ dans l'air. Elles ont été utilisées entre le 9^{ème} et le 16^{ème} passage, à 80% de confluence.

Des CMLRv de souris ont été obtenues à partir d'animaux généreusement fournis par le Dr Karaplis (Lady Davis Institute for Medical Research, Montréal, Québec)³²⁵. Le protocole de mise en culture des cellules de souris a été le même que celui décrit pour le rat. Cependant, l'isolement de l'arbre vasculaire à partir du rein de souris est obtenu en utilisant uniquement le tamis de porosité 100 µM.

❑ **Mise en culture de cellules musculaires lisses aortiques (CMLAo)**

Les CMLAo ont été obtenues à partir d'aortes de rats Wistar par une technique d'explants comparable à celle utilisée pour les CMLRV. Dans des conditions stériles, l'aorte est prélevée, débarrassée des tissus adjacents, et coupée longitudinalement. L'intima et l'adventice sont grattées à l'aide d'un scalpel, puis l'aorte est coupée en petits fragments. Ces explants subissent le traitement collagénasique et sont ensuite mis en culture de la même façon que les explants issus des arbres vasculaires intra-rénaux. Les CMLAo sont par ailleurs cultivées dans les mêmes conditions que les CMLRV, en présence de DMEM, complété de FBS (10%), de pénicilline (100 U/ml) et de streptomycine (0,1 mg/ml), à 37°C, dans une atmosphère humidifiée contenant 10% de CO₂ dans l'air. Elles ont été utilisées entre le 9^{ème} et le 16^{ème} passage, à 80% de confluence.

❑ **Protocole de stretch mécanique des cellules**

Pour l'ensemble des expériences de stretch mécanique des CMLRV et des CMLAo, nous avons sélectionné une lignée de CMLRV et une lignée de CMLAo dont la croissance reflète la moyenne de l'ensemble des lignées rénovasculaires ou aortiques. Dans ces expériences, les CMLRV et CMLAo sont ensemencées dans des boîtes de cultures à 6 puits à fond flexible (Flexcell, Dunn Laboratories, Asbach, Allemagne) à raison de 4000 cellules/cm² dans du milieu DMEM contenant 10% de sérum. Après 2 jours de culture, les cellules sont rendues quiescentes par culture pendant 2 jours dans du milieu DMEM sans FBS contenant 0,1% de BSA. Les cellules sont ensuite cultivées dans du DMEM contenant soit du FBS à 10% (milieu avec sérum) soit la BSA à 0,1% (milieu sans sérum) et soumises ou non à un stretch mécanique. L'amplitude de déformation du fond des puits (stretch mécanique) était de 10% à une fréquence de 1 Hz, ce qui correspond à une déformation dite "physiologique". Ces expériences sont réalisées à l'aide d'un appareillage conçu au laboratoire par Alain Lambert, appliquant successivement une pression négative et positive sur le fond des boîtes de culture.

❑ **Effets de l'Ang II et/ou du losartan sur l'expression du R-PTH1**

Les effets de l'Ang II (100 nM), du losartan (1 µM) ou de l'Ang II en présence de Losartan ont été testés sur des CMLRV et les CMLAo de rats Wistar, ainsi que sur des CMLRV de SHR. Les cellules sont préalablement cultivées pendant 48h en absence de sérum, le sérum étant remplacé par 0,1 % d'albumine sérique bovine (BSA). Pour des temps de contact excédant 24 h, l'Ang II a été rajoutée quotidiennement aux cellules en culture, compte tenu de la dégradation rapide du peptide dans le milieu de culture.

L'expression du R-PTH1 a été évaluée sur ces cellules en terme d'ARNm et de protéine. L'ARN total des cellules a été extrait avec le TRIzol selon le protocole du fournisseur (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Pour cela, le milieu de culture des cellules a été remplacé par 1,5 ml de TRIzol pour une boîte de 25 cm². Après un contact de 10 minutes, l'homogénat est récupéré par grattage à l'aide d'une raclette en pastique. La suite de l'extraction a été réalisée comme décrite ci-après pour l'ARN provenant de différents tissus.

Pour les études des protéines par Western blot, les cellules ont été rincées deux fois avec le tampon phosphate (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄, 1.4 mM KH₂PO₄) avant l'addition de 0,3 ml de tampon de lyse (50 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, 0,02 % azide de sodium, 100 µg/ml PMSF, 1 µg/ml aprotinine, 1% NP-40) par boîte de 25 cm². Après incubation à 4°C pendant 20 minutes, les cellules ont été grattées manuellement. L'homogénat a été centrifugé à 12000g pendant 5 minutes, le surnageant récupéré pour le dosage des protéines et les études par Western blot décrites ci-dessous.

❑ **Stabilité de l'ARNm du R-PTH1**

La stabilité de l'ARNm du R-PTH1 a été étudiée sur des CMLRv de rats Wistar et de SHR, cultivées en l'absence de sérum (0,1 % BSA), et exposées à l'actinomycine D (5 µg/ml) pour bloquer la transcription. Les taux d'ARNm du R-PTH1 ont alors été évalués sur des cellules exposées à l'actinomycine D pendant des temps variables (0, 2, 4 et 8 h), en présence ou non d'Ang II (100 nM), de losartan (1 µM) ou des deux traitements.

❑ **Transfection des cellules par les constructions P1-luciférase et P2-luciférase**

Afin de vérifier si l'Ang II modifie l'activité des promoteurs P1 et P2 qui contrôlent l'expression du R-PTH1, les CMLRv ont été transfectées avec des constructions comportant ces promoteurs en amont du gène de la luciférase.

- **Présentation du plasmide**

Le vecteur plasmidique utilisé est le pXP2 qui nous a été fourni par le Dr John H. White (McGill University, Montréal). Ce plasmide de 5900 pb contient soit le promoteur P1, soit le promoteur P2 du R-PTH1 de rat, ainsi qu'un gène de résistance à l'ampicilline. Ces promoteurs précèdent le gène rapporteur de la luciférase (déléte de son propre promoteur), de telle sorte que la construction P1-luciférase constitue un fragment de 1,6 kb et P2-luciférase un fragment de 1,1 kb. Les plasmides contenant ou non les séquences promotrices du R-PTH1 ont été amplifiées par transformation bactérienne.

- **Transformation bactérienne**

Un aliquot de 100 µl de bactéries 5 HT α E. Coli (100 pg/µl) est incubé dans la glace pendant 20-30 minutes en présence d'1 µl d'ADN plasmidique. Pour optimiser la transfection, les bactéries subissent un choc thermique (45 s à 37°C) avant d'être repiquées dans la glace pendant 2 minutes. Après avoir ajouté 200 µl de milieu LB liquide (LB Broth 20 g/L, contenant 10 g/L de Tryptone, 5 g/L de levure et 10 g/L de NaCl, autoclavé à 121°C pendant 15 minutes), les bactéries sont incubées à 37°C pendant 1 heure. Durant cette étape, les bactéries acquièrent leur résistance aux antibiotiques. Ensuite, 200 µl de cette solution bactérienne sont étalés sur une boîte de Pétrie stérile contenant un milieu LB solide (LB Agar 32 g/L, additionné de 50 µg/ml d'ampicilline). La boîte de Pétrie est incubée pendant une nuit à 37°C. Une seule colonie de bactéries ayant poussée sur ce milieu est piquée à l'aide d'un cure-dent et ensemencée dans 4 ml de milieu LB liquide en présence de 50 µg/ml d'ampicilline. Ce milieu est placé une nuit sous agitation à 37°C. A ce stade, la taille et la pureté de l'ADN plasmidique a été vérifiée par gel

d'électrophorèse. Le lendemain, 500 µl de bactéries transformées par les plasmides sont ensemencés dans 250 ml de milieu LB liquide, et remis sous agitation une nuit à 37°C.

- **Extraction plasmidique**

Les plasmides amplifiés ont été purifiés à l'aide du kit « Qiagen Plasmid Maxi ». Le milieu de culture contenant les bactéries transfectées est centrifugé à 10000 g pendant 5 minutes. Le surnageant est jeté et le culot est remis en suspension dans 10 ml de tampon 1 (50 mM Tris HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml Rnase A). L'ajout de 10 ml du tampon 2 (200 mM NaOH, 1% SDS) permet de lyser les bactéries, à température ambiante en 5 minutes. La solution est neutralisée par 10 ml de tampon 3 (3 M acétate de potassium, pH 5,5) à 4°C pendant 20 minutes. Après centrifugation à 20000 g pendant 30 minutes à 4°C, le surnageant contenant l'ADN plasmidique est déposé sur une colonne échangeuse d'anions préalablement équilibrée par 10 ml de tampon d'équilibration (750 mM NaCl, 50 mM MOPS, pH 7.0, 15 % isopropanol, 0.15 % TritonX-100). La colonne est lavée 2 fois avec 30 ml de tampon de lavage (1 M NaCl, 50 mM MOPS, pH 7.0, 15 % isopropanol), avant d'être éluée avec 15 ml de tampon d'éluion (1,25 M NaCl, 50 mM Tris HCl, pH 8.5, 15 % d'isopropanol). L'éluat est précipité par 10,5 ml d'isopropanol puis centrifugé à 15000 g pendant 30 minutes à 4°C. Le culot d'ADN plasmidique est lavé avec 5 ml d'éthanol à 70 %, avant d'être recentrifugé à 15000 g pendant 10 minutes. Le surnageant est jeté et le culot est dissout dans une faible quantité d'eau filtrée. La concentration d'ADN purifiée est mesurée par spectrophotométrie.

- **Transfection des cellules**

Les CMLRv sont cultivées pendant 48 h en présence de DMEM sans sérum (0,1 % BSA) mais contenant de la pénicilline (100 U/ml) et de la streptomycine (0,1 mg/ml). Puis ces cellules sont rincées 3 à 4 fois avec du milieu DMEM sans BSA et sans antibiotiques. Le milieu de transfection est préparé en incubant 150 µl d'ADN plasmidique (5 µg) avec 150 µl de lipofectamine (Life technologies, GibcoBRL, France ; solution à 2 mg/ml). Ce mélange est laissé 30 minutes à température ambiante de façon à former des lipocomplexes, la couche de lipides entourant les plasmides facilitant alors leur pénétration dans les cellules. Une fraction de 15 µl de ce mélange plasmide-lipofectamine est ajoutée à chaque puit de 10 cm² contenant 3 ml de DMEM. Les boîtes sont incubées pendant 3 à 4 h à 37°C, puis le milieu de transfection est remplacé par du DMEM contenant 0,1% de BSA, 100 U/ml de pénicilline et 0,1 mg/ml de streptomycine. Le lendemain, les effets de l'Ang II (100 nM pendant 24 h) sont testés sur l'activité transcriptionnelle de P1 et de P2, et sont comparés aux activités de CMLRv transfectées avec des plasmides vides.

☐ **Mesure de l'activité transcriptionnelle des promoteurs P1 et P2**

La mesure de l'activité de la luciférase est réalisée à partir du kit « Luciférase Assay System E1500 » (Promega, Madison, USA). Les puits sont rincés avec le tampon phosphate, avant d'ajouter 400 µl de tampon de lyse (25 mM Tris-phosphate pH 7.8, 2 mM DTT, 2 mM 1,2-diaminocyclohexane-N,N,N',N'-acide tétraacétique, 10 % glycérol, 1% Triton X-100). Les cellules sont grattées et transférées dans des tubes Eppendorf. Après centrifugation à 12000 g pendant 2 minutes à

4°C, le surnageant est récupéré. L'activité de la luciférase est mesurée en mélangeant 20 µl de surnageant (contenant la luciférase) et 100 µl de substrat de cette enzyme. La luciférase « Firefly » transforme la « beetle » luciférine en oxyluciférine qui émet de la lumière mesurée avec un luminomètre. L'intensité de lumière mesurée sera proportionnelle à la concentration de luciférase dans une gamme de concentrations entre 10^{-20} et 10^{-13} moles.

❑ Transfection des cellules de souris par la Cre-recombinase

Le protocole utilisé est le même que celui détaillé pour les CMLRv de rats, mais en utilisant des plasmides pSG5 et pBK-CMV codant pour la Cre Recombinase et obtenus par l'intermédiaire du Dr. METZGER (IGBMC, Illkirch). Ces plasmides ont été cotransfectés avec le plasmide nu pcDNA3 contenant un gène de résistance pour la gentamicine. La vérification de l'efficacité de la transfection a été réalisée en PCR par amplification de l'ARNm de la PTHrP de rat. Les cellules excisées pour la PTHrP montraient une forme de PTHrP tronquée de poids moléculaire plus faible (266 pb) correspondant à la perte de l'exon 4, comparativement à la PTHrP portant l'exon 4 floxé (677 pb). Ces cellules ont été développées au laboratoire par Eric Schordan, selon le protocole décrit dans sa thèse.

Les cellules excisées pour la PTHrP sauvage ont ensuite été retransfectées avec des constructions particulières de PTHrP, disponibles au laboratoire⁹⁵. D'une part, le plasmide pcDNA3-ΔSP a été utilisé ; il code pour une PTHrP délétée pour la séquence signal. D'autre part, le plasmide pcDNA3-ΔNLS a été utilisé ; il code pour une PTHrP dépourvue de séquence de localisation nucléaire. Les cellules ont été transfectées selon le protocole énoncé plus haut. Ces expériences furent la première application de ce modèle de cellules délétées pour la PTHrP.

Techniques biochimiques et biomoléculaires

❑ Isolement des vaisseaux et autres organes

Les prélèvements d'organes pour l'analyse moléculaire du R-PTH1 ont été effectués de façon quasi-identique pour l'analyse RT-PCR et Western blot. Cependant, pour les analyses par Western blot, les organes sont rincés de leur contenu en sang. Pour cela, après anesthésié au pentobarbital sodique et laparotomie, les reins sont perfusés avec une solution de NaCl 0,9% à 4°C, *via* un cathéter mis en place dans l'aorte abdominale, en posant au préalable un clamp sur l'aorte supra-rénale. Une incision est réalisée au niveau de la veine cave afin que le sang puisse s'écouler librement. Une fois les reins blanchis, le clamp supra-rénal est levé et les autres organes (aorte, mésentère et cœur) sont perfusés à leur tour par un volume total de 60 ml de NaCl 0,9%. Les différents organes sont prélevés immédiatement et gardés dans du NaCl froid le temps nécessaire aux dissections.

Les reins sont décapsulés et coupés en deux longitudinalement. Sur l'un des reins, un prélèvement de cortex (100 mg) et de médulla est réalisé. Sur le second rein, les arbres vasculaires intra-rénaux sont préparés selon une méthode élaborée au laboratoire⁵¹². Après avoir retiré la médulla rénale, les reins sont écrasés et pressés avec un piston en verre contre un tamis en acier inoxydable de porosité 300 µm. L'arbre artériel intra-rénal, composé essentiellement des artères interlobaires, des artères

arquées et artérioles interlobulaires, est retenu à la surface de la grille tandis que les artérioles afférentes et les glomérules, plus fins et plus fragiles, passent à travers le tamis. Les arbres vasculaires ainsi préparés sont récupérés et rincés sur un tamis de nylon de porosité 100 µm avec une solution de NaCl 0,9 %, de façon à éliminer les tubules et les glomérules encore adhérents.

L'aorte thoracique est prélevée sur une partie aussi longue que possible. Elle est dégagée de la graisse périvasculaire, puis découpée en petits anneaux pour faciliter le broyage ultérieur.

Le mésentère est prélevé et étalé sur une plaque en céramique préalablement refroidie. Le lit vasculaire artériolaire (artérioles mésentériques de second et de troisième ordre) est disséqué et prélevé.

Le cœur est prélevé et disséqué. Les deux oreillettes sont prélevées ainsi qu'une fraction médiane du ventricule gauche.

□ **Evaluation de l'expression de l'ARNm par RT-PCR**

• **Extraction de l'ARN**

L'ARN total est extrait avec le TRIzol selon le protocole du fournisseur (Invitrogen)³⁵⁰. Le TRIzol est une solution mono-phasique de phénol et d'isothiocyanate de guanidine qui maintient l'intégrité de l'ARN tout en détruisant les cellules et en dissolvant les autres composés cellulaires. Les échantillons tissulaires (cortex rénal, médulla rénale, artérioles intra-rénales, aorte, artérioles mésentériques, oreillettes et ventricules ; 50 à 100 mg chacun) sont placés immédiatement lors du prélèvement dans 1 ml de TRIzol, à température ambiante, puis broyés mécaniquement (broyeur de Kontes, Sigma) dans les 20 minutes sous une hotte aspirante. Afin d'assurer une dissociation des complexes nucléoprotéiques, les échantillons sont ensuite laissés à reposer pendant 5 minutes à température ambiante. L'adjonction de chloroforme (0,2 ml par échantillon) est suivie d'une agitation vigoureuse pendant 15 secondes puis d'un contact prolongé à température ambiante (2 à 15 minutes). Les échantillons sont centrifugés à 12000 g pendant 15 minutes à 4°C ce qui sépare le contenu des tubes en trois phases distinctes : une phase inférieure organique contenant les protéines, une interphase renfermant l'ADN et une phase supérieure aqueuse transparente contenant exclusivement l'ARN.

L'ARN est précipité dans la phase aqueuse supérieure par addition de 0,5 ml d'isopropanol par ml de TRIzol. Les tubes sont ensuite agités, laissés à température ambiante pendant dix minutes puis centrifugés à 12000 g pendant 10 minutes à 4°C. Le culot d'ARN est lavé par une solution d'éthanol à 75 % et centrifugé pendant 5 minutes à 7500 g à 4°C. Le culot est récupéré et séché à l'air puis remis en suspension dans un volume d'eau à 0,1% de diéthyl-pyrocarbonate, un inhibiteur de nucléase. La pureté des échantillons d'ARN est calculée par le rapport des densités optiques à 260 et 280 nm. Un rapport égal ou supérieur à 1,7 indique l'absence de contamination de la préparation d'ARN par l'ADN.

• **Synthèse de l'ADNc par transcription réverse (RT)**

La transcription réverse (RT) est réalisée dans un volume de 40 µl, en présence d'ARN (2 µg pour l'aorte, 5 µg pour les autres échantillons), 400 U de transcriptase réverse (virus reverse transcriptase de la leucémie du rat, Fermentas, Allemagne), 10 U d'inhibiteur de ribonucléase, 1 mM de désoxynucléotides triphosphates et 1 µM d'amorces p(dT)₁₅. Après l'addition d'ARN, du p(dT)₁₅ et de

l'eau, le mélange réactionnel est incubé à 65°C pendant 5 minutes pour dénaturer l'ARNm. L'ADNc est synthétisé à 37°C pendant 1 heure. La transcription réverse est stoppée en chauffant les échantillons à 99°C pendant 5 minutes.

- **Amplification de l'ADNc par réaction de polymérisation en chaine (PCR) semi-quantitative**

La réaction de polymérisation en chaine (PCR) est réalisée dans un volume de 50 µl en présence de 0,15 µM d'amorces spécifiques (tableau II-1) sens et antisens pour le R-PTH1, la PTHrP ou la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) de rat (ou de souris le cas échéant), 2 mM de désoxynucléotides triphosphates, 2 U de Red Taq ADN polymérase (Sigma) et de l'ADNc (0,5 µg pour l'aorte et 1 µg pour les autres échantillons). Après une première dénaturation à 94°C pendant 4 min, la PCR est réalisée en 24 ou 30 cycles (PTHrP : 36 cycles) de dénaturation (1 min à 94°C), d'amorçage (1 min à 52°C) et de polymérisation (1 min à 72°C). Le dernier cycle est suivi d'une incubation supplémentaire à 72°C pendant 8 min.

	amorces	Sequences	Taille attendue (pb)
rR-PTH1 mR-PTH1	sens antisens	5' GGG CAC AAG AAG TGG ATC AT 3' 5' GGC CAT GAA GAC GGT GTA GT 3'	209
rPTHrP mPTHrP	sens antisens sens antisens	5' ACA CCA AAA ACC ACC CTG TGC GGT 3' 5' GAA TCC TGT AAC GTG TCT TGG 3' 5' CAG CGA GCG GCA CGA TGC TGC GGA 3' 5' GTG CAG TTT CCT GGG GAG ACA GTT 3'	320 677
rGAPDH mGAPDH	sens antisens	5' CAT GGA GAA GGC TGG GGC TC 3' 5' AAC GGA TAC ATT GGG GGT AG 3'	415
rRénine	sens antisens	5' TTC TCT CCC AGA GGG TGC TA 3' 5' CCC TCC TCA CAC AAC AAG GT 3'	211
rR-AT1	sens antisens	5' ACC AGG TCA AGT GGA TTT CG 3' 5' ATC ACC ACC AAG CTG TTT CC 3'	209

Tableau II-1 : Tableau résumant l'ensemble des amorces utilisées pour la PCR. L'homologie du génome entre le rat et la souris a permis l'utilisation des mêmes amorces pour les deux types d'animaux.

- **Analyse des produits d'amplification**

Les produits de la PCR sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 2% contenant 0,5 µg/ml de bromure d'éthidium, et identifiés par leur taille attendue (tableau II-1).

Dans la RT-PCR semi-quantifiée, l'expression du transcrit est évaluée par la mesure densitométrique de l'intensité de gris des bandes grâce au logiciel SigmaScan Pro (Jandel Scientific, Erkrath, Allemagne). Les rapports des intensités des bandes pour le R-PTH1 ou la PTHrP sont calculés

par rapport aux intensités correspondant à la GAPDH, considérée comme un gène domestique. Ces rapports sont ensuite normalisés par rapport aux rats Wistar ou WKY normotendus.

- **Amplification de l'ADNc par PCR quantitative en temps réel**

L'ADNc a été amplifiée par le LightCycler® (Roche Diagnostic, Meylan, France), en utilisant le kit Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen) pour les produits de PCR de moins de 400 pb (rR-PTH1, rGAPDH, rRénine et rR-AT1). La PCR quantitative est réalisée dans un volume de 20 µl en présence de 0,5 µM d'amorces spécifiques sens et antisens du gène d'intérêt (tableau II-1), 1 µg BSA, 0,6 U de Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG et 2 µl d'ADNc (50 ng). Après une première dénaturation à 95°C, la PCR est réalisée en 45 cycles de dénaturation (5 s à 95°C), d'amorçage (10 s à 55°C) et de polymérisation (10 s à 72°C pour le rR-PTH1, rRénine, rR-AT1, et 20 s pour la rGAPDH).

Pour les produits de PCR de plus de 400 pb (rPTHrP), le kit LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green a été utilisé (Roche Diagnostic, Meylan, France). La PCR quantitative est également réalisée dans un volume de 20 µl en présence de 0,5 µM d'amorces spécifiques sens et antisens du gène d'intérêt mais cette fois-ci avec 4 mM de MgCl₂, 0,2 µM de sonde SYBR Green, 0,4 µM de sonde d'hybridation, 1x du tampon de réaction FastStart (DNA polymérase, dNTP, tampon) et 2 µl d'ADNc (50 ng). Après une première dénaturation à 95°C pendant 10 min, la PCR est réalisée en 45 cycles de dénaturation (10 s à 95°C), d'amorçage (5 s à 60°C) et de polymérisation (12 s à 72°C). Chaque échantillon a été analysé en double et quantifié selon le protocole du fournisseur (Roche Diagnostics). L'expression relative des différents gènes a été calculée en rapportant les taux d'ARNm à ceux de la GAPDH considérée comme gène domestique.

- **Evaluation de l'expression de la protéine du R-PTH1 par Western blot**

- **Extraction des protéines**

Les différents tissus prélevés sont broyés au potter de Kontes dans 1 ml de tampon A, riche en inhibiteurs de protéases (10% glycérol, 20 mM Tris HCl, 100 mM NaCl, 2 mM PMSF, 2 mM EDTA, 10 mM orthovanadate de sodium, 10 µg/ml leupeptine, 10 µg/ml aprotinine). L'homogénat est centrifugé à 27000 g pendant 30 minutes à 4°C. Le surnageant est jeté et le culot membranaire est remis en suspension dans 160 à 400 µl de tampon B (tampon A, additionné extemporanément de 1% NP-40, 0,1% SDS et 1% désoxycholate). Après 30 minutes d'incubation à 4°C et une nouvelle centrifugation (30000 g pendant 30 minutes à 4°C), le surnageant comprenant les membranes solubilisées est utilisé pour l'analyse en Western Blot.

- **Dosage des protéines**

Le dosage des protéines est réalisé à partir d'un aliquote de 50 à 100 µl de chaque surnageant, par la méthode de Lowry⁵¹³. Les quantités de protéines sont exprimées en mg.

- **Analyse par Western Blot**

La dénaturation des protéines est complétée dans le tampon Laemmli (0,0025% bleu de bromophénol, 5% SDS, 12,5% α -mercaptoéthanol, 160 mM Tris et 25% glycérol), à 100°C pendant 6 min. Vingt à 40 μ g de protéines sont déposés sur un gel de concentration (acrylamide/bisacrylamide 30%, Tris 1 M, SDS 10 %, APS 10 %, TEMED) et séparés sur gel d'acrylamide 10% lors d'une migration de 2 h à 150 V. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose pendant 1 h à 100 V. Celle-ci est rincée avec du tampon phosphate additionné de 0,5% de Tween, avant d'être incubée dans 5% de lait écrémé pendant une nuit entière à 4°C afin de saturer les sites de liaison non spécifiques. Le lendemain, la membrane est exposée durant 1 h 30 à un anticorps primaire (anticorps polyclonal anti-R-PTH1 du rat, généré chez le lapin ; Babco, Richmond, USA) dirigé contre les acides aminés 248-262 de la 3^{ème} boucle extra-cellulaire du R-PTH1 de rat. Après 3 rinçages (3 fois 20 minutes) avec le tampon phosphate/Tween, la membrane est incubée durant 1 h avec l'anticorps secondaire (anticorps d'âne dirigé contre les immunoglobulines de lapin, et lié à la peroxydase de raifort ; Babco) avant d'être rincée à nouveau. L'immunoréactivité est révélée par un kit de détection ECL, avec production de luminol, visualisé par exposition (5 à 20 min) à un film photographique (Hyperfilm-ECL) en chambre noire. Les résultats sont analysés par densitométrie grâce au logiciel SigmaScan Pro (Jandel Scientific), comme précédemment pour la technique de PCR semi-quantitative.

Expression des résultats et analyses statistiques

Les résultats sont présentés par la moyenne \pm l'erreur standard sur la moyenne (E.S.M.). Ils sont analysés, selon le cas, par un test *t* de Student ou une analyse de variance à deux facteurs croisés (facteur souche ; facteur concentration = mesures répétées), suivie d'une localisation des différences par un test de Tukey (SigmaStat, Jandel Scientific). Une valeur de $P < 0,05$ est considérée comme significative. Une transformation des données (Log10) a été faite, si nécessaire, pour normaliser les distributions ou pour homogénéiser les variances.

CHAPITRE III

La dérégulation du R-PTH1 : apport des expérimentations
in vivo / ex vivo

**La dérégulation du R-PTH1 : une
spécificité réno-vasculaire chez le
SHR adulte ?**

INTRODUCTION

Les travaux antérieurs de notre laboratoire ^{7,8} démontraient que le système PTHrP/R-PTH1 était profondément perturbé dans le lit vasculaire rénal du SHR et que cette altération contribuait à la résistance vasculaire rénale élevée chez ces animaux. La PTHrP était augmentée dans les artères intrarénales isolées de SHR de 12 semaines, une observation en accord avec les données rapportées par Noda sur des aortes et des artères mésentériques de SHR adulte ⁵⁰³. Parallèlement, notre laboratoire montrait que l'expression du R-PTH1 (ARNm et protéine) était fortement diminuée dans les artères intrarénales du SHR et que ceci était à l'origine d'une diminution de la réponse vasodilatatrice induite par la PTHrP(1-36) sur le rein isolé perfusé. Cette dérégulation du R-PTH1 et de la réponse vasodilatatrice rénale associée apparaissait comme un facteur important dans la régulation de l'hémodynamique rénale du SHR. En effet, la restauration de l'expression du R-PTH1 chez le SHR par l'administration *in vivo* de l'ADNc du R-PTH1 humain, restaurait la vasodilatation rénale à la PTHrP(1-36) sur le rein isolé perfusé et diminuait la résistance vasculaire rénale basale particulièrement élevée chez le SHR ⁸. Dans cette étude cependant, la restauration de l'expression du R-PTH1 touche l'ensemble du lit vasculaire et en particulier l'aorte, sans que la transfection ne soit associée à une baisse de la pression artérielle des SHR. Il est possible que la stimulation du SRA par la transfection ⁸ masque un possible effet hypotenseur. Il est aussi possible que la dérégulation du R-PTH1 et de la vasodilatation associée, ne soit pas une caractéristique générale du système cardiovasculaire chez le SHR. En accord avec cette dernière éventualité, Dipette ⁵¹⁴ avait rapporté qu'une administration systémique de PTHrP produisait une diminution comparable de la pression artérielle chez le SHR et le rat WKY anesthésié.

Cette différence entre nos résultats et ceux de Dipette pouvait être liée à des différences dans les conditions expérimentales des études (réactivité vasculaire *in vitro*, sur le rein isolé ; baisse de la pression artérielle *in vivo*, chez le rat conscient), ou à une réelle spécificité tissulaire dans l'altération du système PTHrP/R-PTH1 chez le SHR.

- Afin de vérifier que l'altération de la vasodilatation rénale à la PTHrP chez le SHR n'était pas liée au modèle expérimental utilisé, le rein isolé perfusé privé de toutes ses connections nerveuses et humorales, nous avons comparé les effets hémodynamiques rénaux de la PTHrP *in vivo* entre SHR et rats Wistar ou WKY, en évaluant les variations du débit sanguin rénal en réponse à une perfusion de la PTHrP(1-36) directement dans l'artère rénale chez le rat anesthésié.
- Par ailleurs, afin de vérifier une éventuelle spécificité rénale dans la dérégulation du système PTHrP/R-PTH1, nous avons comparé la vasodilatation mésentérique induite par la PTHrP chez le SHR adulte et le rat Wistar, tant *in vitro* que *in vivo*.
- La spécificité rénale de la dérégulation du R-PTH1 chez le SHR a été évaluée plus en détail, en recherchant une diminution de l'expression du récepteur dans d'autres organes du système cardiovasculaire tels que l'aorte, le cœur (oreillettes, ventricule gauche) et rein (cortex, medulla).

- Une altération de la vasodilatation liée à la voie de l'AC/PKA a précédemment été décrite dans l'HTA^{439,441}. C'est pourquoi, nous avons analysé en parallèle dans nos expériences, les vasodilatations induites par la PTHrP, l'isoprotérénol et la forskoline afin de pouvoir les comparer.
- Enfin, comme l'utilisation du rat WKY comme témoin normotendu du SHR est souvent contestée en raison de ses variations biologiques⁵¹⁵, nous avons aussi utilisé les rats Wistar comme témoins normotendus.

Le souci d'élucider les mécanismes impliqués dans la dérégulation du R-PTH1 chez le SHR nous conduisait alors inévitablement à nous demander si cette dérégulation pouvait avoir une origine génétique, et donc était susceptible d'exister déjà chez des rats SHR de 4 semaines, avant que n'apparaisse l'HTA. Alternativement, la dérégulation du R-PTH1 pouvait apparaître au cours de l'installation de l'HTA, en réponse à l'étirement mécanique associé à l'augmentation de la pression artérielle ou en réponse à des modifications hormonales, notamment en ce qui concerne le système rénine-angiotensine. Expérimentalement, une surexpression de PTHrP a été décrite sur des CMLAo ou des aortes en réponse à l'Ang II et à la distension mécanique^{121,124,125,315,349,503}. Les études analysant la régulation du R-PTH1 dans les mêmes conditions sont rares et les résultats contradictoires notamment en ce qui concerne les effets de l'Ang II^{343,349}. Afin d'élucider les différents points mentionnés ci-dessus, nous avons évalué la dérégulation du système PTHrP/R-PTH1 (expression et vasodilatation rénale)

- chez le SHR jeune préhypertensif,
- chez le SHR adulte soumis à un traitement bloquant les récepteurs AT1 (losartan) et
- chez des rats développant une autre forme d'HTA, typiquement associée à une inhibition du SRA, les rats DOCA-sel.

RESULTATS

La diminution, chez le SHR adulte, de la vasodilatation rénale induite par la PTHrP(1-36) est aussi une réalité in vivo

Sur le rein isolé perfusé, la PTHrP(1-36) induit une vasorelaxation concentration-dépendante, mise en évidence par la baisse progressive des pics de vasoconstriction induits par la phényléphrine. Un exemple de tracé expérimental est présenté dans la **figure III-1**. Les réponses vasodilatatrices rénales à la PTHrP(1-36) étaient strictement similaires sur des reins isolés provenant de rats normotendus Wistar ou WKY (**figure III-2A**). Ces réponses étaient par contre très diminuée sur des reins isolés provenant de SHR de 12 semaines (**figure III-2A**), confirmant ainsi les résultats observés antérieurement par notre laboratoire sur le lit vasculaire rénal *in vitro*⁷.

Cette hyperactivité vasculaire rénale à la PTHrP(1-36) est également une réalité *in vivo*, chez le SHR adulte, comme le montrent les résultats de débimétrie rénale chez des rats anesthésiés. En effet, la perfusion de PTHrP(1-36) directement dans la circulation rénale chez le rat anesthésié, majore le débit sanguin rénal sans effet notable sur la pression artérielle systémique jusqu'à une concentration de 10 nM. Un exemple de tracé expérimental est représenté sur la **figure III-3**. La baisse concentration-dépendante

de la résistance vasculaire rénale par la PTHrP(1-36) était là encore strictement similaire entre des rats normotendus Wistar ou WKY (**figure III-2B**), mais était diminuée de moitié chez le SHR de 12 semaines (**figure III-2B**).

Ce résultat démontre que l'hyporéactivité vasculaire rénale à la PTHrP(1-36) n'est pas une particularité du rein isolé dont l'étude se fait dans des conditions tout à fait artificielles. Elle existe aussi *in vivo*, lorsque le rein est soumis à de multiples régulations, nerveuses ou hormonales, et lorsqu'il est perfusé à une pression plus élevée chez le SHR.

La vasodilatation induite par la PTHrP(1-36) sur le lit vasculaire mésentérique n'est pas altérée chez le SHR adulte

Nous avons vérifié dans un second temps, si cette altération de la vasodilatation à la PTHrP chez le SHR était retrouvée sur d'autres territoires vasculaires, en particulier sur un autre territoire vasculaire de résistance, le lit mésentérique. Que l'étude ait été réalisée *in vitro*, sur le lit vasculaire mésentérique isolé et perfusé (**figure III-2A**), ou *in vivo* en perfusant la PTHrP directement dans la circulation mésentérique du rat anesthésié (**figure III-2B**), nos résultats montrent que la PTHrP(1-36) induit une vasorelaxation comparable sur les artères mésentériques du SHR et du rat Wistar adulte. Ce résultat, qui diffère fondamentalement de nos observations au niveau rénal, suggère que l'altération du R-PTH1 pourrait ne pas être une généralité du système cardiovasculaire chez le SHR.

La baisse de l'expression du R-PTH1 chez le SHR adulte est une particularité réno-vasculaire

Afin de vérifier ce dernier point, nous avons évalué l'expression du R-PTH1, tant en terme de son ARNm (RT-PCR, **figure III-4A**) que de la protéine (Western blot, **figure III-4B**), dans divers tissus ou organes du système cardiovasculaire, exposés comme les artères intra-rénales à une surcharge de pression chez le SHR. Nos résultats montrent que l'hyporéactivité vasculaire rénale à la PTHrP(1-36) chez le SHR adulte est associée, comme dans nos études antérieures⁸, à une baisse de l'expression du R-PTH1 sur les petites artères intra-rénales. Cette dérégulation de l'expression du R-PTH1 n'existe par contre pas sur les artérioles mésentériques du SHR, en accord avec les réponses vasodilatatrices rapportées ci-dessus. Nos résultats montrent par ailleurs qu'il n'y a pas davantage de différence dans l'expression du R-PTH1 entre SHR et rats normotendus, que ce soit dans l'aorte (artère de capacitance), dans le cœur (ventricule gauche ou oreillette) ou dans le rein (cortex ou médulla) (**figure III-4**).

Nous avons analysé dans notre étude l'expression du R-PTH1 dans la médulla rénale, compte tenu du rôle important de l'hémodynamique médullaire dans la natriurèse de pression et le développement de diverses formes d'HTA⁴³⁰. Nous avons trouvé une expression du R-PTH1 dans la médulla rénale, ce qui n'était pas connu jusqu'à présent. Nos travaux cependant ne permettent pas de localiser le R-PTH1 sur une structure précise, vasculaire (vasa recta) ou tubulaire (partie terminale du tubule proximal ?) et les effets hémodynamiques potentiels de la PTHrP sur la circulation médullaire n'ont pour l'instant pas été recherchés. Sur la médulla du SHR, nous n'avons pas observé de modification dans l'expression du R-PTH1, excluant ainsi probablement une participation du système PTHrP/R-PTH1 de l'altération de l'hémodynamique médullaire chez le SHR.

Dans l'étude du R-PTH1 par Western blot, l'anticorps reconnaît au niveau vasculaire, en accord avec des résultats antérieurs de notre laboratoire^{8,350}, une bande majeure à 180 kD correspondant au R-PTH1 sous forme dimérique, et une bande mineure à 90 kD correspondant au R-PTH1 sous forme monomérique glycosylée²¹⁹. L'intensité de la bande de 90 kD était trop faible dans cette étude pour être quantifiée. La dimérisation du R-PTH1 a été documentée à maintes reprises²¹⁸. Le rôle physiologique de cette dimérisation n'est pas connu, mais à l'image d'autres récepteurs couplés aux protéines G, elle pourrait contribuer à une modulation de l'activité du R-PTH1. La spécificité de reconnaissance du R-PTH1 par l'anticorps n'est pas à mettre en cause, étant donné la reproductibilité des bandes sur toutes nos préparations vasculaires et l'absence de marquage sur des cellules COS déficientes en R-PTH1³⁵⁰. Il faut remarquer que le R-PTH1 est détecté au niveau du rein (cortex et médulla) et du cœur (ventricule gauche et oreillette) sous forme d'une bande de 60 kD qui correspondrait au R-PTH1 déglycosylé²¹⁹. Le degré de glycosylation et de dimérisation du R-PTH1 ne serait donc pas le même dans les vaisseaux et d'autres tissus. Cependant, le R-PTH1 déglycosylé resterait fonctionnel²¹⁹.

L'hyporéactivité vasculaire à la PTHrP chez le SHR diffère de celle à l'isoprotérénol

Afin de vérifier si l'hyporéactivité vasculaire à la PTHrP était liée à une anomalie générale de la voie de l'AC, nous avons testé l'isoprotérénol et la forskoline dans les mêmes conditions expérimentales, tant au niveau du lit vasculaire rénal que mésentérique. Les réponses vasodilatatrices obtenues avec la forskoline montrent qu'il n'y a pas de différence de réactivité entre SHR et rats normotendus Wistar ou WKY, quelque soit le lit vasculaire considéré (**figure III-5**). Ces résultats, en accord avec les données de la littérature⁴⁴¹, suggèrent une activité normale de l'AC. L'isoprotérénol stimule l'AMPc par interaction avec les récepteurs β -adrénergiques. Nos résultats montrent que les réponses vasodilatatrices induites par l'isoprotérénol sont amoindries au niveau du lit vasculaire rénal et davantage encore sur le lit vasculaire mésentérique (**figure III-5**). Cette anomalie ressemble à celle décrite par ailleurs chez le SHR pour le fénoldopam, la prostacyclin ou la prostaglandine E, activant chacun un récepteur couplé à l'AC via des protéines Gs^{439,441}. L'hyporéactivité vasculaire n'était alors liée ni à une altération de l'expression de Gs^{441,450,451,452}, ni à une modification de l'expression des récepteurs correspondants^{433,441}, mais à un défaut de couplage entre les récepteurs et Gs^{434,441}. L'hyporéactivité vasculaire était présente sur divers types de vaisseaux, rénaux mais aussi mésentériques et fémoraux^{516,517}, dès le plus jeune âge (7 semaines)⁴⁴¹.

Globalement, l'ensemble de ces données montre que l'hyporéactivité vasculaire à la PTHrP chez le SHR est très différente de celle décrite pour l'isoprotérénol, le fénoldopam ou la prostacycline, en particulier parce que i) elle est spécifique du lit vasculaire rénal, ii) elle est toujours associée à une diminution de l'expression du R-PTH1 et enfin iii) elle n'est pas présente chez le SHR jeune comme le montre ci-dessous les réponses obtenues chez des animaux âgés de 4 semaines. Par conséquent, les faibles réponses vasodilatatrices rénales à la PTHrP chez le SHR adulte ne semblent pas liées à un défaut de couplage entre le R-PTH1 et les protéines Gs, mais dépendent strictement du niveau d'expression du R-PTH1. Ceci suggère d'ailleurs qu'il n'y ait pas de récepteurs de réserve pour le R-PTH1 vasculaire.

La réponse vasodilatatrice rénale et l'expression du R-PTH1 ne sont pas modifiés chez le SHR de 4 semaines

Nathalie Fiaschi-Taesch avait montré dans sa thèse que la vasodilatation rénale induite par la PTHrP(1-36) était identique sur des reins isolés provenant de jeunes rats WKY ou SHR (thèse de doctorat 2000). Il en était de même de l'expression du R-PTH1 en terme d'ARNm (**figure III-6**). Nous avons complété ce travail en montrant que l'expression de la protéine réceptrice R-PTH1 (Western blot) n'était pas davantage modifiée chez le SHR jeune préhypertensif (**figure III-6**). L'altération de l'expression vasculaire rénale du R-PTH1 ne semble ainsi pas liée à une déficience génétique chez le SHR. N'étant pas présente chez le jeune SHR, elle ne semble pas impliquée dans l'augmentation de la résistance vasculaire rénale qui contribue à cet âge à l'installation de l'HTA. La dérégulation du R-PTH1 semble plutôt être une conséquence de l'HTA et/ou d'une anomalie du SRA, et contribuerait au maintien de l'HTA.

SHR traitement losartan

Afin de vérifier si le SRA contribue à la dérégulation du R-PTH1, nous avons traité des SHR adultes avec un antagoniste des récepteurs AT1, responsables de la plupart des effets de l'Ang II. Ce traitement a partiellement restauré la vasodilatation rénale induite par la PTHrP(1-36) sur le rein isolé du SHR (**figure III-7B**), de pair avec l'expression du R-PTH1 sur les artères intra-rénales du SHR (Western blot ; **figure III-7C**). Le losartan ne modifiait par contre pas l'expression du R-PTH1 dans l'aorte ou la médulla rénale, deux territoires où l'expression basale du R-PTH1 n'était pas affectée chez le SHR. Ce résultat suggère que la correction par le losartan ne relève pas de la baisse de la pression artérielle qui affecte indifféremment tous les territoires, mais plutôt de l'inhibition des effets de l'Ang II dont la concentration est particulièrement élevée dans le rein⁴⁸⁷ et les effets vasculaires spécifiquement majorés dès le jeune âge chez le SHR⁴³⁶.

Rats DOCA-sel

Afin de préciser plus avant la possibilité d'une modulation de l'expression du R-PTH1 par le stretch associé à une augmentation de la pression artérielle, nous avons analysé cette régulation dans un modèle d'HTA caractérisé par une rénine très basse, minimisant ainsi la contribution de l'Ang II. Les rats traités par la DOCA et ayant accès à une boisson riche en NaCl développent une HTA de ce type. L'HTA est nette dès la 3^{ème} semaine de traitement et la pression artérielle systolique se maintient à une valeur supérieure à 160 mmHg au cours des semaines suivantes (**figure III-8A**). L'activité rénine plasmatique était très basse (8 ± 4 vs 38 ± 7 ngAngI/ml/hr, n=8, P<0,001). Chez les rats DOCA-sel hypertendus depuis 3 semaines, nous n'avons cependant pas trouvé de différence dans la réponse vasodilatatrice rénale induite par la PTHrP(1-36) sur le rein isolé (**figure III-8B**). L'expression vasculaire du R-PTH1 (Western blot) n'était d'ailleurs pas modifiée sur les artères intra-rénales, ni d'ailleurs sur les artérioles mésentériques (**figure III-8C**). Ce résultat montre que l'HTA n'est pas capable en soi de déréguler l'expression du R-PTH1 vasculaire rénal, du moins en l'absence d'un SRA intact.

Surexpression de la PTHrP

Puisqu'une surexpression de la PTHrP avait été décrite parallèlement à la sous-expression du R-PTH1 dans les artères intrarénales du SHR⁸, nous avons vérifié l'expression de la PTHrP dans l'ensemble des situations expérimentales mentionnées ci-dessus. Cette expression a été analysée en terme d'ARNm par RT-PCR puisque les taux de protéine mesurables dans les tissus sont souvent à la limite du seuil de détection par un dosage radioimmunologique. Nos résultats confirment la surexpression (d'un facteur proche de 5) de la PTHrP dans les artérioles intrarénales chez le SHR de 12 semaines (**figure III-9A**). Cette surexpression de la PTHrP est là encore spécifique des artères intrarénales puisque l'expression de la PTHrP n'est pas modifiée simultanément dans l'aorte ou les artérioles mésentériques (**figure III-9A**). Le losartan normalise partiellement cette surexpression suggérant une contribution de l'Ang II (**figure III-9B**). Chez le rat DOCA-sel cependant, une surexpression de PTHrP est encore observée spécifiquement dans les artères intrarénales en l'absence d'un SRA intact. Ce résultat suggère que la régulation de la PTHrP et du R-PTH1 met en jeu des mécanismes différents. Il est intéressant de noter dans ce contexte que l'endothéline-1 joue un rôle important dans l'HTA DOCA-sel⁵¹⁸. Or l'endothéline est un puissant inducteur de la surexpression de la PTHrP dans les CMLV¹²¹ mais diminue aussi l'expression du R-PTH1²⁶⁴. Il est ainsi peu probable que l'endothéline soit responsable de la dérégulation spécifique de la PTHrP que nous observons chez le rat DOCA-sel. De manière plus intéressante, l'étirement mécanique des CMLV en culture produit à la fois une surexpression de la PTHrP et une altération de l'expression du R-PTH1⁵¹⁹, mais seule la dérégulation du R-PTH1 dépend alors aussi de l'Ang II (Eric Schordan, résultats personnels). Cette observation pourrait ainsi expliquer la dérégulation sélective de la PTHrP dans l'HTA DOCA-sel caractérisée par une rénine basse.

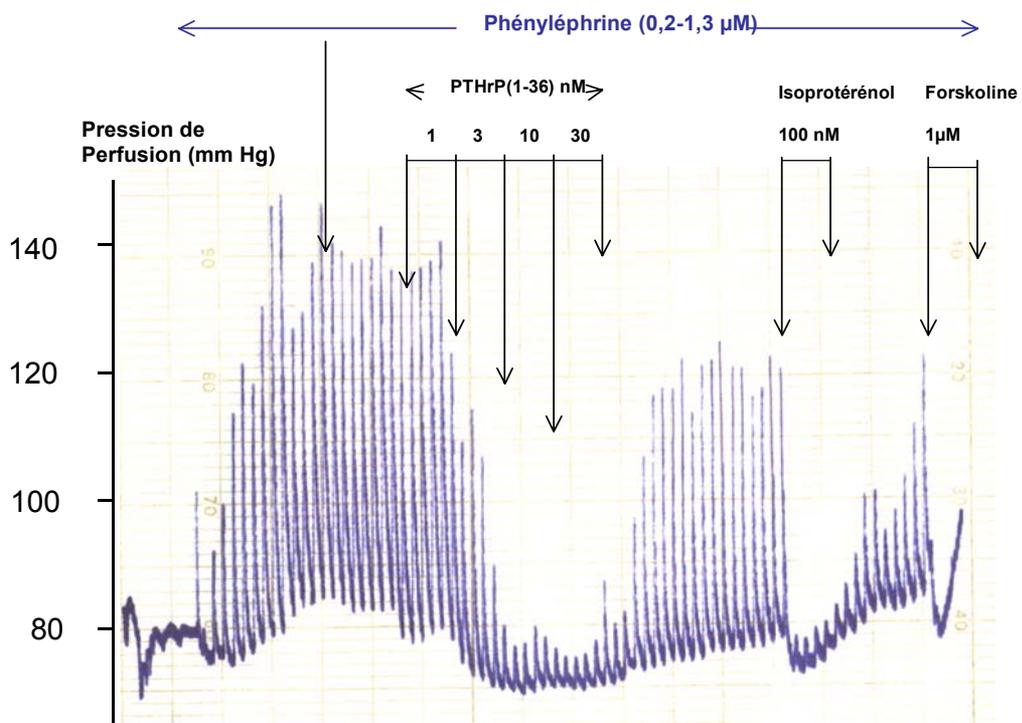


Figure III-1: Réactivité vasculaire *in vitro* sur le rein isolé perfusé. Exemple de tracé expérimental montrant la diminution de hauteur des pics de PE lors de la perfusion de vasodilatateurs sur un rein isolé de rat Wistar.

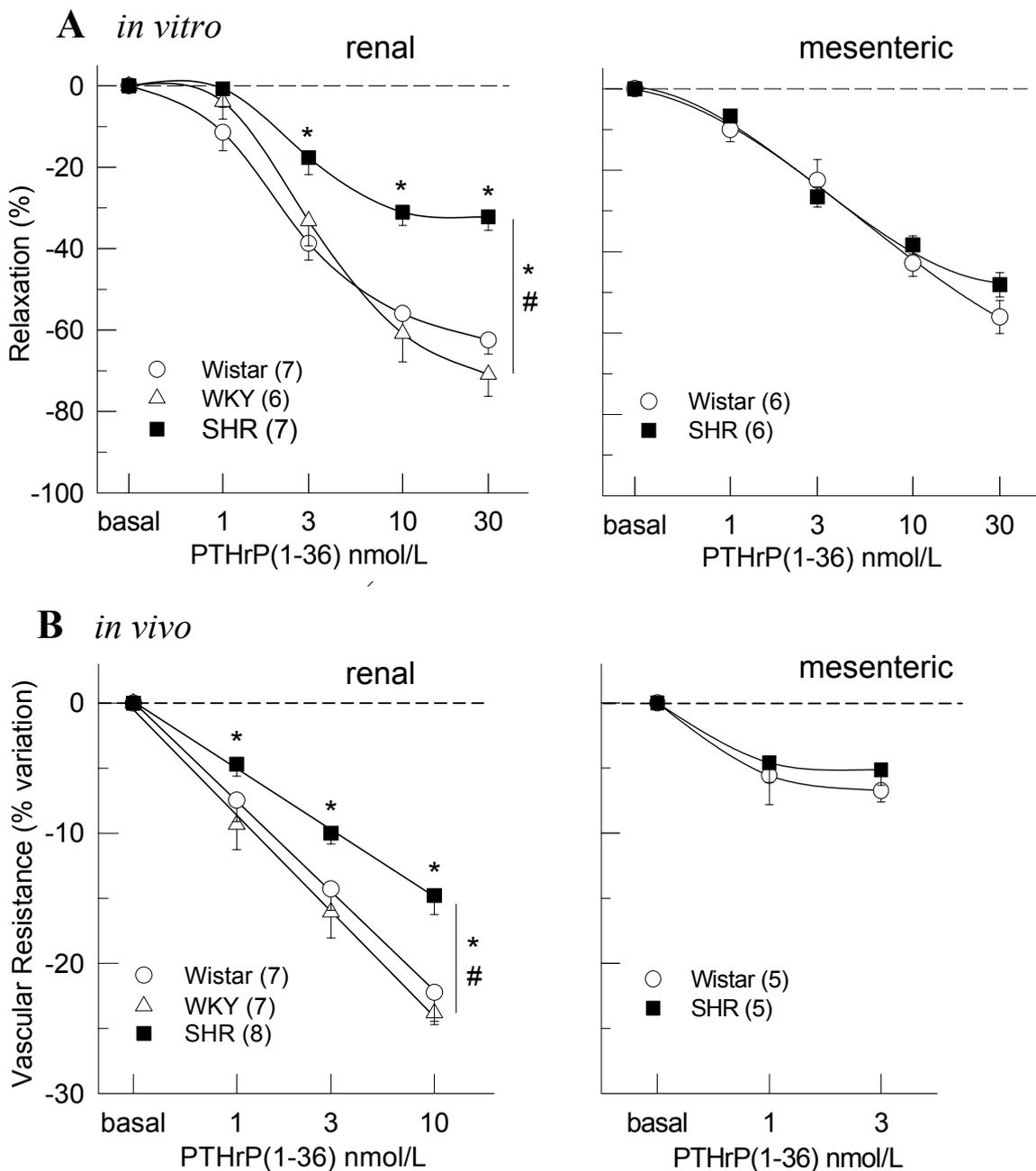


Figure III-2: Vasorelaxation rénale et mésentérique, *in vitro* et *in vivo*, induite par la PTHrP(1-36) chez les rats WKY, Wistar et SHR de 12 semaines. La vasorelaxation *in vitro* a été obtenue sur le rein isolé perfusé ou le lit vasculaire mésentérique (A) et a été exprimé en % de réversion du pic induit par la PE. La vasorelaxation *in vivo* a été évaluée sur les circulations rénale et mésentérique (B) et a été exprimée en % de variation de la résistance vasculaire basale.
 * $P < 0,05$ vs Wistar, # $P < 0,05$ vs WKY.

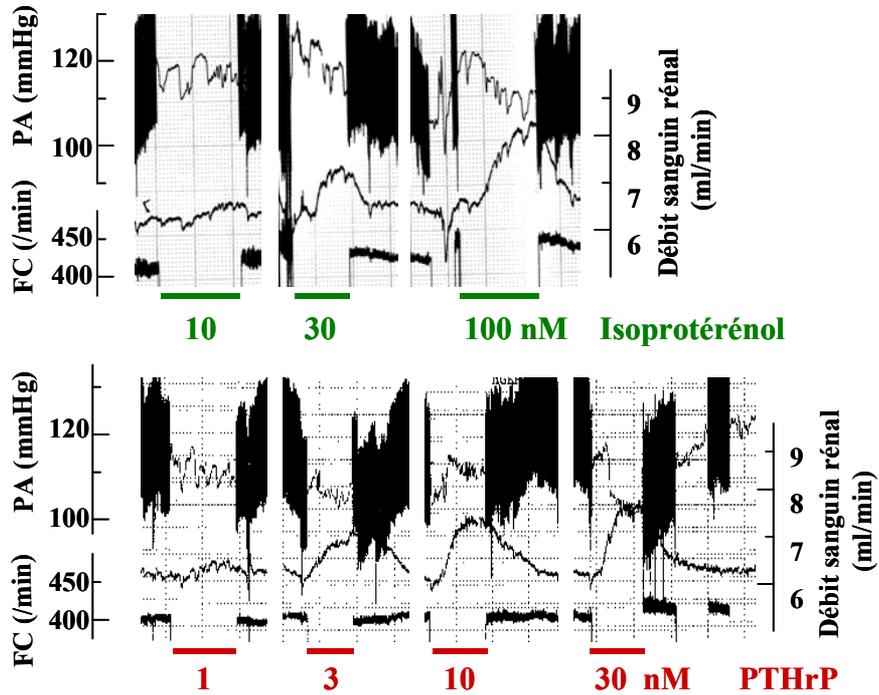


Figure III-3 : Réactivité vasculaire rénale *in vivo*, chez le rat anesthésié. Exemple de tracé d'enregistrement de la pression artérielle (PA), du débit sanguin rénal et de la fréquence cardiaque (FC) lors de la perfusion i.a. rénale d'isoprotérénol et de PTHrP chez un rat Wistar.

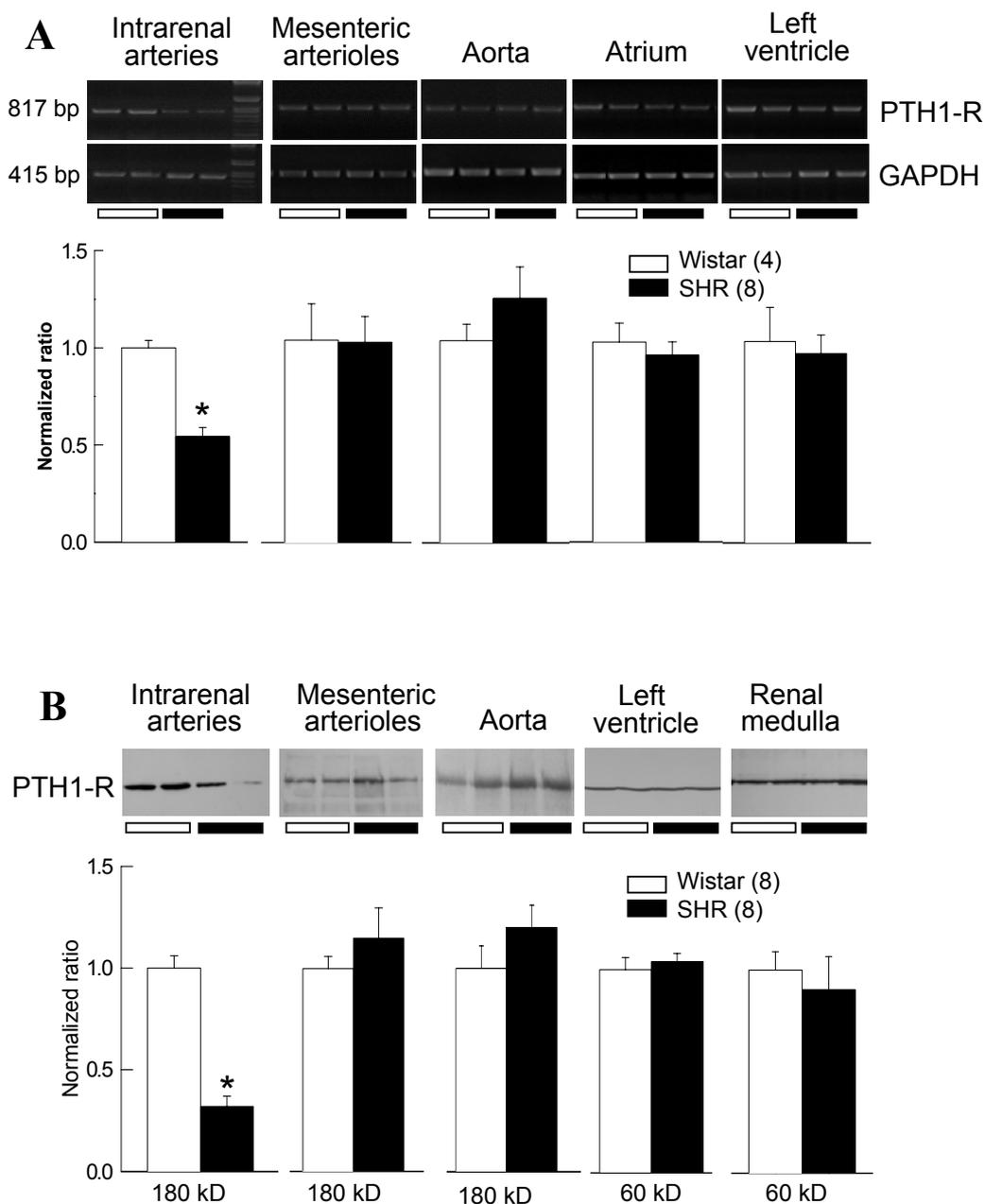
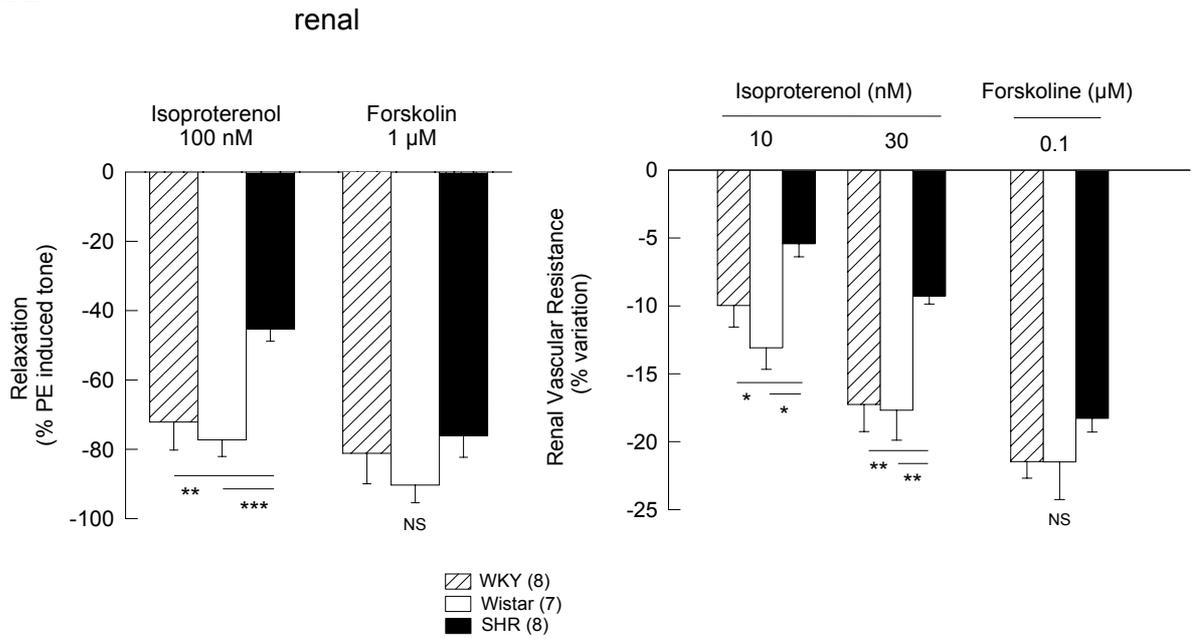


Figure III-4: Analyse de l'expression de l'ARNm (A) et la protéine (B) du R-PTH1 par RT-PCR semi-quantitative et Western blot dans des tissus de SHR et rats Wistar de 12 semaines. La GAPDH a été utilisée comme gène domestique pour normaliser l'expression de l'ARNm du R-PTH1. Des exemples de gels colorés au bromure d'éthidium pour les produits de RT-PCR et des immunoblots sont représentés. L'analyse densitométrique des bandes a été rapportée à 1 pour les rats Wistar.
 * $P < 0,001$.

A *In vitro*



B *In vitro*

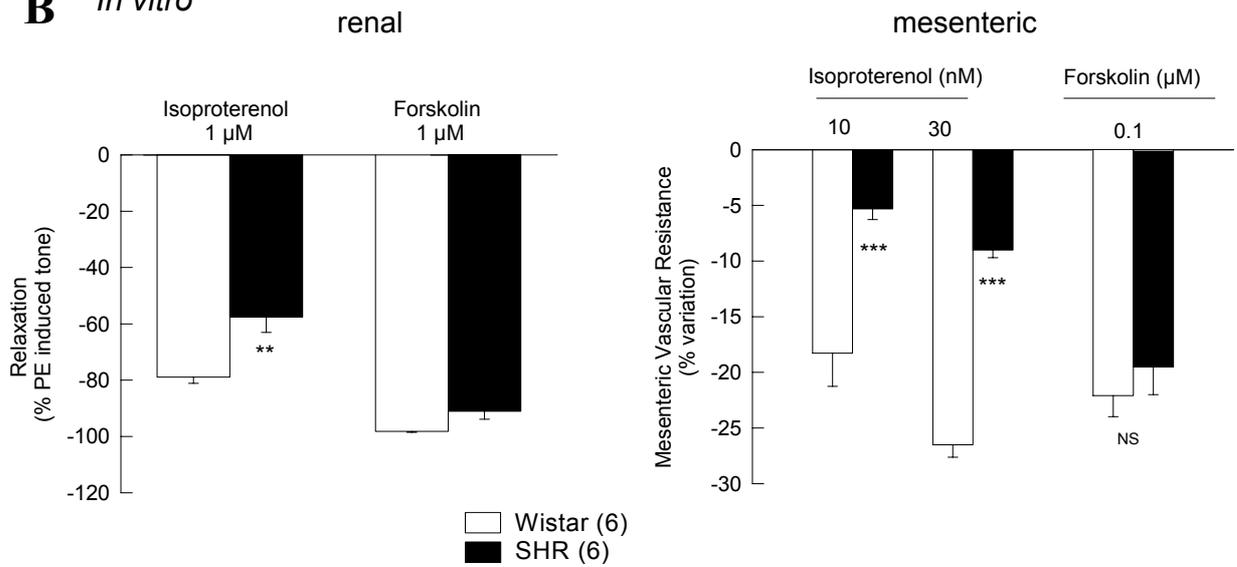


Figure III-5 : Comparaison des réponses vasculaires rénales obtenues chez des rats WKY, Wistar et SHR, en réponse à la l'isoprotérénol et la forskoline sur le rein et le lit vasculaire mésentérique *in vitro* (A) et *in vivo* (B). Les résultats sont représentés par les moyennes (± E.S.M) de relaxation par rapport au tonus induit par la PE, et sont comparés par une analyse de la variance à deux facteurs. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,001$.**

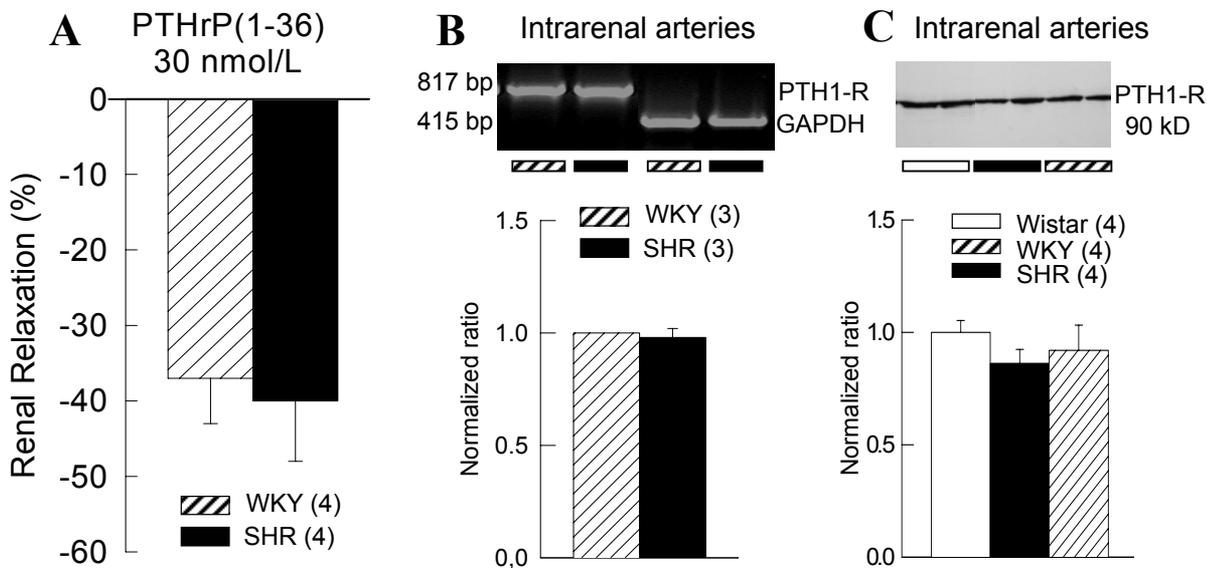


Figure III-6 : Réactivité vasculaire à la PTHrP(1-36) et expression du R-PTH1 dans les artérioles intra-rénales de rats Wistar, WKY et SHR de 4 semaines. (A) La vasodilatation à la PTHrP(1-36) *in vitro* a été évaluée sur la rein isolé perfusé. L'expression du R-PTH1 dans les artérioles intra-rénales a été analysée par RT-PCR semi-quantitative (B) et Western blot (C). L'analyse densitométrique des bandes a été rapportée à 1 pour les rats WKY (B) ou Wistar (C).

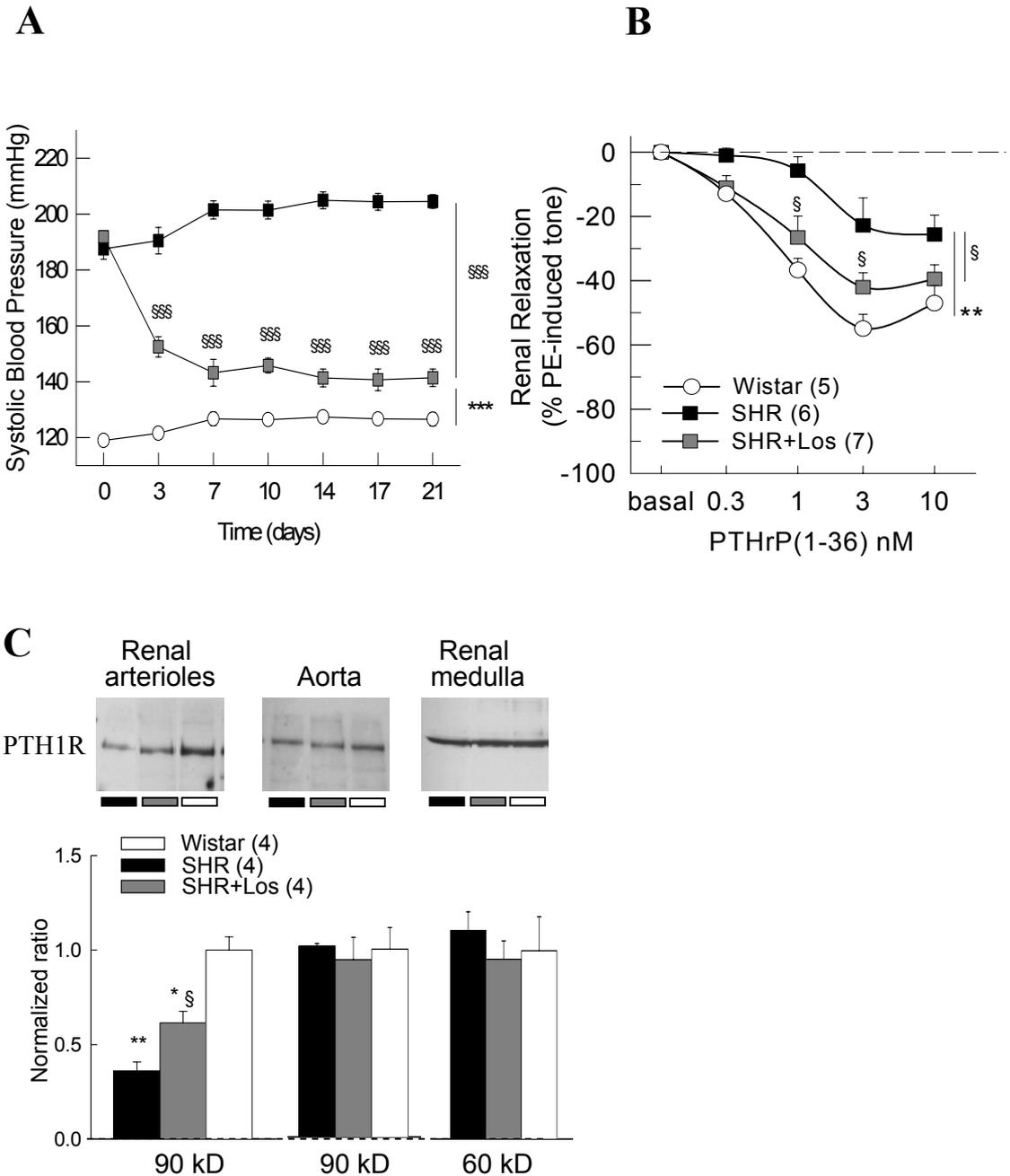


Figure III-7 : Effets du traitements par le losartan chez le SHR sur la pression artérielle systolique (A), la vasodilatation rénale à la PTHrP(1-36) (B) et l'expression du R-PTH1 (C). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Wistar, § $P < 0.05$, §§§ $P < 0.001$ vs SHR.

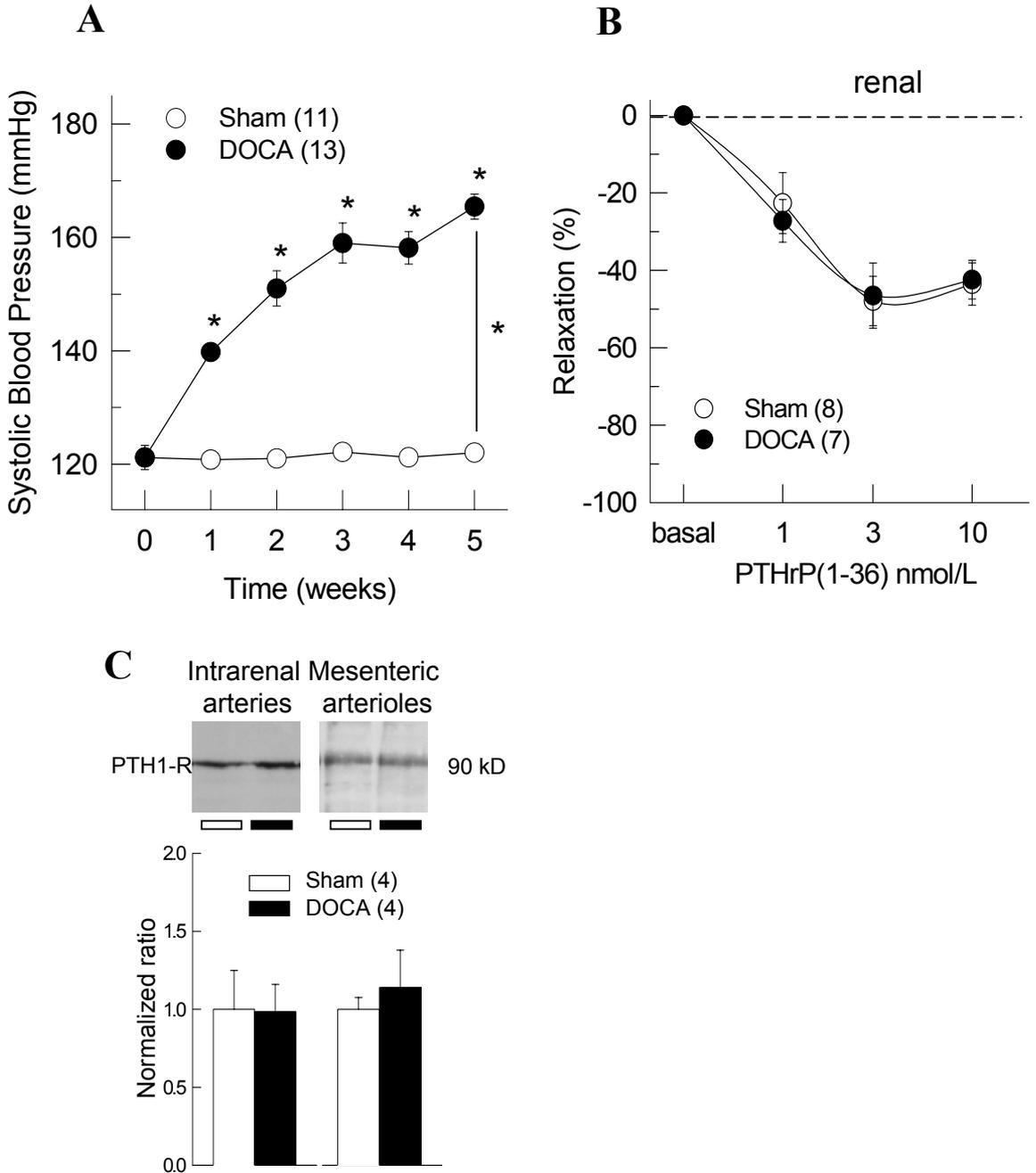


Figure III-8 : Effets de l'HTA DOCA-sel (A) sur la réactivité vasculaire *in vitro* à la PTHrP(1-36) (B) et l'expression du R-PTH1 par analyse Western blot (C). L'analyse densitométrique a été rapportée à 1 pour les rats Sham. * $P < 0,05$.

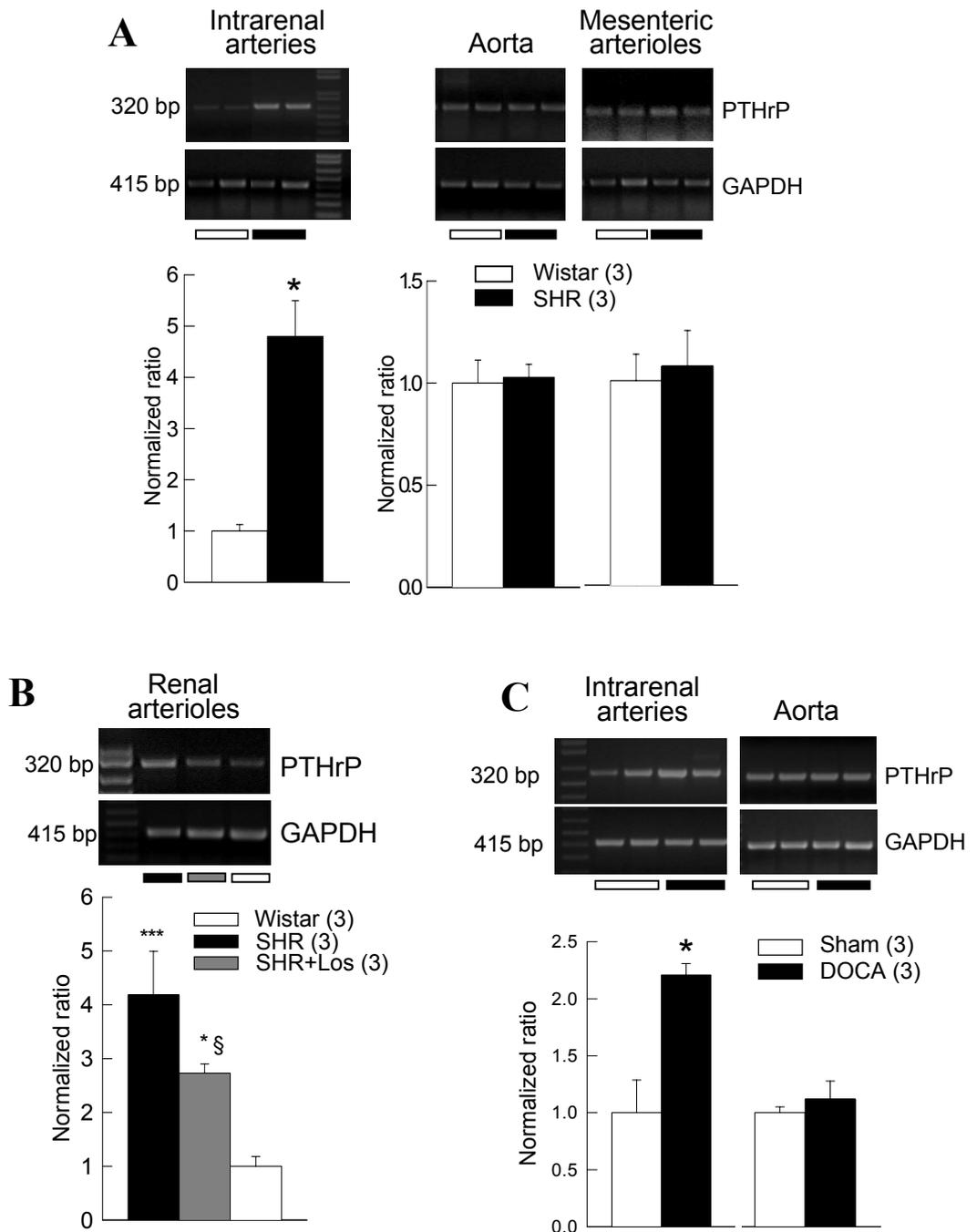


Figure III-9 : Expression de l'ARNm du R-PTH1 par RT-PCR semi-quantitative dans des artères de rats Wistar et SHR de 12 semaines (A), après traitement par la Losartan (B) ou chez des rats DOCA-sel (C). La GAPDH a été utilisé comme gène domestique pour normaliser l'expression de l'ARNm du R-PTH1. L'analyse densitométrique a été rapportée à 1 pour les rats Wistar ou sham. * $P < 0.05$, § $P < 0.05$ SHR vs SHR+Los.

DISCUSSION

Cette première série de travaux démontre la spécificité rénale de la dérégulation du système PTHrP/R-PTH1 chez le SHR adulte, impliquant une surexpression de la PTHrP et une diminution de l'expression du R-PTH1 qui va de paire avec une altération de la réactivité vasculaire rénale à la PTHrP. Cette spécificité rénale permet maintenant de mieux comprendre pourquoi les réponses hypotensives induites par la PTHrP exogène étaient identiques entre SHR et rats normotendus WKY dans les travaux de Dipette⁵¹⁴. Nos résultats apportent aussi quelques éléments pour mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la dérégulation du R-PTH1. En effet, cette dérégulation ne semble pas d'origine génétique puisqu'elle est absente chez le SHR jeune. Au vu des résultats obtenus chez les SHR traités par le losartan ou chez les rats DOCA-sel, il apparaît que l'Ang II est un facteur essentiel dans cette dérégulation. La question se pose alors naturellement de savoir pourquoi une dérégulation *via* l'Ang II pourrait être spécifique du lit vasculaire rénal. Le rein se particularise en ce qui concerne le SRA sur plusieurs points⁴⁸⁷ : i) contrairement à d'autres tissus, l'ensemble des composantes du SRA sont exprimés dans le rein et permettent une synthèse locale d'Ang II ; ii) les concentrations rénales d'Ang II (parenchyme rénal, tubule proximal ou liquide interstitiel) sont plus de 10 à 100 fois supérieures aux concentrations plasmatiques (SRA circulant) ou dans d'autres tissus ; iii) une accumulation intracellulaire d'Ang II a été décrite après endocytose *via* le récepteur AT1 ; iv) cette accumulation rénale d'Ang II est majorée dans des modèles d'HTA clairement associés à une activation du SRA (HTA Goldblatt, perfusion d'Ang II). La fonction de l'Ang II intracellulaire n'est actuellement pas connue.

Chez le SHR cependant, il ne semble pas qu'il y ait une majoration des concentrations intrarénales en Ang II⁴⁸⁵, ni une modification de l'expression des récepteurs AT1 vasculaires⁴⁸². Les réponses vasculaires rénales à l'Ang II sont par contre amplifiées^{436,438} du fait probablement d'une moindre modulation par le NO ou d'autres vasodilatateurs. L'Ang II est par ailleurs un activateur des NADPH oxydases et contribue ainsi au stress oxydatif vasculaire⁴⁶⁹. Cet effet pourrait être particulièrement important dans le rein chez le SHR où divers composants de la NADPH oxydase sont surexprimés dans les vaisseaux⁴⁷⁵. Enfin, des données récentes mettent aussi en lumière l'infiltration du rein de SHR par des lymphocytes et des macrophages qui expriment différents composants du SRA et contribuent à l'accumulation interstitielle d'Ang II⁴⁸⁸. Ainsi, nos résultats et les données de la littérature nous conduisent à proposer que la spécificité rénale de la régulation du R-PTH1 et de la PTHrP chez le SHR *in vivo* soit liée à un microenvironnement rénal particulier en ce qui concerne l'Ang II. De manière plus générale, on peut s'attendre à une dérégulation du système PTHrP/R-PTH1 de même nature (surexpression de la PTHrP, diminution de l'expression du R-PTH1 et de la vasodilatation associée) dans des situations expérimentales ou pathologiques associées à une activation locale ou systémique du SRA ou une exposition directe à l'Ang II. Ainsi, la perfusion sous-cutanée continue d'Ang II chez le rat produit une surexpression de PTHrP non seulement dans les artères intrarénales mais aussi au niveau de l'aorte. L'exposition de CML aortiques en culture à l'Ang II conduit de même à une surexpression de PTHrP^{121,124,315} et à une diminution de l'expression du R-PTH1²⁶⁴. La même dérégulation du système PTHrP/R-PTH1 est retrouvée dans diverses pathologies rénales connues comme étant associées à une

activation du SRA, comme l'insuffisance rénale induite par une surcharge en protéines, l'acide folique ou la cyclosporine, et l'ischémie rénale^{346,347,359,366}. Enfin, dans l'athérosclérose et la formation de neointima après angioplastie où l'Ang II contribue à la pathologie vasculaire³⁷⁴, la PTHrP est surexprimée^{338,370,373} et l'expression du R-PTH1 est abaissée³⁷⁰. La dérégulation du système PTHrP/R-PTH1 vasculaire apparaît ainsi comme un processus général associé à l'activation du SRA. Ceci nous a conduit à étudier plus précisément, dans la seconde partie de ce mémoire de thèse, les mécanismes de la régulation du R-PTH1 par l'Ang II *in vitro*, sur des CMLV en culture.

PUBLICATION (soumise à Hypertension)

« Downregulation of type 1 PTH/PTHrP receptor is not a general feature in the cardiovascular system in hypertensive rats »

SANDRA WELSCH, ERIC SCHORDAN, THIERRY MASSFELDER, NATHALIE FIASCHI-TAESCH, ALAIN LAMBERT, JEAN-JACQUES HELWIG, and MARIETTE BARTHELMEBS

INSERM U727, Section of Renal Pharmacology and Physiopathology, Strasbourg, 67085 France; University Louis Pasteur, School of Medicine, Strasbourg, 67085 France.

Short title: Dysregulation of PTH1-R in hypertensive rats

Subject area of manuscript: [14] Other Hypertension, [97] Other Vascular biology

Word count of manuscript (5334)

Word count of abstract (218)

Total number of figures (6)

Corresponding Author: Dr Mariette BARTHELMEBS, Pharmacologie et Physiopathologie Rénovasculaires (U727 INSERM-ULP), 11 rue Humann, 67085 Strasbourg cedex, France.

Phone: 333-90-24-34-60; Fax: 333-90-24-34-59.

E-mail: mariette.barthelmebs@pharmaco-ulp.u-strasbg.fr

Abstract

We previously reported that parathyroid hormone-related peptide (PTHrP)-induced renal vasodilatation is markedly impaired in 12-week-old spontaneously hypertensive rats (SHR) through the decrease in PTH/PTHrP receptor (PTH1-R) expression in intrarenal arteries; this dysregulation contributed to the high renal vascular resistance in SHR. The present study was performed to evaluate whether the alteration of PTHrP-induced vasodilatation and PTH1-R expression is a general feature in the cardiovascular system of hypertensive rats. We first compared renal and mesenteric vasodilator responses to PTHrP in mature SHR and found that, in contrast to the renal circulation, PTHrP(1-36)-induced vasodilatation was not impaired in the mesenteric circulation, both *in vitro* or *in vivo*. Consistently, PTH1-R protein and mRNA expression were unaltered in mesenteric arterioles, as well as in aorta, heart and renal medulla. The renal dysregulation of PTH1-R expression and related vasorelaxation was not yet present in 4-week-old prehypertensive SHR, suggesting that the PTH1-R downregulation is not a primary defect in SHR. In DOCA-salt rats with low renin hypertension, renal vascular PTH1-R expression and related vasodilatation were unaltered although an increase in PTHrP expression was observed. We conclude that PTH1-R dysregulation is a renovascular specific event in SHR which sets up during the development of hypertension. Present findings also suggest that an intact renin angiotensin system may be required for the PTH1-R dysregulation in intrarenal arteries.

Keywords: parathyroid hormones - receptor, PTH/PTHrP – renal circulation – mesenteric arteries – vasorelaxation - rats, inbred SHR – hypertension, mineralocorticoid

Introduction

PTHrP and PTH1-R are widely expressed throughout the cardiovascular system, including the heart, vascular smooth muscle and endothelial cells.⁵²⁰ PTHrP decreases blood pressure and is a potent vasorelaxant by the activation of PTH1-R. Overexpression of either PTHrP or PTH1-R in smooth muscle reduces blood pressure in awake mice.^{4,5} Consistently, systemic PTH1-R cDNA plasmid delivery to normotensive rats decreases blood pressure and renal tone.⁶ Moreover, exaggerated renal vasodilatation after volume expansion was reported in mice overexpressing the PTH1-R.³²⁴ These studies suggest that locally produced PTHrP participates in the regulation of renal and systemic hemodynamics. The concept that PTHrP might be involved in the pathogenesis of hypertension originates in studies demonstrating that vascular PTHrP expression is enhanced in response to vasoconstrictors such as angiotensin II (AngII) or mechanical stretch.^{124,315,349,503,505} Consistently, upregulation of PTHrP was found in aorta from 18-week-old SHR,⁵⁰³ although the cause of PTHrP upregulation was not clear. Moreover, expression of PTH1-R and consequences on vascular tone have not been addressed in these studies.

Previous work from our laboratory has shown that PTH1-R expression is downregulated in the renal vasculature of 12-week-old SHR, resulting in marked impairment of PTHrP-induced vasodilatation in the isolated kidney.^{7,8} Despite the simultaneous upregulation of PTHrP, the alteration in renovascular PTH1-R appeared obviously as the limiting factor contributing to the high renal vascular resistance in SHR. Indeed, replenishment of the renal vascular pool of PTH1-R following systemic hPTH1-R cDNA plasmid delivery to mature SHR restored the renal vasodilatation to exogenous PTHrP(1-36) and decreased renal vascular resistance otherwise elevated in SHR.⁸ However, in studies of DiPette et al.,⁵¹⁴ systemic administration of PTHrP induced comparable decreases in blood pressure in anesthetized SHR and normotensive rats. This apparent discrepancy in regional and systemic hemodynamics may reflect either a difference in the vascular effects of PTHrP under different experimental conditions, or a tissue specific vascular alteration in PTH1-R.

The present study was performed to evaluate whether the alteration of PTHrP-induced vasodilatation and PTH1-R expression is a general feature in the cardiovascular system of hypertensive rats. We first compared renal and mesenteric vasodilator responses to PTHrP in mature SHR and age-matched Wistar rats under both *in vitro* and *in vivo* conditions. To assess any kidney-specificity in the alteration of the PTHrP/PTH1-R system, we next analysed PTH1-R expression in other tissues/organs from the cardiovascular system exposed to pressure-overload in SHR. Finally, in an attempt to discern the effect of hypertension *per se*, we analyzed the dysregulation of PTH1-R in prehypertensive 4-week-old SHR and in DOCA-salt low renin hypertensive rats.

Methods

Animals

Male SHR, WKY and Wistar rats were purchased from Charles River (l'Arbresle, France). Animals were housed in a constant temperature and light-regulated room (12-hour dark/light cycles), with free access to standard diet (AO4, Safe, Villemoisson/Orge, France). We used mature (12-week-old) and young (4-week-old) SHR with age-matched controls. Deoxycorticosterone acetate(DOCA)-salt hypertension was induced in a group of Wistar rats as described previously.⁵²¹ Systolic blood pressure (SBP) was measured using a tail sphygmomanometric method (Letica,

Barcelona, Spain). Five weeks after DOCA pellets implantation or sham surgery, venous tail blood was obtained for measurements of plasma renin activity,⁸ before tissue sampling or assessment of *in vitro* renal vascular reactivity. Experiments were performed in compliance with guidelines of the European Community and the French government concerning the use of animals.

In vitro Perfused Kidney and Mesenteric Vascular Bed

After pentobarbital anesthesia, the right kidney was isolated as previously described.⁷ The mesenteric vascular bed was prepared according to McGregor.⁵⁰⁷ Both preparations were *in vitro* perfused with a Krebs-Henseleit solution in a single-pass circuit. After a 30-min equilibration period, perfusion flow was adjusted to achieve a baseline perfusion pressure of 80 mmHg which was continuously monitored. Vasodilatation to PTHrP(1-36) (Neosystem, Strasbourg, France) was assessed by the attenuation of phenylephrine-induced pressure peaks (15-s infusion every 2 min).

In vivo Renal and Mesenteric Blood Flow Measurements

After thiobutabarbital anesthesia, rats were prepared as described previously⁵²² for blood pressure recording (carotid artery) and blood flow measurement on the left kidney or the superior mesenteric artery (Skalar electromagnetic flowmeter, Delft, The Netherlands). Intra-arterial (renal or mesenteric) 8-min PTHrP administration was performed by pulsed infusion.⁵⁰⁹ Hematocrit was measured so that drug infusion rate could be adapted to achieve a given drug concentration in plasma. Blood pressure and local blood flow were continuously recorded (WindoGraph 980, Gould & Nicolet, Courtaboeuf, France) and allowed calculation of changes in vascular resistance.

Isolation of Intrarenal Arteries and Other Tissues

After pentobarbital anesthesia, renal medulla, thoracic aorta, mesenteric arterial tree (mainly second and third order arterioles), atrium and left ventricle (midline section) were collected, while intrarenal arterial tree (mainly arcuate and interlobular arteries) was isolated from the cortex as described previously.⁵¹² Tissues were rapidly homogenized in TRIzol and processed for total RNA extraction (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). For Western blot analysis, the organs were *in situ* perfused with an ice-cold glycerol-Tris-NaCl buffer before processing for membrane protein extraction.⁸

Semi-Quantitative Reverse Transcription Polymerase-Chain Reaction (RT-PCR)

The relative abundance of PTH1-R and PTHrP mRNA was analyzed by semi-quantitative RT-PCR using GAPDH to standardize. RT was performed on 2 µg (aorta) or 5 µg (other samples) denatured RNA. PCR of the cDNA was performed in the presence of sense and antisense primers for rat PTH1-R, PTHrP or GAPDH as reported before.³⁵⁰ PCR products were identified on agarose gels by their expected size of 320 bp (PTHrP), 817 bp (PTH1-R) and 415 bp (GAPDH). Band intensities were quantified by a gel analysis software (Sigma Gel[®], Jandel Scientific, Erkrath, Germany).

PTH1-R Western Blot Analysis

PTH1-R protein was evaluated by Western immunoblots essentially as described³⁵⁰ on 25-40 µg proteins according to the tissue, using a polyclonal rabbit anti-rat PTH1-R antibody (Babco, Richmond, USA). Specificity was verified

by competition with excess antigen peptide (Babco). The uniformity of protein load was verified by staining with Ponceau S dye.

Statistical Analysis

Data are means \pm SEM. Differences were tested for statistical significance by Student *t* test, 1-way or 2-way ANOVA (repeated measurements) with post hoc Tukey comparisons, or non parametric tests (Mann-Whitney test, Kruskal-Wallis ANOVA) as appropriate. Statistics were run with SigmaStat[®] (Jandel Scientific). *P* < 0.05 was considered statistically significant.

Results

SBP of 190 ± 5 and 122 ± 2 mmHg was measured in awake 12-week-old SHR and Wistar rats (*n* = 11), a difference maintained under anesthesia (Table). The mean blood pressure measured in 4-week-old SHR and WKY rats during surgery of the isolated kidney preparation was 99 ± 7 and 95 ± 8 mmHg (*n* = 4), showing that the young SHR are in the prehypertensive state. Renal and mesenteric vascular resistance was increased in mature SHR both *in vivo* and *in vitro*, an effect which already began at the renal level in young SHR (Table). Renal hyperresponsiveness to phenylephrine was found in mature SHR and DOCA rats.

PTHrP(1-36)-Induced Vasodilatation is Specifically Decreased in the Renal Vasculature of Mature SHR, both In vitro and In vivo

As previously reported,⁷ PTHrP(1-36) elicited dose-dependent vasodilatation in the isolated kidney which was decreased by half in 12-week-old SHR compared to age-matched WKY (Figure 1A). Similar results were found using Wistar rats as normotensive controls (Figure 1A). We now report that renal hyporesponsiveness to PTHrP(1-36) is also observed under *in vivo* condition when the peptide is directly infused into the renal artery at doses devoid of systemic effects (Figure 1B). Because genetic variability among WKY rats from different suppliers has been evoked,^{5,15} Wistar rats were used as normotensive controls for further comparisons in the present study.

We next asked whether PTHrP-induced vasodilatation is altered in extra-renal vascular beds as well. Figure 1A shows that PTHrP(1-36) elicited *in vitro* mesenteric relaxation in Wistar rats quite comparable to that observed in the kidney. The maximum response was obtained *in vivo* at 3 nmol/L (Figure 1B) since higher concentrations of PTHrP(1-36) decreased blood pressure presumably by overflow of the peptide into the systemic circulation. In marked contrast to the kidney, we found no difference at the mesenteric level in PTHrP-induced relaxation in SHR and Wistar rats, whatever the responses were assessed *in vitro* or *in vivo* (Figure 1).

PTH1-R Expression is Specifically Downregulated in the Renal Vasculature of Mature SHR

Consistent with functional data, downregulation in PTH1-R mRNA and protein expression was found in intrarenal arteries from mature SHR to the exclusion of mesenteric arterioles (Figure 2). Moreover, PTH1-R expression was comparable in the aorta, as well as in the heart (atrium, left ventricle) and the renal medulla from mature SHR and Wistar rats. In Western immunoblots, the antibody typically recognized a major band of 180-kD and a minor band of 90-kD in arteries, although the 90-kD band was expressed at a too low level for semi-quantification in this protocol. A 60-kD band was found in heart and renal medulla.

Renal Vascular PTH1-R in Prehypertensive SHR

In order to evaluate whether the renal vascular dysregulation of PTH1-R precedes the blood pressure increase in SHR, we compared PTH1-R expression and related vasorelaxation in prehypertensive 4-week-old SHR and age-matched normotensive controls. As shown in Figure 3A, PTHrP(1-36) induced comparable *in vitro* vasodilatation in kidneys from young SHR and WKY rats. Consistently, no strain difference in PTH1-R mRNA or protein expression was seen in either intrarenal arteries (Figures 3B and 3C), or aorta and renal medulla (not shown). These results suggest that the PTH1-R dysregulation is probably not a primary genetic defect in SHR.

Renal Vascular PTH1-R Downregulation does not Occur in DOCA-Salt Rats

In an attempt to further discern the effect of pressure-overload per se, we performed studies on DOCA-salt rats as an alternative model of hypertension (Figure 4A). Although we used rats exposed to high blood pressure (SBP > 160 mm Hg) for at least 3 weeks, PTHrP(1-36)-induced renal vasodilatation and arterial PTH1-R protein expression (renal, mesenteric) were comparable in DOCA-salt and sham rats (Figure 4B and 4C). As expected, plasma renin activity was low in DOCA-salt rats (8 ± 4 vs 38 ± 7 ng AngI/mL/hr in sham, $n=8$, $P<0.001$).

Renal specific PTHrP mRNA overexpression in hypertensive rats

Since opposite regulation of PTHrP and PTH1-R has been observed in intrarenal arteries of SHR,⁸ we also analyzed PTHrP expression in this study. Marked PTHrP mRNA overexpression (5-fold) was actually found in the intrarenal arteries from 12-week-old SHR, but without parallel changes in mesenteric arterioles or aorta (Figure 5A). In DOCA-salt rats, PTHrP overexpression was still observed in the intrarenal arteries (Figure 5B), suggesting that differential mechanisms are involved in renal vascular PTHrP and PTH1-R regulation.

Discussion

We previously described that downregulation of PTH1-R expression in intrarenal arteries of 12-week-old SHR resulted in marked impairment of PTHrP(1-36)-induced vasodilatation in the isolated kidney.^{7,8} Moreover, the contribution of this downregulation to the high renal vascular resistance in SHR was strongly suggested by the long-lasting reduction in the vascular tone of kidneys isolated from SHR after replenishment of PTH1-R by *in vivo* systemic delivery of hPTH1-R cDNA.⁸ In the present study, we bring new findings about the characteristics underlying the dysregulation of the vascular PTH1-R in SHR. In particular, we demonstrate that this dysregulation is specific for intrarenal arteries, appears during the development of hypertension and requires an intact renin-angiotensin system.

Up to the present, the impairment of PTHrP-induced renal vasodilatation in mature SHR was only reported *in vitro*, in the isolated perfused kidney.⁷ We show now that similar impairment occurs under *in vivo* condition when vascular reactivity is modulated *in situ* by many factors (local, humoral, nervous) and when the kidney is perfused at high pressure in SHR. The current study reveals that, in marked contrast to the renal circulation, the alteration in PTHrP-induced vasodilatation does not occur in the mesenteric resistance arterial bed, whether the study was performed *in vitro* or *in vivo*. PTH1-R expression at both the transcript and protein levels was in close agreement with these observations. Moreover, no decrease in PTH1-R expression was found either in aorta (capacitance artery) or in heart (atrium and ventricle) of SHR. PTH1-R was expressed in the renal medulla which plays a pivotal role in

long term regulation of blood pressure,⁴³⁰ but here again, no change occurred in SHR. In Western immunoblots, the 60-kD band found in heart and renal medulla corresponds to the nonglycosylated but still active monomeric PTH1-R,²¹⁹ although the 90 and 180 kD bands are specific for arteries and correspond to the monomeric, and probably the dimeric forms of the glycosylated PTH1-R.²¹⁹ Taken together, our data suggest that the dysregulation of PTH1-R is specific for the intrarenal arteries although the overall cardiovascular system is exposed to pressure-overload in mature SHR. This prompted us to assess whether this renal dysregulation exists before the onset of hypertension in young SHR. We found that renal vascular PTH1-R expression was not changed yet in 4-week-old prehypertensive SHR, as was also PTHrP-induced renal vasodilatation. The renal alteration in PTH1-R therefore most likely does not represent a primary defect in SHR, but arises during the development of hypertension. However, whether or not the increase in blood pressure *per se* is responsible for this alteration remains unclear.

Alternatively, AngII may play a role. Indeed, PTH1-R expression is downregulated in models of renal damage associated with an activation of the renin-angiotensin system,^{347,366} although low dose subcutaneous AngII infusion transiently upregulated PTH1-R expression in renal arteries.³⁴⁹ To further examine the mechanism by which PTH1-R is regulated, we used DOCA-salt rats with characteristic low renin hypertension. Although marked hypertension developed, we could not find any difference either in renal vascular PTH1-R expression or in related relaxation. Consistently, the downregulation of PTH1-R we recently reported in renovascular smooth muscle cells exposed to cyclic stretch⁵¹⁹ was no longer observed after AT1 receptor blockade by losartan (Sandra Welsch, personal results). Thus, it is reasonably speculated that AngII is essential for hypertensive stretch-induced dysregulation of renal vascular PTH1-R.

Upregulation of PTHrP occurs in intrarenal arteries of mature SHR as reported before.⁸ This effect was again specific for renal arteries, although conflicting results have previously been reported on the regulation of PTHrP expression in aorta of both young and mature SHR.^{503,505} Since PTHrP upregulation was still observed in intrarenal arteries from DOCA-salt rats, AngII may not be required for this effect. Of note, endothelin plays a major role in DOCA-salt hypertension⁵¹⁸ and has been shown to induce PTHrP expression in vascular smooth muscle cells.¹²¹

Concerning the renal vascular specific downregulation of PTH1-R expression, it is interesting to point out that AngII concentration in renal cortex is high when compared with aorta or heart.⁴⁸⁷ Renal interstitial infiltration with AngII positive immune cells has been reported in SHR⁵²³ as well as hyperresponsiveness to the peptide. Thus, we suggest that the *in vivo* specificity of the dysregulation of PTH1-R in SHR mainly depends on the renal AngII-enriched micro-environment. Accordingly, the blockade of AT1 receptors was recently found to partially reverse PTH1-R downregulation in SHR (Sandra Welsch, personal results). The molecular mechanisms responsible for AngII-dependent downregulation of PTH1-R remains however an open question which clearly requires additional studies.

Perspectives

The renal vasodilatation induced by PTHrP is impaired when PTH1-R expression is decreased in mature SHR and this effect contributes to the high renal vascular resistance in this model of hypertension.⁸ Our present data now show that the PTH1-R downregulation is not a primary defect in SHR but sets up during the development of hypertension and is specific for the intrarenal arteries. Moreover, AngII rather than hypertension most likely

contributes to this dysregulation. This may explain why downregulation of PTH1-R is actually observed in renal damage associated with an activation of the renin-angiotensin system.^{347,366} The vasodilator effects of the peptide are presumably dampened in these settings. PTHrP may then essentially act as a mitogenic factor by the intracrine pathway,^{1,339,519} rather than a regulator of local hemodynamics.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the French National Institute of Health (INSERM), the Louis Pasteur University of Strasbourg, and the French Ministry of Higher Education. S.W. was supported by a fellowship from INSERM and the Alsace Region. M.B. is a Research Director in the French National Center for Scientific Research (C.N.R.S.). The authors are grateful to Mrs. Danièle Kuhlwein for secretarial assistance.

References

Les numéros correspondent aux références indiquées en fin de thèse.

Renal and Mesenteric *in vitro* and *in vivo* Baseline Parameters in Young and Mature SHR,

WKY and Wistar Rats

<i>In vitro</i>	Perfusion flow (mL/min)	Vascular resistance (mmHg.min/mL)	Phenylephrine concentration (μ mol/L)
<i>Isolated perfused kidney</i>			<i>4-week-old rats</i>
WKY (4)	7.6 \pm 0.60	10.0 \pm 0.5	1.55 \pm 0.20
SHR (4)	5.6 \pm 0.51 [#]	13.6 \pm 1.2 [#]	0.92 \pm 0.26
<i>Isolated perfused kidney</i>			<i>12-week-old rats</i>
Wistar (7)	14 \pm 1.4	6.0 \pm 0.8	1.27 \pm 0.12
WKY (6)	16 \pm 1.5	5.0 \pm 0.5	0.25 \pm 0.04 *
SHR (7)	8.2 \pm 0.9 * [#]	11.1 \pm 1.3 * [#]	0.84 \pm 0.10 * [#]
Sham (8)	14.4 \pm 0.9	5.7 \pm 0.3	0.75 \pm 0.06
DOCA (7)	11 \pm 0.7 *	7.2 \pm 0.5 *	0.50 \pm 0.05 *
<i>Isolated perfused mesenteric vascular bed</i>			<i>12-week-old rats</i>
Wistar (6)	60.2 \pm 1.7	1.3 \pm 0.1	2.08 \pm 0.43
SHR (6)	25.7 \pm 3.6 *	3.5 \pm 0.6 *	2.85 \pm 0.68
<i>In vivo</i>	Blood flow (mL/min)	Vascular resistance (mmHg.min/mL)	Mean blood pressure (mmHg)
<i>Renal hemodynamics</i>			<i>12-week-old rats</i>
Wistar (7)	8.7 \pm 0.7	15.2 \pm 1.1	129 \pm 5
WKY (7)	6.7 \pm 0.6 *	19.6 \pm 1.5	125 \pm 3
SHR (8)	4.9 \pm 0.5 * [#]	39.6 \pm 3.9 * [#]	184 \pm 3 * [#]
<i>Mesenteric hemodynamics</i>			<i>12-week-old rats</i>
Wistar (5)	18.2 \pm 3.0	8.0 \pm 1.5	128 \pm 8
SHR (5)	13.7 \pm 1.2	13.1 \pm 0.7 *	158 \pm 7 *

Mean pressure peaks of 36 \pm 2 (8) and 53 \pm 1 mm Hg (47) were induced by phenylephrine in young and mature rats, respectively. Data are mean \pm SEM for the number (N) of experiments. * $P < 0.05$ vs Wistar or sham; [#] $P < 0.05$ vs WKY.

Legends

Figure 1. *In vitro* and *in vivo* renal and mesenteric vasodilatation elicited by PTHrP(1-36) in 12-week-old SHR, WKY and Wistar rats. *In vitro* relaxation was obtained in the isolated perfused kidney or mesenteric vascular bed (A) and expressed as % decrease in phenylephrine-induced vasoconstriction. Vasodilatation was evaluated *in vivo* in the renal or mesenteric circulation (B) of anesthetized rats and expressed as % variation in basal vascular resistance. * $P < 0.05$ vs Wistar, # $P < 0.05$ vs WKY.

Figure 2. Semi-quantitative RT-PCR (A) and Western blot (B) analysis for PTH1-R mRNA and protein expression in tissues from 12-week-old SHR and Wistar rats. GAPDH was used as the housekeeping gene to normalize PTH1-R expression. Representative ethidium bromide-stained agarose gels and immunoblots are shown. Densitometric analysis of the bands was set at 1 for Wistar rats. * $P < 0.001$.

Figure 3. Renal vasoreactivity to PTHrP(1-36) and PTH1-R expression in intrarenal arteries from 4-week-old SHR, WKY and Wistar rats. *In vitro* vasodilatation of PTHrP(1-36) was assessed in the isolated kidney (A). Semi-quantitative RT-PCR (B) and Western blot (C) analysis for PTH1-R expression was performed in intrarenal arteries. Densitometric analysis of the bands was set at 1 for WKY (B) or Wistar rats (C). * $P < 0.05$.

Figure 4. Effects of DOCA-salt hypertension (A) on the *in vitro* renal vasoreactivity to PTHrP(1-36) (B) and PTH1-R protein expression by Western blot analysis (C). Densitometric analysis was set at 1 for sham rats. * $P < 0.05$.

Figure 5. Semi-quantitative RT-PCR analysis for PTHrP mRNA expression in arteries from 12-week-old SHR and Wistar rats (A), or DOCA-salt and sham rats (B). GAPDH was used as the housekeeping gene to normalize PTH1-R mRNA expression. Densitometric analysis was set at 1 for Wistar or sham rats. * $P < 0.05$.

Figure 1.

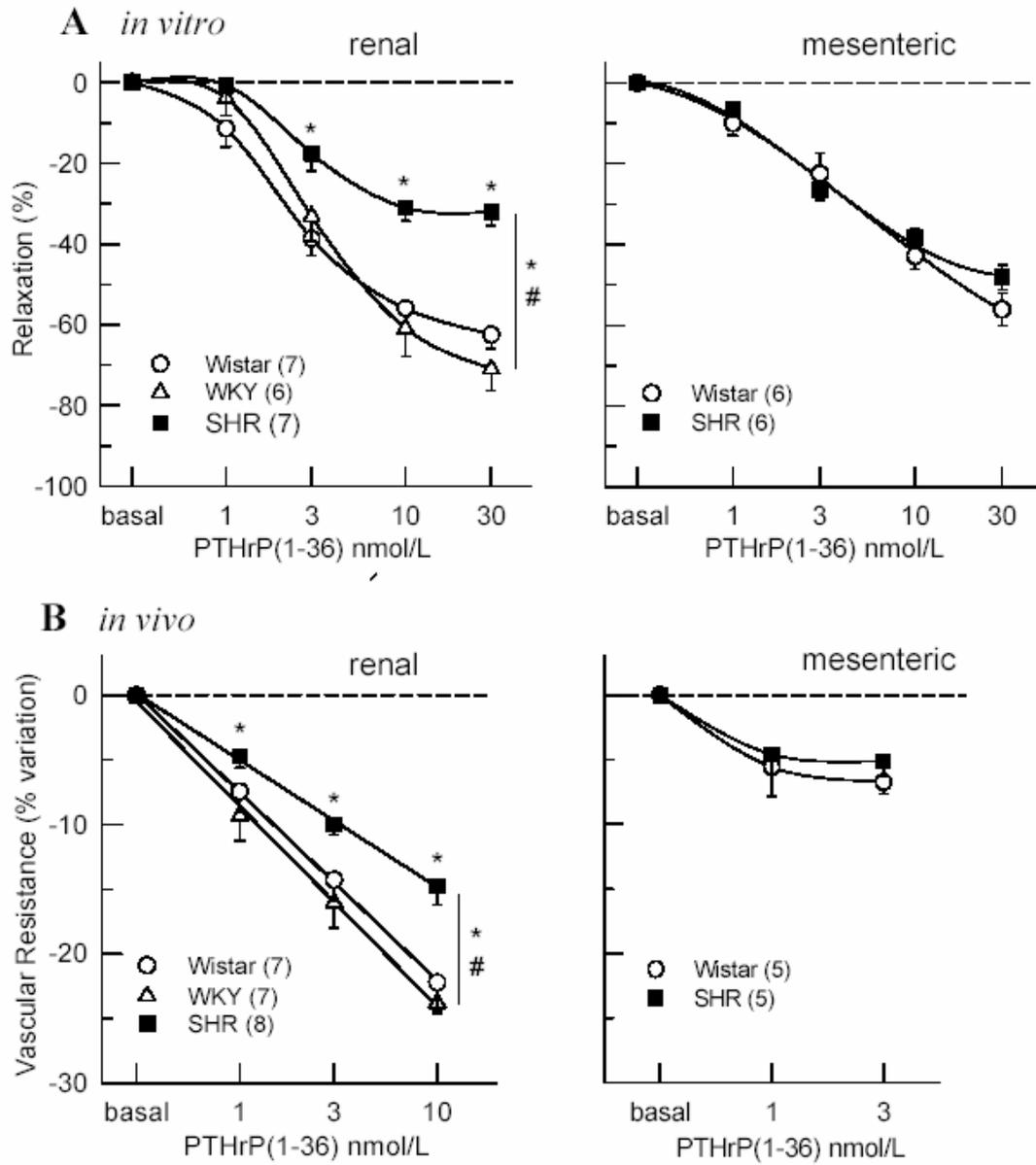


Figure 2.

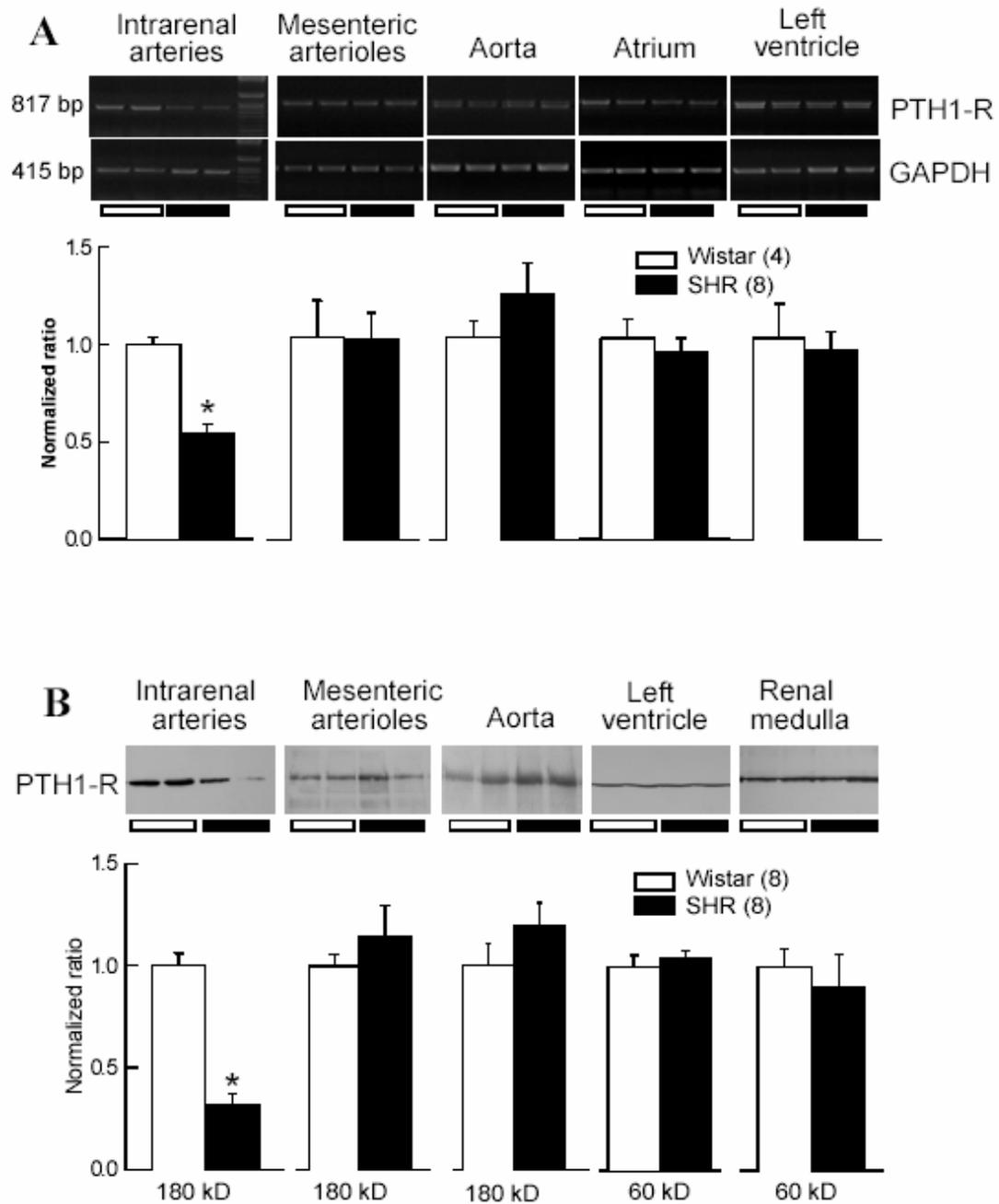


Figure 3.

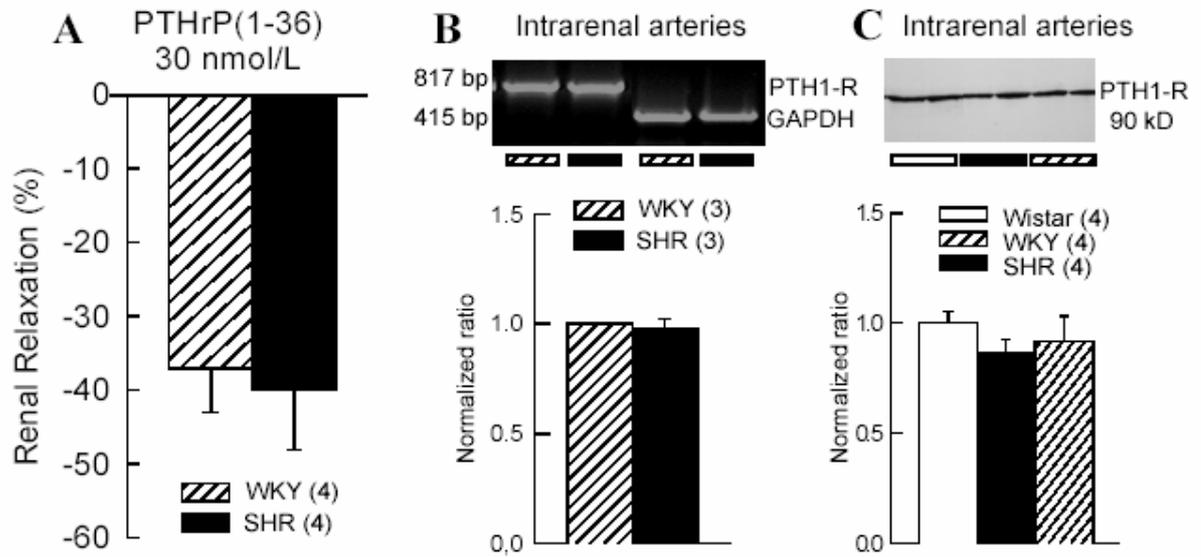


Figure 4.

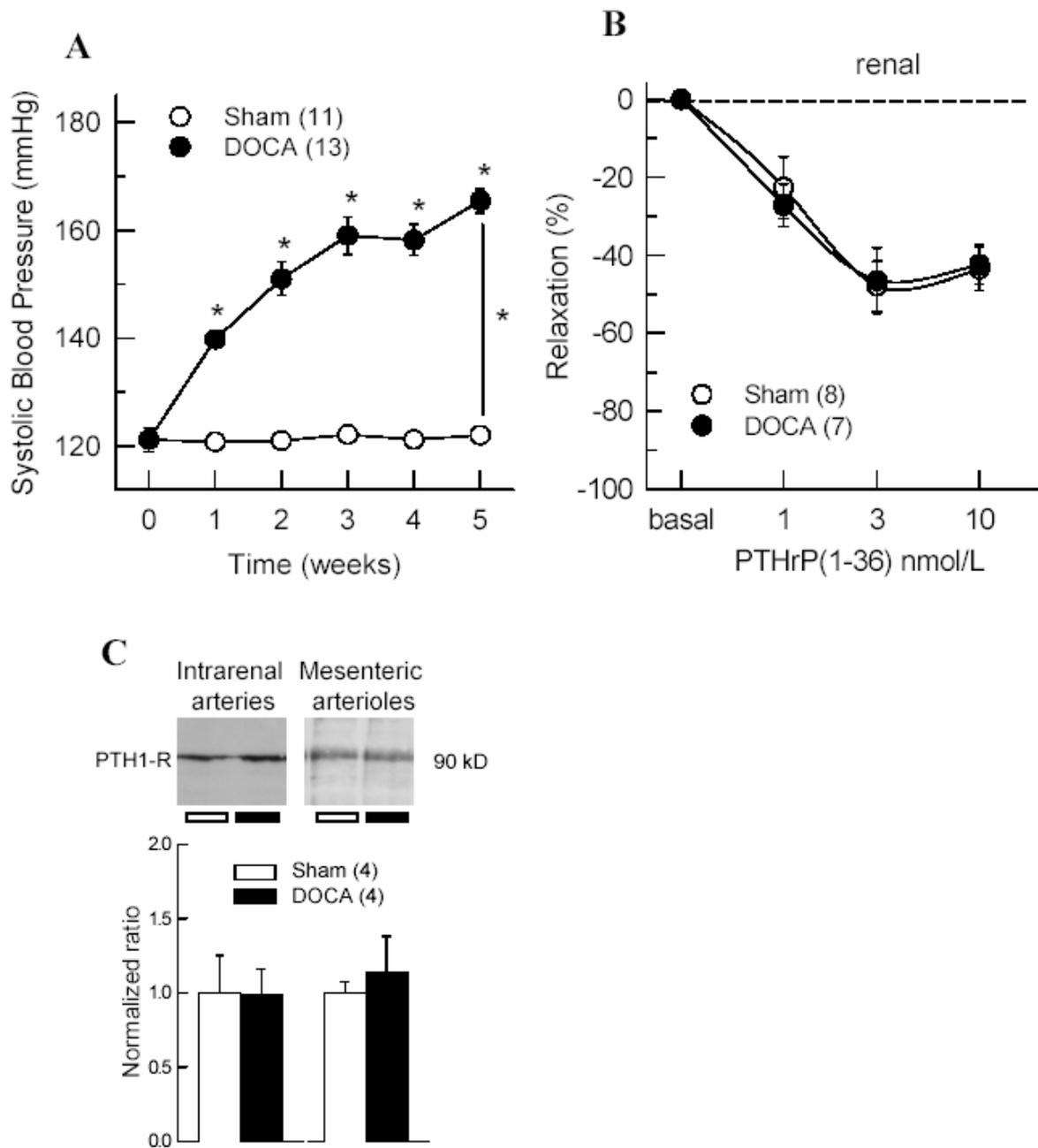
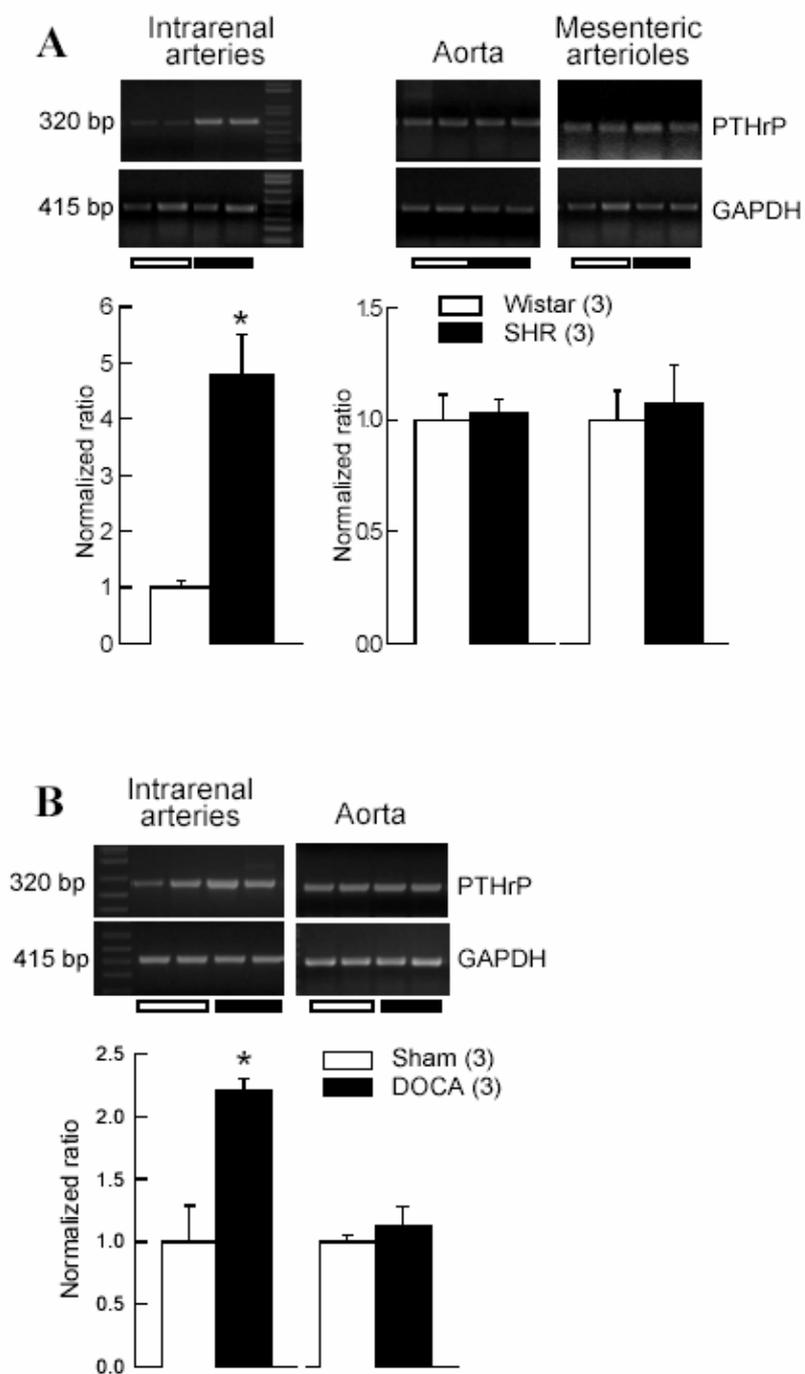


Figure 5.



CHAPITRE IV

La dérégulation du R-PTH1 : apport des expérimentations
in vitro

**Mécanismes d'action de l'Ang II
dans la dérégulation du R-PTH1**

INTRODUCTION

Comme nous l'avons rappelé dans la partie bibliographique, il existe un lien étroit entre le système PTHrP/R-PTH1 et le SRA. D'une part, la PTHrP est un facteur stimulant la libération de rénine sur le rein isolé perfusé ou sur une préparation enrichie en cellules juxtaglomérulaires^{356,357}. La PTHrP endogène semble faire de même, du moins chez le SHR où l'administration *in vivo* de l'ADNc codant pour le hR-PTH1 majore l'ARP. D'autre part, l'Ang II est connue comme induisant une surexpression de la PTHrP au niveau des CMLAo par une double action, en augmentation à la fois la transcription de son gène et la stabilité de son ARNm^{121,124,315}. L'Ang II diminue par ailleurs l'expression du R-PTH1 spécifiquement par la voie de la PKC sur les CMLV²⁶⁴. Dans cette étude, la PTHrP exogène activant la voie de la PKA était incapable d'altérer l'expression du R-PTH1 sur les CMLAo, suggérant que la surexpression de la PTHrP n'était pas impliquée dans la régulation de l'expression du R-PTH1 en réponse à l'Ang II. En contradiction cependant avec ces résultats *in vitro*, Lorenzo³⁴⁹ a rapporté plus récemment une surexpression du R-PTH1 dans l'aorte et les artérols rénales, après la perfusion *in vivo* de faibles doses d'Ang II peu hypertensives pendant quelques jours. Les raisons de ces différences dans les effets de l'Ang II sur la régulation de l'expression vasculaire du R-PTH1 ne sont actuellement pas connues, de même que les mécanismes moléculaires mis en jeu. En particulier, on peut s'interroger sur la signification et le rôle de la surexpression de la PTHrP qui est le plus souvent observée en parallèle à la diminution de l'expression du R-PTH1. Il en est ainsi au niveau des artères intra-rénales chez le SHR⁸, mais aussi dans diverses pathologies rénales^{346,347,359,366} ou vasculaires^{338,370,371,373} où l'Ang II est directement impliquée. L'analyse des mécanismes de régulation du R-PTH1 par l'Ang II présente ainsi un intérêt beaucoup plus général pour la compréhension des pathologies vasculaires, au-delà du strict domaine des altérations vasculaires au cours de l'HTA que nous avons analysé dans la première partie de ce travail.

Les questions spécifiques que nous nous sommes posées sont multiples :

- Tout d'abord, nous avons vérifié *in vitro* que la régulation de l'expression du R-PTH1 par l'Ang II était un processus général sur les CMLV, que ces cellules soient d'origine rénovasculaire ou aortique ;
- Nous avons ensuite évalué si Ang II exerce ses effets de régulation sur l'expression du R-PTH1 à un niveau transcriptionnel ou post-transcriptionnel ;
- Puisque la PTHrP est généralement surexprimée au niveau vasculaire dans les situations où l'expression du R-PTH1 est abaissée, nous nous sommes posés la question d'une participation de la PTHrP elle-même dans cette dérégulation. Un effet par la voie paracrine/autocrine était cependant peu probable puisque la PTHrP exogène avait été incapable de modifier l'expression du R-PTH1 sur des CMLAo en culture²⁶⁴. Une contribution de la PTHrP par la voie intracrine n'avait par contre jamais été explorée. La mise en culture au laboratoire de CMLRv à partir de souris floxées sur le gène de la PTHrP³²⁵ et leur transfection par la Cre-recombinase puis par des constructions plasmidiques comportant des cDNA de la PTHrP tronquée, nous fournissaient des outils puissants pour explorer la contribution de la PTHrP endogène dans la régulation du R-PTH1 vasculaire.
- Puisque l'étirement des CMLV conduit aussi à une dérégulation du R-PTH1⁵¹⁹, nous avons recherché si cet effet passait aussi par l'Ang II.

- Enfin, afin de vérifier si les résultats obtenus ci-dessus avaient une pertinence physiopathologique, nous avons analysé la régulation du R-PTH1 sur des CMLRv provenant de SHR, à la fois dans les conditions basales de culture et en réponse à l'Ang II.

RESULTATS

L'Ang II, via l'activation du récepteur AT1, diminue l'expression du R-PTH1 sur les CMLRv et les CMLAo

Nos résultats montrent que l'expression du R-PTH1 sur les CMLV provenant de rats Wistar (rCMLRv et rCMLAo) est considérablement diminuée lorsque ces cellules sont exposées à l'Ang II (**figures IV-1**). Il en est ainsi lorsqu'on considère cette expression en terme d'ARNm (**figures IV-1A et 1B**). La diminution induite par l'Ang II à une concentration de 100 nM est alors rapide (dès la 4^{ème} heure d'exposition des cellules à l'Ang II) et atteint plus de 50% après 8 heures. Elle est présente de manière équivalente à la fois sur les rCMLRv et les rCMLAo (**figure IV-1B**). Réversible par le losartan, elle met en jeu une activation des récepteurs AT1 par l'Ang II. Le losartan est par contre dépourvu d'effet propre sur l'expression du R-PTH1 sur ces rCMLRv provenant de rats Wistar. Les analyses en Western blot de l'expression de la protéine réceptrice confirment cette dérégulation du R-PTH1 par l'Ang II sur les rCMLRv (**figure IV-1C**). Elle est présente dès la 24^{ème} heure après l'exposition des cellules à l'Ang II et la réduction persiste au cours des jours suivants. L'anticorps anti-R-PTH1 reconnaît une bande de 90 kD, en accord avec le poids moléculaire du récepteur glycosylé. Là encore, la réponse à l'Ang II passe par l'activation des récepteurs AT1 puisqu'elle est pratiquement abolie par le losartan.

Nous avons vérifié, dans nos conditions expérimentales, que l'Ang II majorait bien l'expression de la PTHrP sur les CMLV. Nous observons en effet une augmentation de près de trois fois de l'expression de l'ARNm de la PTHrP lorsque les rCMLRv sont exposées à 100 nM d'Ang II pendant 4 heures, et cet effet passe là encore par l'activation des récepteurs AT1 (**figure IV-1D**). Ce résultat montre que les rCMLRv répondent *in vitro* à l'Ang II par une surexpression de la PTHrP comme cela a été largement décrit par ailleurs sur les rCMLAo par différentes équipes^{121,124,315}. Nous avons choisi d'évaluer l'expression de la PTHrP par RT-PCR dans notre étude puisque ceci reflète probablement la totalité de la PTHrP active ultérieurement par la voie paracrine/autocrine et la voie intracrine. Le dosage de la PTHrP dans le milieu de culture des CMLV n'est d'ailleurs pas utilisable puisque les taux de PTHrP (2-6 pmol/L) sont généralement proches de la limite de détection par un dosage radioimmunologique³⁵⁰.

Globalement, ces résultats montrent que les rCMLRv provenant de rats Wistar répondent *in vitro* de manière identique aux rCMLAo lorsqu'elles sont exposées aux mêmes concentrations d'Ang II. Ils témoignent du fait que la dérégulation du système PTHrP/R-PTH1 par l'Ang II est probablement une caractéristique générale des vaisseaux, à condition que ceux-ci soient exposés à une concentration locale suffisante en Ang II.

L'Ang II n'affecte pas l'activité des promoteurs P1 et P2 contrôlant la transcription du gène du R-PTH1 mais diminue la stabilité de son ARNm

Les effets de l'Ang II en aval de l'activation du R-AT1 sont multiples et impliquent de nombreuses voies de signalisation tels que la stimulation des PLC, PKC, tyrosine kinase et même la stimulation transcriptionnelle de gènes⁵²⁴. La transcription du gène du R-PTH1 est sous le contrôle de deux promoteurs P1 et P2²⁰⁸, P1 étant spécifiquement actif dans le rein et P2 ayant une distribution ubiquitaire. La transfection des rCMLRv par des constructions comportant le promoteur P1 ou P2 en amont du gène de la luciférase dépourvu de son propre promoteur, nous a permis d'évaluer élégamment les effets de l'Ang II sur l'activité des deux promoteurs, en mesurant l'activité de la luciférase dans nos cellules.

Nos résultats montrent que les deux promoteurs P1 et P2 sont actifs dans les rCMLRv transfectées par les plasmides pXP2/P1-luc ou pXP2/P2-luc lorsque l'activité de la luciférase est comparée à celle de rCMLRv transfectées avec le plasmide nu pXP2 (**figure IV-2A**). L'exposition des cellules à l'Ang II (100 nM) ne modifie cependant pas l'activité des promoteurs, qu'il s'agisse de celle de P1 ou de P2 (**figure IV-2A**). Ceci suggère que l'Ang II ne régule pas l'expression du R-PTH1 au niveau de la transcription de son gène.

Alternativement, une variation dans le taux d'ARNm peut aussi résulter d'une modification de sa stabilité. C'est pourquoi, nous avons recherché si l'Ang II était capable d'altérer la stabilité de l'ARNm du R-PTH1. Pour ce faire, nous avons suivi la décroissance de l'ARNm du R-PTH1 après inhibition de la transcription par l'actinomycine D (5 µg/mL). Dans ces conditions, la décroissance spontanée de l'ARNm du R-PTH1 au cours d'un suivi de 8 heures sur des rCMLRv contrôles était faible (**figure IV-2B**), témoignant d'une $\frac{1}{2}$ vie de cet ARNm de $12,5 \pm 2,6$ heures (moyenne \pm E.S.M., n=6). En présence d'Ang II, la décroissance devenait plus marquée (**figure IV-2B**) et la $\frac{1}{2}$ vie de l'ARNm était diminuée de plus de la moitié ($5,8 \pm 0,2$ heures (n=6)). Ces résultats montrent ainsi que l'Ang II abaisse le taux d'expression de l'ARNm du R-PTH1 en altérant la stabilité de son ARNm et non en modifiant le taux de transcription de son gène. La $\frac{1}{2}$ vie de l'ARNm du R-PTH1 n'a jusqu'à présent pas été rapportée dans la littérature. Elle est bien plus longue que celle de son ligand, la $\frac{1}{2}$ vie de la PTHrP étant de 2,9 heures sur les rCMLRv⁵¹⁹ et de 45 min sur les rCMLAo¹²⁴. Ceci s'explique probablement par l'absence de motifs « AU » à l'extrémité 3' du gène du R-PTH1, contrairement au gène de la PTHrP. Ces motifs sont connus comme étant responsables d'une plus grande l'instabilité des transcrits.

La déstabilisation par l'Ang II de l'ARNm du R-PTH1 dépend de la PTHrP active par voie intracrine

Afin de vérifier si la PTHrP endogène contribue à la déstabilisation de l'ARNm du R-PTH1, nous avons utilisé des CMLRv mises en culture à partir des souris floxées dont l'exon 4 codant pour la majeure partie de la PTHrP a été entouré de séquences loxP (mCMLRv PTHrP^{lox}). Sur ces cellules, la PTHrP a été invalidée par transfection des cultures primaires par le plasmide pBK/Cre codant pour la Cre recombinase. L'efficacité de l'invalidation a été vérifiée en analysant l'expression de l'ARNm de la PTHrP par RT-PCR. Les amorces sens et antisens ont été choisies de sorte à amplifier un fragment par PCR incluant la zone correspondant à l'exon 4 du gène de la PTHrP chez la souris. La diminution de la taille de

ce fragment (de 677 à 266 pb) comme le montre un gel d'agarose (**figure IV-3A**) signe alors l'efficacité de l'excision de l'exon 4 du gène de la PTHrP par la Cre recombinase sur les mCMLRv PTHrP^{lox}/Cre. Sur ces cellules invalidées pour la PTHrP, la diminution de l'expression de l'ARNm du R-PTH1 en réponse à l'Ang II ne s'opérait plus (**figure IV-3B**), alors qu'elle était préservée sur des mCMLRv transfectée avec le plasmide vide pBK. Ceci suggère que la PTHrP soit un élément indispensable au processus de déstabilisation de l'ARNm du R-PTH1 par l'Ang II.

Afin de vérifier si la PTHrP endogène active par voie autocrine/paracrine est impliquée dans la réponse à l'Ang II, nous avons inhibé les R-PTH1 membranaires par la PTHrP(7-34), un antagoniste bien connu de ces récepteurs⁵²⁵. La PTHrP(7-34) cependant n'a modifié ni l'expression basale de l'ARNm du R-PTH1, ni la baisse induite sur les rCMLRv par l'Ang II (**figure IV-4A**). Par ailleurs, sur des mCMLRv PTHrP^{lox}/Cre invalidées pour la PTHrP endogène, l'exposition des cellules à 100 nM de PTHrP(1-36) exogène n'a pas modifié la $\frac{1}{2}$ vie de l'ARNm du R-PTH1 (**figure IV-4B**). Ce résultat est en accord avec l'observation antérieure de Okano²⁶⁴ qui avait montré que la PTHrP exogène ou l'activation de la voie de l'AC/PKA étaient incapables de déréguler l'expression du R-PTH1 vasculaire. Notre étude étend maintenant cette observation à la PTHrP endogène et montre que la PTHrP sécrétée et activant le R-PTH1 membranaire (voie paracrine/autocrine) n'est pas davantage impliquée dans la dérégulation de l'expression du R-PTH1. Il en est ainsi quand l'étude est faite en conditions de culture basales ou après exposition des cellules à l'Ang II, une situation caractérisée par une surexpression de la PTHrP comme nous venons de le voir (**figure IV-1D**). L'ensemble de ces résultats laisse à penser que la PTHrP active par la voie intracrine pourrait être indispensable au processus de déstabilisation de l'ARNm du R-PTH1 par l'Ang II.

La PTHrP contient une séquence de localisation nucléaire (NLS) et un peptide signal (SP) lui permettant soit d'être transportée vers le noyau pour agir de manière intracrine, soit d'être sécrétée et d'exercer son action par la voie autocrine/paracrine. Afin de vérifier si c'est bien la PTHrP active par la voie intracrine qui est essentielle à l'effet de l'Ang II, nous avons retransfecté les mCMLRv PTHrP^{lox}/Cre invalidées pour la PTHrP endogène avec une construction codant soit pour la PTHrP délétée en séquence NLS (Δ NLS-PTHrP), soit pour la PTHrP délétée en séquence SP (Δ SP-PTHrP). Ces deux constructions restaurent respectivement une PTHrP cytoplasmique et sécrétée (Δ NLS-PTHrP), ou une PTHrP ciblée vers le noyau (Δ SP-PTHrP)⁹⁵. Nos résultats montrent que la dérégulation de l'expression de l'ARNm du R-PTH1 par l'Ang II est spécifiquement rétablie après restauration de la voie intracrine par transfection avec la construction Δ SP-PTHrP (**figure IV-5A**). Cette transfection restaure de même la déstabilisation de l'ARNm du R-PTH1 par l'Ang II (**figure IV-5B**). La transfection avec la construction Δ NLS-PTHrP, qui restaure spécifiquement la voie auto/paracrine, est par contre incapable de rétablir la réponse à l'Ang II sur les mCMLRv PTHrP^{lox}/Cre invalidées pour la PTHrP endogène (**figure IV-5A**).

Globalement ces résultats montrent que la PTHrP active par la voie intracrine est indispensable pour que l'Ang II puisse exercer son effet de déstabilisation de l'ARNm du R-PTH1. La déstabilisation des ARNm est généralement liée à la présence à l'extrémité 3' de suites répétées d'éléments riches en nucléotides AU. Cependant, contrairement à l'ARNm de la PTHrP, le transcrite du R-PTH1 ne présente pas de motifs AUUUA ou des séquences riches en AU. Par conséquent, nous pouvons émettre l'hypothèse que l'ARNm du R-PTH1 soit déstabilisé par clivages endonucléotiques, une autre voie

importante de dégradation des ARNm⁵²⁶. La nature exacte des facteurs intervenants dans ce processus demeure actuellement inconnue. Leur identification nécessitera des expériences supplémentaires.

La dérégulation du R-PTH1 par l'étirement mécanique des CMLRv met en jeu l'Ang II

Lorsque les CMLRv de rats Wistar sont soumises à un étirement mécanique équi-axial de 10% d'amplitude à une fréquence de 1 Hz, l'expression du R-PTH1 est très abaissée, que cette expression soit évaluée en terme de protéine par Western blot (**figure IV-6A**) ou en terme d'ARNm par RT-PCR (**figure IV-6B**). La même dérégulation du R-PTH1 est observée sur des CMLAo de rat Wistar lorsqu'elles sont soumises au même étirement mécanique (**figure IV-6B**). Cet effet du stretch mécanique sur l'expression du R-PTH1 dans les CMLRv ou les CMLAo est complètement réversible en présence de losartan (1 μ M) bloquant les récepteurs AT1 (**figures IV-6B**). Ce résultat montre que l'application d'un étirement mécanique aux CMLV en culture dérégule le R-PTH1 probablement en majorant l'Ang II endogène. L'expression des diverses composantes du SRA n'a pas été analysée dans notre étude sous l'effet du stretch dans les CMLRv ou Ao. Sur les cardiomyocytes cependant, Leri⁵²⁷ a montré que le stretch majore l'ARNm de l'AGT et la concentration d'Ang II dans le milieu de culture dès la première heure, puis surexprime le récepteur AT1 après la 8^{ème} heure. Ces mécanismes sont probablement à l'œuvre de la même manière dans les CMLV stretchées où de nombreuses réponses au stretch sont inhibées par un antagoniste des récepteurs AT1 ou un inhibiteur de l'ACE, qu'il s'agisse de la surexpression du TGF β induisant la synthèse de collagène de type 1 et de fibronectine^{528,529}, ou de la surexpression de PDGF⁵³⁰.

Comme le stretch induit parallèlement sur nos cellules une surexpression de la PTHrP⁵¹⁹, il est possible que la PTHrP intracrine contribue ou soit indispensable à cette réponse. Ce point n'a pas été spécifiquement abordé dans cette étude puisque nous n'avons pas réalisé de stretch sur les CMLRv ou les CMLAo de souris transfectées comme nous venons de le décrire ci-dessus.

L'ARNm du R-PTH1 est déstabilisé sur des CMLRv provenant de SHR

Nous avons montré dans la première partie de cette thèse que le R-PTH1 était dérégulé dans les artères rénales chez le SHR *in vivo*, et que cette dérégulation était probablement liée à l'Ang II. Afin de préciser la nature de la dérégulation du R-PTH1 dans cette situation pathologique, nous avons réexaminé ce problème sur des CMLRv en culture primaire, provenant d'artères intra-rénales de SHR adultes.

Nous avons été surpris de constater que l'addition d'Ang II à des CMLRv de SHR ne modifie plus l'expression du R-PTH1, que ce soit en terme de protéine ou d'ARNm (**figures IV-7A et 7B**). Garcia et coll.⁵⁰⁵ avaient d'ailleurs déjà fait la même observation sur des CMLAo de SHR en culture, en cherchant à y analyser l'induction de l'expression de la PTHrP par l'Ang II. Cette absence de réponse à l'Ang II n'était alors pas liée à une altération de l'expression des récepteurs AT1⁵⁰⁵, comme le suggère aussi notre résultat comparant l'expression des ARNm du récepteur AT1 entre les CMLRv de rats Wistar et SHR (**figure IV-7C**).

Les dérégulations du système PTHrP/R-PTH1 que nous avons décrites précédemment *in vivo*, se retrouvent *in vitro* lorsque nous comparons les CMLRv provenant de SHR et de rats Wistar. Il en est ainsi pour la baisse de l'expression du R-PTH1 (ARNm) et pour la majoration de l'expression de la PTHrP (ARNm) (**figures IV-8A et 8B**). En cohérence avec ces résultats, nous montrons par ailleurs que la

stabilité de l'ARNm du R-PTH1 est abaissée dans les CMLRv de SHR en condition de culture basale, la $\frac{1}{2}$ vie de l'ARNm du R-PTH1 étant alors de $4,8 \pm 0,6$ heures (**figure IV-8C**), c'est-à-dire proche de celle observée en présence d'Ang II sur les CMLRv de Wistar (**figure IV-2B**). L'Ang II s'avère d'ailleurs incapable de déstabiliser davantage l'ARNm du R-PTH1 (**figure IV-8C**). Les modifications observées sur les CMLRv de SHR quant au système PTHrP/R-PTH1 (\searrow R-PTH1 avec déstabilisation de son ARNm, \nearrow PTHrP) sont réversibles par le losartan (**figures IV-8A, 8B et 8C**), suggérant que l'Ang II endogène, *via* l'activation des récepteurs AT1, soit directement responsable du profil observé. Un antagoniste du R-PTH1 par contre, la PTHrP(7-34), est incapable de restaurer une expression normale du R-PTH1 sur les CMLRv de SHR (**figures IV-8A**). Ce résultat démontre que, sur ces cellules qui surexpriment la PTHrP, celle-ci, du moins par la voie auto/paracrine, ne participe pas à la dérégulation du R-PTH1.

Ainsi, l'ensemble de ces résultats montre que les altérations du système PTHrP/R-PTH1 sur les CMLRv du SHR sont en tout point identiques à celles induites par l'Ang II sur des CMLRv de Wistar. Tout se passe comme si le SRA était stimulé sur les CMLRv de SHR en culture. La surexpression de l'ARNm de la rénine que nous trouvons dans les CMLRv du SHR va dans ce sens (**figure IV-8D**). Les données de la littérature confortent aussi cette hypothèse. En effet, les CMLAo provenant de SHR surexpriment l'ARNm de l'AGT, de la cathepsine D (une aspartylprotéase capable de convertir l'AGT en Ang I) et de l'ACE⁵³¹. L'ARNm de la rénine n'avait pas pu être détectée dans cette étude. Les taux d'Ang II dans le milieu de culture sont alors majorés d'un facteur 6⁵³². Comme dans notre étude, l'inhibition des récepteurs AT1 corrige alors l'expression anormalement élevée de divers facteurs de croissance, bFGF, TGF β et PDGF.

La déstabilisation de l'ARNm du R-PTH1 par l'Ang II dans les CMLV du SHR que nous démontrons dans notre étude, conduit probablement à favoriser les effets intracrines de la PTHrP qui est surexprimée dans ces mêmes cellules. Thierry Massfelder a montré précédemment que la PTHrP exerce des effets sur la prolifération des CMLV du SHR inverses de ceux qu'elle exerce sur celles du Wistar³⁵⁰. En particulier, par la voie intracrine, elle diminue la prolifération des CMLV du SHR qui est particulièrement élevée. Elle pourrait ainsi avoir un effet bénéfique dans l'HTA en ralentissant le remodelage vasculaire.

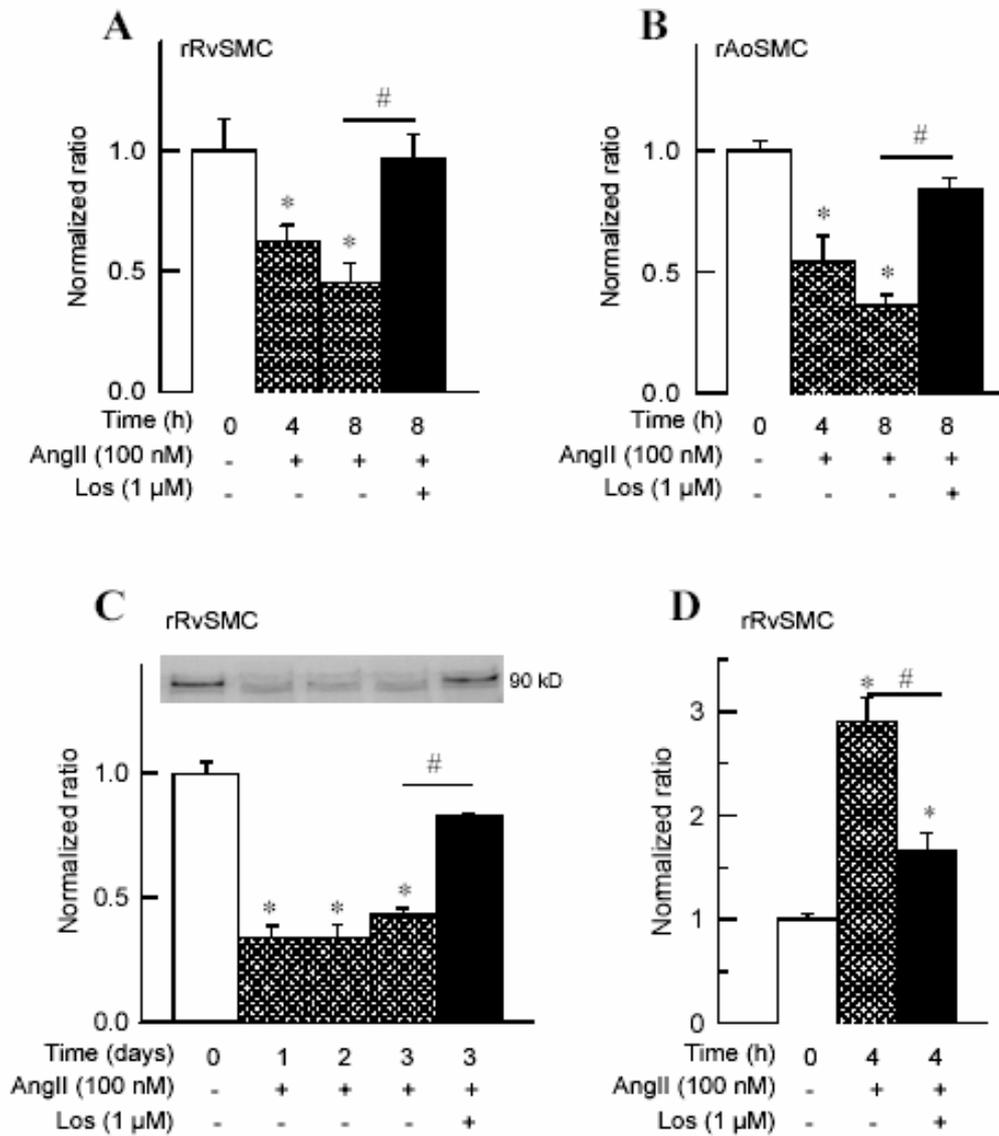


Figure IV -1: Effets de l'Ang II et du losartan sur l'expression de l'ARNm du R-PTH1 sur des rCMLRv (A) et les rCMLAo (B) par RT-PCR quantitative sur l'expression de la protéine du R-PTH1 de CMLRv par Western blot (C) et sur l'expression de l'ARNm de la PTHrP par RT-PCR quantitative (D). Les résultats ont été normalisés par rapport à l'expression de la rGAPDH.
 * $P < 0,05$ vs temps 0; # $P < 0,05$.

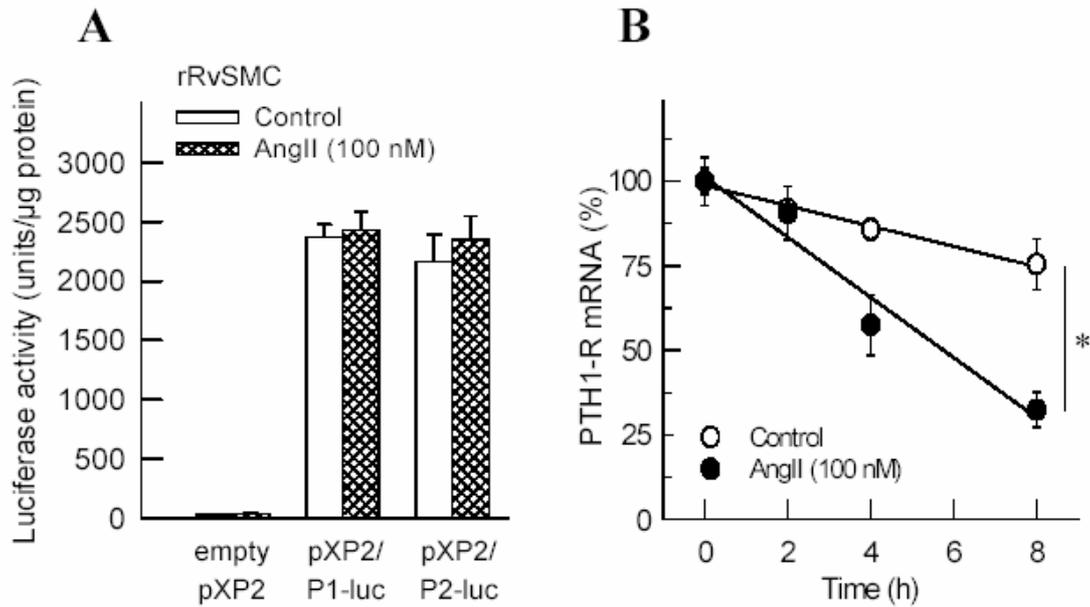


Figure IV-2 : Effet de l'Ang II sur l'activité transcriptionnelle (A) et post-transcriptionnelle (B) du R-PTH1. (A) Activité de la luciférase dans des CMLRv transfectées par les constructions pXP2/P1-luc et pXP2/P2-luc. L'activité de la luciférase a été mesurée dans des conditions basales et après 48 h d'exposition à l'Ang II. (B) Analyse de la stabilité de l'ARNm du R-PTH1 en présence d'actinomycine D, par RT-PCR quantitative dans des CMLRv en présence ou en absence d'Ang II. * $P < 0,05$.

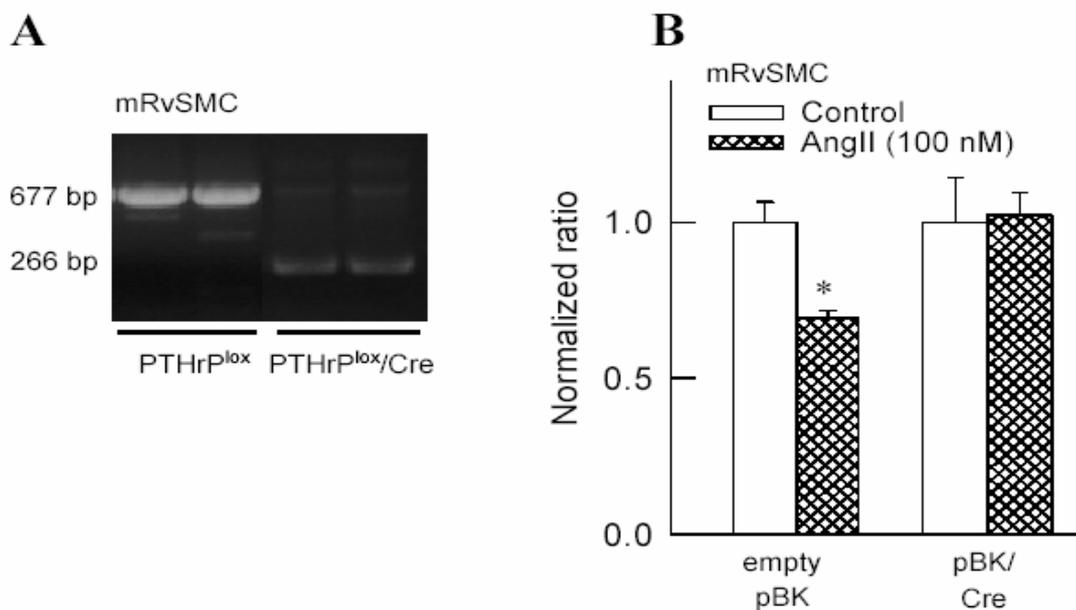


Figure IV-3 : Effet de l'Ang II sur des cellules excisées en PTHrP. (A) Exemple de gel d'agarose coloré au bromure d'éthidium montrant l'expression de l'ARNm de la PTHrP sur des CMLRv isolées à partir de souris floxées pour l'exon 4 de la PTHrP, avant et après transfection avec le vecteur contenant l'ADNc de la Cre-recombinase. (B) Effet de l'Ang II sur l'expression de l'ARNm du R-PTH1 par RT-PCR quantitative sur des CMLRv de souris invalidées ou non pour la PTHrP. * $P < 0,05$.

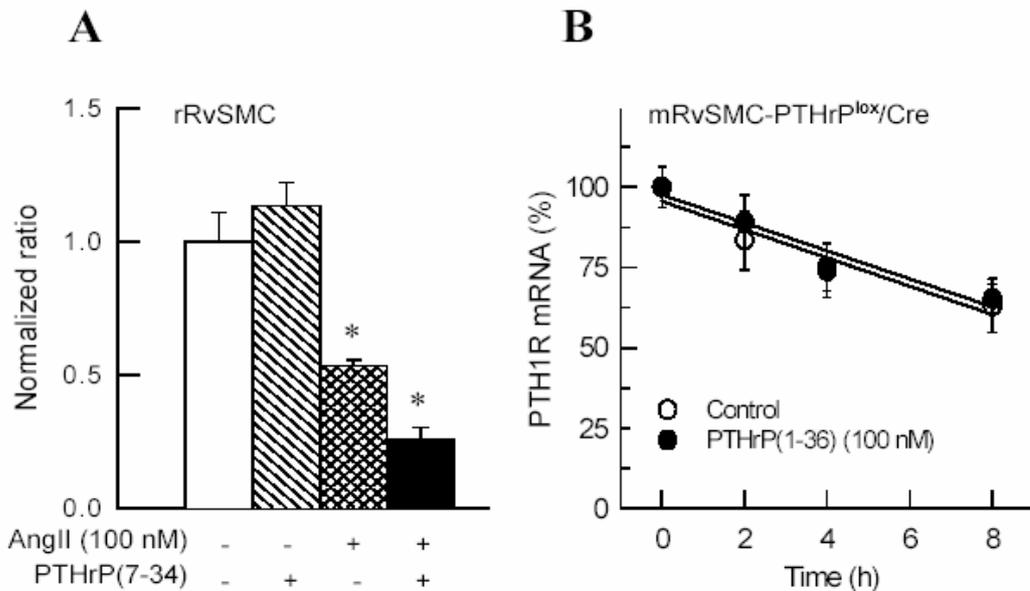


Figure IV-4 : Effet de la PTHrP exogène sur l'expression du R-PTH1. (A) Effet de l'Ang II sur l'expression de l'ARNm du R-PTH1 dans des CMLRv mesurée par RT-PCR quantitative, en présence de PTHrP(7-34) à 10 nM. (B) Effet de la PTHrP(1-36) exogène sur la stabilité de l'ARNm du R-PTH1 en présence d'actinomycine D, mesurée par RT-PCR quantitative sur des CMLRV de souris dépourvues en PTHrP endogène. * $P < 0,05$.

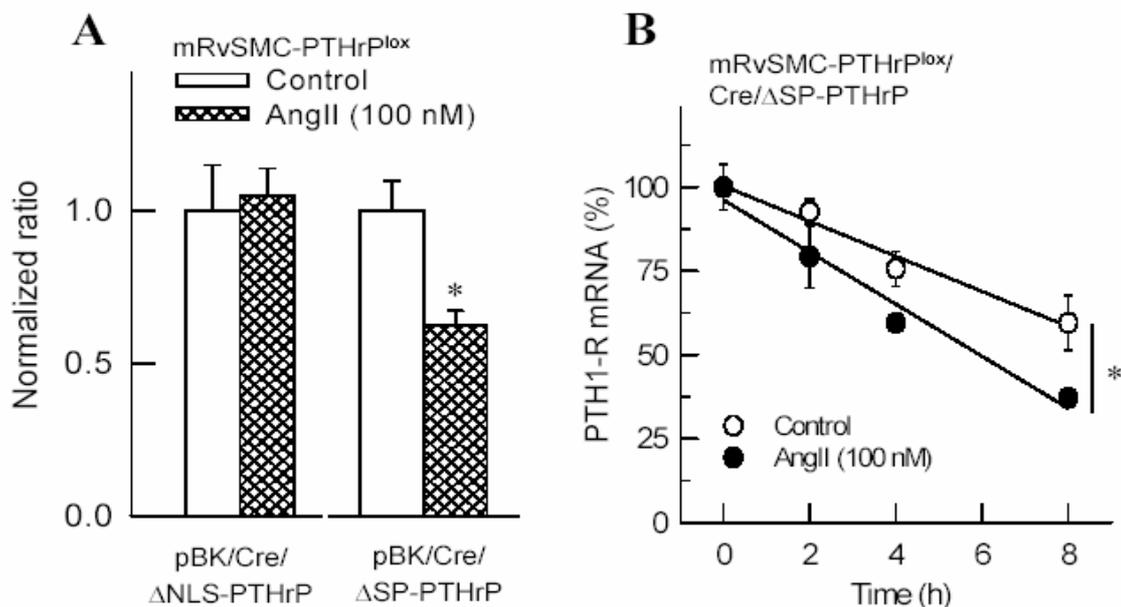


Figure IV-5 : Implication de la PTHrP intracrine et cytoplasmique dans la dérégulation de l'expression du R-PTH1 en réponse à l'Ang II. (A) Effet de l'Ang II sur l'expression de l'ARNm du R-PTH1 mesuré par RT-PCR quantitative sur des CMLRv-PTHrP^{lox}/Cre dépourvues de PTHrP endogène et retransfectées avec la PTHrP-ΔNLS ou ΔSP. (B) Effet de l'Ang II sur la stabilité de l'ARNm du R-PTH1 par RT-PCR quantitative sur des CMLRv-PTHrP^{lox}/Cre dépourvues de PTHrP endogène et retransfectées avec la PTHrP- ΔSP. * $P < 0,05$.

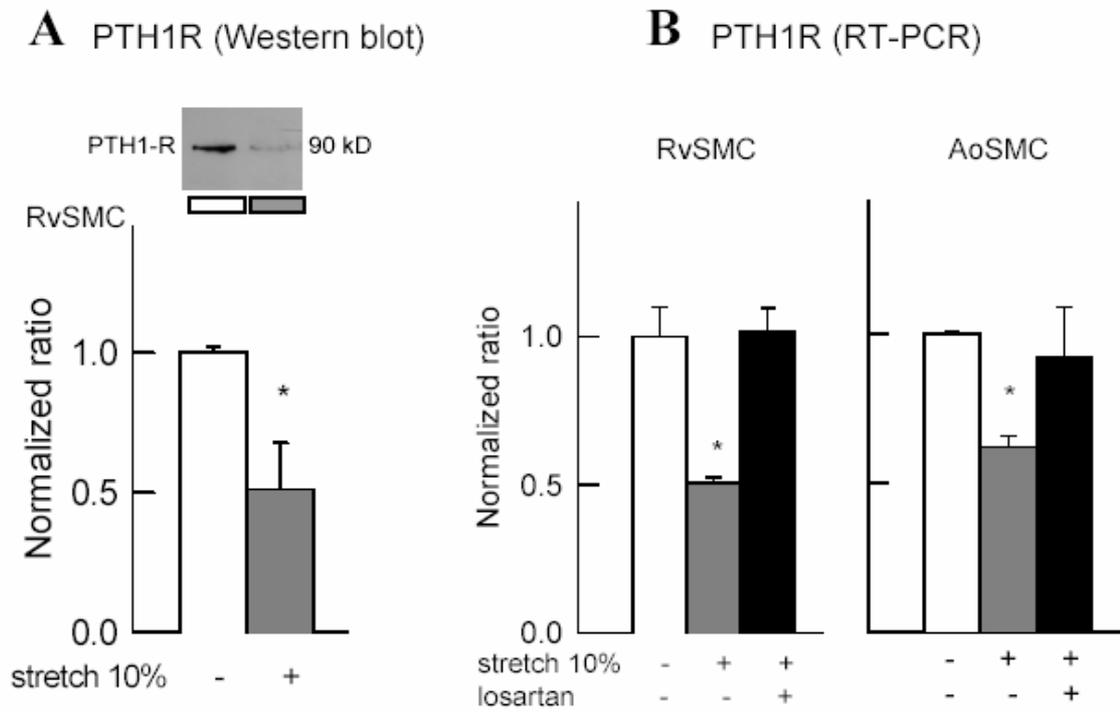


Figure IV-6 : Effet du stretch mécanique sur l'expression du R-PTH1. (A) Mesure de l'expression du R-PTH1 par Western blot en réponse à un étirement mécanique de 10 %. (B) Effet du losartan sur l'expression de l'ARNm du R-PTH1 sur les CMLRv et CMLAo soumises à un étirement mécanique, mesurée par RT-PCR quantitative. * $P < 0,05$.

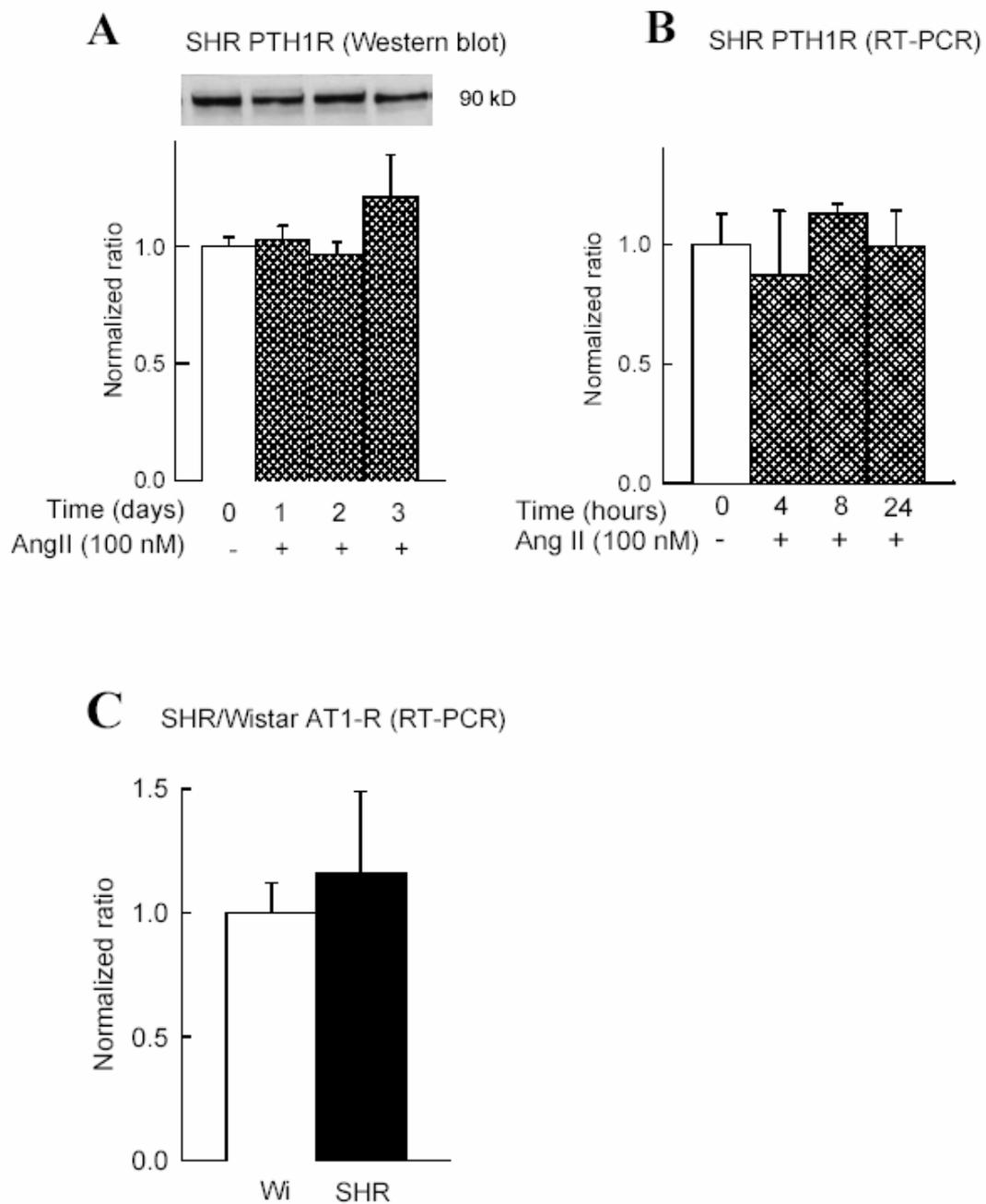


Figure IV-7 : Effet de l'Ang II sur l'expression du R-PTH1 sur des CMLRv de SHR. (A) Effet de l'Ang II sur l'expression du R-PTH1 par Western blot et (B) sur l'expression de son ARNm par RT-PCR quantitative. (C) Mesure de l'expression de l'ARNm du R-AT1 par RT-PCR quantitative.

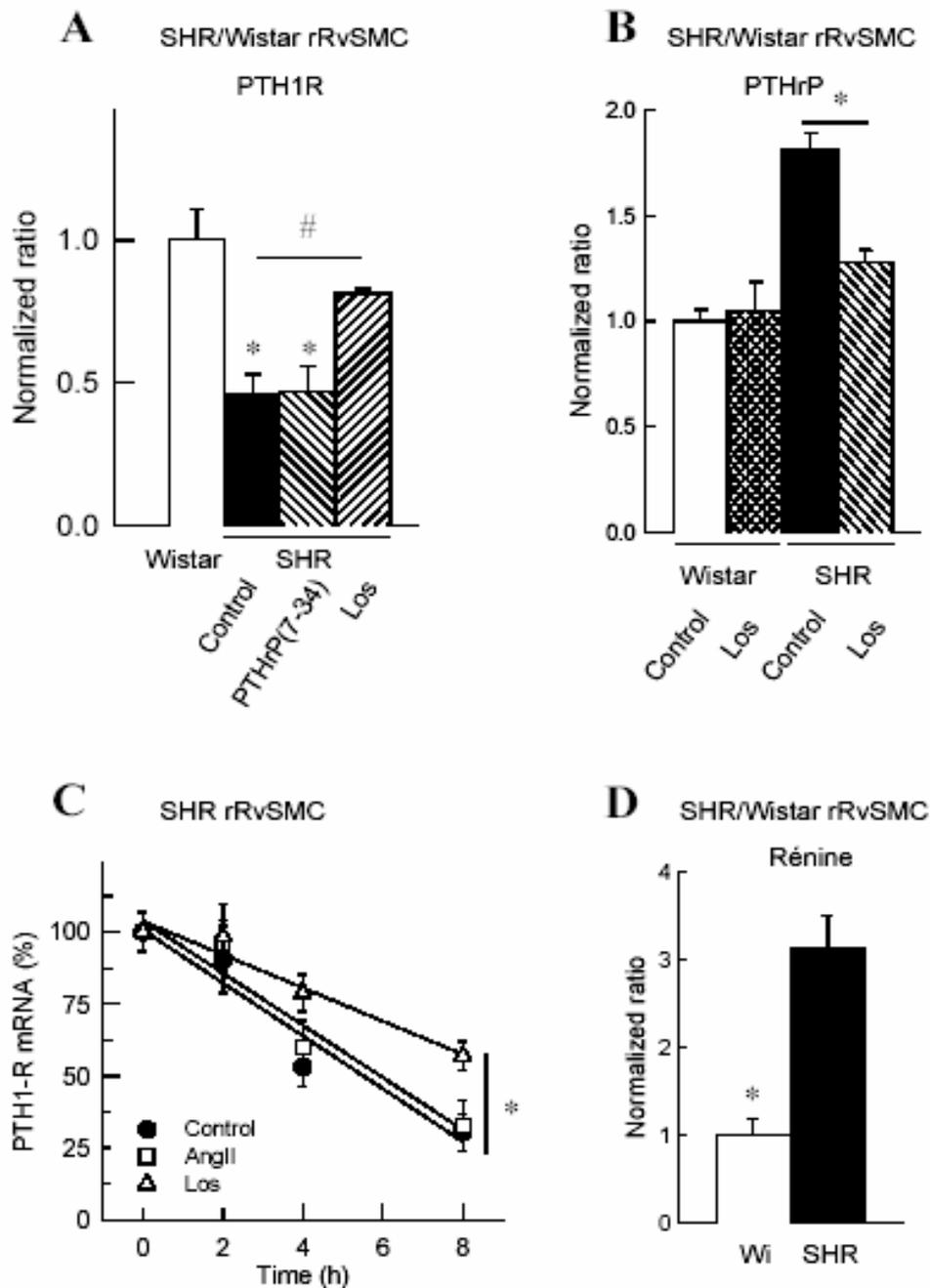


Figure IV-8 : Réversion par le losartan des dérégulations du système PTHrP/R-PTH1 sur des CMLRv de SHR. (A) Effet de la PTHrP(7-34) et du losartan sur l'expression de l'ARNm du R-PTH1 et de la PTHrP (B) en RT-PCR quantitative. (C) Réversion de la déstabilisation de l'ARNm du R-PTH1 chez le SHR par le losartan. (D) Expression de l'ARNm de la rénine chez le SHR comparé au rat Wistar par RT-PCR quantitative. * $P < 0,05$ vs Wistar ; # $P < 0,05$ vs SHR.

DISCUSSION

Dans la seconde partie de ce travail de thèse, les résultats obtenus démontrent clairement que l'Ang II, agissant en synergie avec la PTHrP active par voie intracrine, est capable de diminuer l'expression du R-PTH1 sur des CMLV en culture. Les données obtenues précédemment dans nos études *in vivo*, tant chez le SHR traité par le losartan que chez les rats hypertendus DOCA-sel, avaient déjà mis en évidence l'importance de l'Ang II dans cette dérégulation. Nos études *in vitro* montrent maintenant que la PTHrP intracrine est un acteur tout aussi important dans la dérégulation du R-PTH1 vasculaire. En effet, sur les CMLRv invalidées pour le gène de la PTHrP et retransfectées avec des constructions de PTHrP tronquées, seules les CMLRv comportant une PTHrP sauvage ou une PTHrP avec une séquence NLS intacte, permettent l'expression de la dérégulation du R-PTH1 en réponse à l'Ang II exogène. Mais la surexpression de PTHrP, en l'absence d'un SRA intact, ne permet pas à elle seule de reproduire cette dérégulation comme le montrent nos résultats sur les artères intrarénales des rats DOCA-sel. De même, sur les CMLRv soumises à un étirement mécanique, la sous-expression du R-PTH1 est abolie par le losartan, bien que la surexpression de la PTHrP, non Ang II-dépendante⁵¹⁹, soit maintenue. Les deux facteurs, Ang II et PTHrP, agissent donc de concert dans la dérégulation du R-PTH1.

Ce travail apporte aussi les premiers éléments pour la compréhension des mécanismes impliqués dans la dérégulation du R-PTH1 (protéine et ARNm) par le couple Ang II / PTHrP. Le taux d'ARNm dépend d'un équilibre entre sa vitesse de synthèse et d'export du noyau, et de sa vitesse de dégradation dans le cytoplasme. Nos expériences sur les CMLRv en culture montrent que la baisse de l'expression de l'ARNm du R-PTH1 n'est pas liée à un effet du couple Ang II / PTHrP sur l'activité des promoteurs P1 ou P2 qui contrôlent la transcription du R-PTH1, mais à une déstabilisation de son ARNm. Le même mécanisme opère dans la déstabilisation de l'ARNm du R-PTH1 sur des cellules provenant du SHR, démontrant par là sa pertinence physiopathologique. Quant aux mécanismes moléculaires mis en jeu, ils restent hypothétiques. Si la présence d'une queue poly(A) à l'extrémité 3' non traduite de l'ARNm du R-PTH1 semble maintenant acquise^{199,204}, l'absence de motifs AU est par contre bien établie. Ces motifs sont présents dans l'ARNm de nombreuses cytokines et de facteurs de croissance, mais aussi dans l'ARNm de la PTHrP. Ils signent une grande instabilité des ARNm dont la courte demi-vie permet alors une adaptation rapide aux conditions physiopathologiques. La dégradation de l'ARNm du R-PTH1 pourrait plutôt se faire par l'action d'une endonucléase reconnaissant un site d'attaque spécifique sur l'ARNm, une autre voie importante de régulation de la stabilité des ARNm⁵²⁶. La régulation est alors envisageable, soit au niveau de l'endonucléase elle-même qui peut être présente sous forme inactive, soit au niveau de son site de reconnaissance sur l'ARNm qui peut être protégé par la liaison d'une protéine. Les endonucléases, de même que la structure des sites de d'attaque sur les ARNm sont très variables⁵²⁶. Ces éléments ne sont actuellement pas connus pour l'ARNm du R-PTH1.

De manière intéressante, ce travail met en évidence une nouvelle « réponse » liée spécifiquement à l'activation de la voie intracrine de la PTHrP, la dérégulation du R-PTH1 en synergie avec l'Ang II. Le ciblage nucléaire / nucléolaire de la PTHrP a précédemment été démontré dans divers types cellulaires, avec des réponses variables. Ainsi, la PTHrP intracrine majore la prolifération des CMLV^{95,98,372} et retarde l'apoptose de chondrocytes privés de sérum⁷¹. La localisation nucléaire de la PTHrP est

dépendante du cycle cellulaire tout comme ses effets mitogéniques^{342,343}. Le transport dans le nucléole se fait par l'importine β qui reconnaît et lie la séquence NLS⁵³³. Les nucléoles sont les sites dans le noyau où se réalisent la transcription, la maturation des ARNm puis la formation de complexes protéines/ARN ribosomique avant leur exportation dans le cytoplasme. Aarts et coll.⁵³⁴ ont montré que la PTHrP était capable de se lier directement à l'ARN par le motif GXKKXXK présent dans la séquence NLS et commun avec d'autres protéines se fixant sur les ARN comme Tat. Le rôle de la PTHrP dans le nucléole de même que ses cibles nucléaires, restent cependant à définir. Une de ses cibles nucléaire pourrait être la culline-3, dont l'étude est actuellement en cours par Eric Schordan.

La PTHrP est surexprimée dans de nombreuses situations comme nous l'avons rappelé dans l'introduction bibliographique. Elle est surexprimée dans le muscle lisse du myomètre au cours de la gestation ou par un étirement mécanique¹⁸⁷, de l'oviducte dans le cycle de ponte de l'œuf¹⁸⁹, de la vessie au cours du remplissage¹⁹⁰ ou du tractus gastro-intestinal au passage du bol alimentaire¹⁹¹. Dans toutes ces situations physiologiques, la PTHrP est considérée comme un facteur de compliançe permettant d'adapter le contenant au contenu. Dans ces cas-là qui ne sont pas connus pour être associées à une activation du SRA, on peut penser que le R-PTH1 continue à être correctement exprimé et fonctionnel en terme de relaxation. De même, dans le carcinome rénal à cellules conventionnelles où la PTHrP est sécrétée à haute dose, elle est anti-apoptotique *via* l'activation du R-PTH1 qui demeure fonctionnel¹⁴¹.

Il en est tout autrement dans diverses pathologies cardiovasculaires et rénales où la surexpression de la PTHrP, associée à une activation du SRA, conduit à la perte du R-PTH1 et à la vasodilatation qui lui est associée. Il en est ainsi chez le SHR où des travaux antérieurs du laboratoire avaient montré que cette dérégulation du R-PTH1 contribuait à la majoration de la RVR chez le SHR adulte⁸ et probablement au maintien de l'HTA à long terme. La perte des effets autocrine/paracrine de la PTHrP conduit aussi à favoriser les effets intracrines du peptide. Ces effets sont délétères, mitogéniques, dans le remodelage vasculaire après angioplastie ; la transfection d'une PTHrP délétée en séquence NLS abolit alors la prolifération de la néointima³⁷². Dans l'HTA par contre, les effets intracrines de la PTHrP sont inverses de ceux des rats normotendus³⁵⁰ ; elle diminue alors la prolifération des CMLV et pourrait avoir un effet bénéfique dans le remodelage vasculaire. Enfin, dans les pathologies rénales associées à une sous-expression du R-PTH1, les effets nucléaires liés à la surexpression locale de la PTHrP ne sont actuellement pas connus, que ce soit au niveau des cellules vasculaires, mésangiales ou tubulaires. Il est intéressant de remarquer que dans un modèle d'insuffisance rénale aigüe ischémique ou induite par l'acide folique, la surexpression de PTHrP ciblée par transgénèse dans les cellules tubulaires proximales n'a pas été capable de protéger le rein contre les effets délétères de l'ischémie (apoptose des cellules tubulaires proximales, urémie) contrairement à la transgénèse avec la facteur de croissance hépatique (HGF)³⁶⁷. La PTHrP est pourtant un facteur mitogénique sur ces cellules épithéliales tubulaires *via* l'activation du R-PTH1^{346,359}. Il est ainsi possible que la dérégulation du R-PTH1 décrite dans ces modèles expérimentaux soit directement responsable de l'inefficacité de la surexpression de la PTHrP.

L'Ang II est la clé de voûte de la dérégulation du système PTHrP/R-PTH1. L'importance d'un SRA tissulaire local a été démontrée dans de nombreuses pathologies, comme l'HTA, l'athérosclérose, le diabète et les pathologies rénales. Les données les plus récentes ne considèrent plus seulement l'Ang II

comme un facteur de remodelage vasculaire ⁵³⁵, mais la placent au centre du stress oxydatif et de processus inflammatoires, impliquant les ROS et NFκB ^{465,472,536}. Le challenge pour la PTHrP dans les prochaines années sera de définir sa place dans ce réseau. Quelques observations nous laissent à penser que la PTHrP puisse y être un acteur. En effet, une surexpression du facteur 1α inducible par l'hypoxie (HIF- 1α) a récemment été rapportée sur des CMLAo en réponse à l'Ang II *via* une production des ROS ^{537,538}, démontrant ainsi pour la première fois la possibilité d'une angiogenèse (*via* HIF- 1α et le facteur vasculaire endothélial de croissance ou VEGF) par une voie non liée à l'hypoxie. La pertinence de ce mécanisme a été vérifiée sur les coronaires de rat diabétique ⁵³⁹. Or, HIF- 1α est impliqué dans la stabilisation de l'ARNm de la PTHrP sur les cellules cancéreuses rénales ¹⁴¹ et la PTH ou la PTHrP majorent l'expression de VEGF dans les cellules ostéoblastiques humaines ⁵⁴⁰. Enfin, la PTHrP pourrait être un médiateur pro-inflammatoire dans les lésions athérosclérotiques puisqu'elle majore l'expression du MCP-1 (« Monocyte chemoattractant protein-1 ») et du NFκB sur des CMLV en culture, et qu'elle est colocalisée avec MCP-1 dans les plaques athérosclérotiques de carotides de patients ³⁷³.

Figure 1

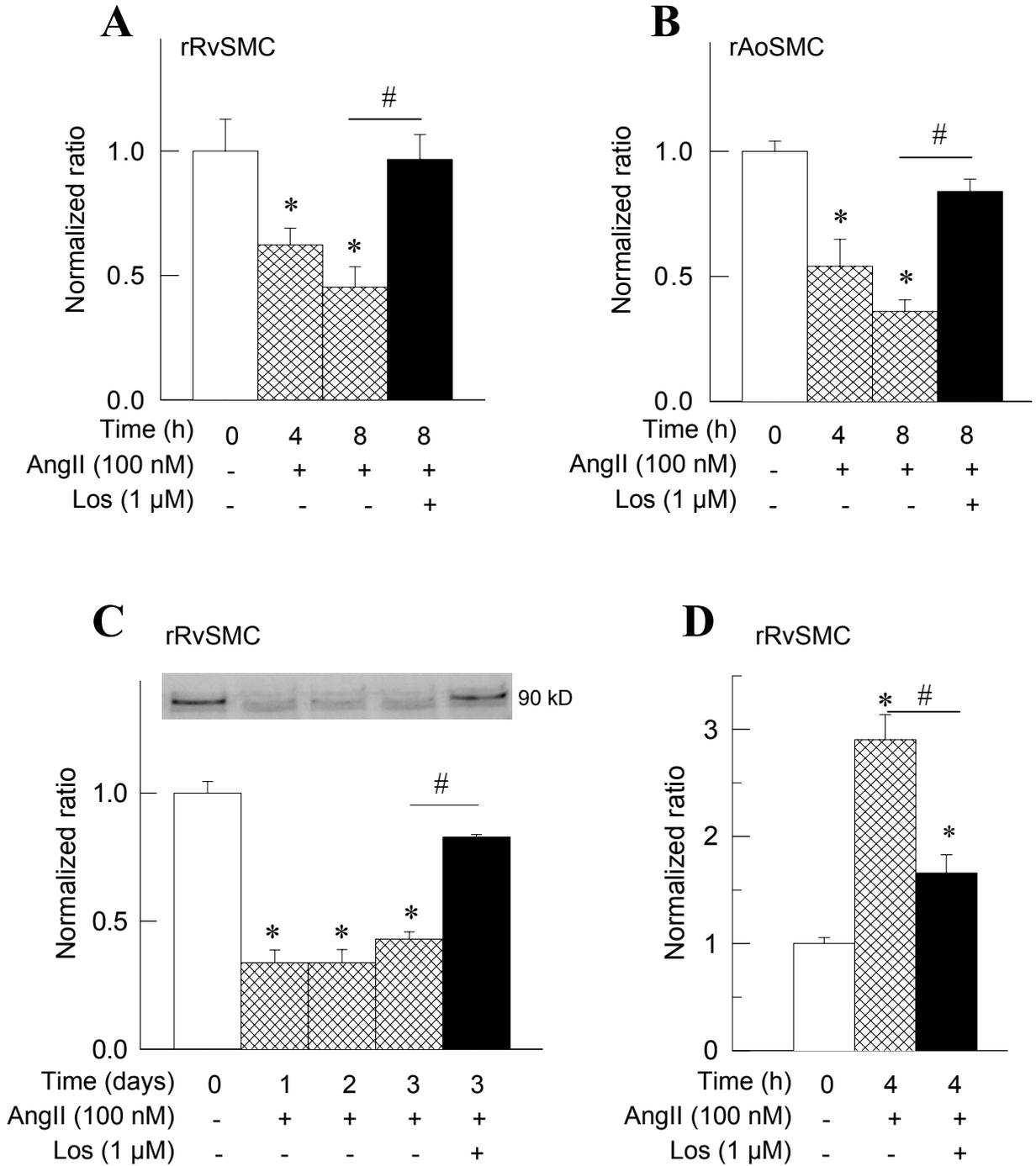


Figure 2

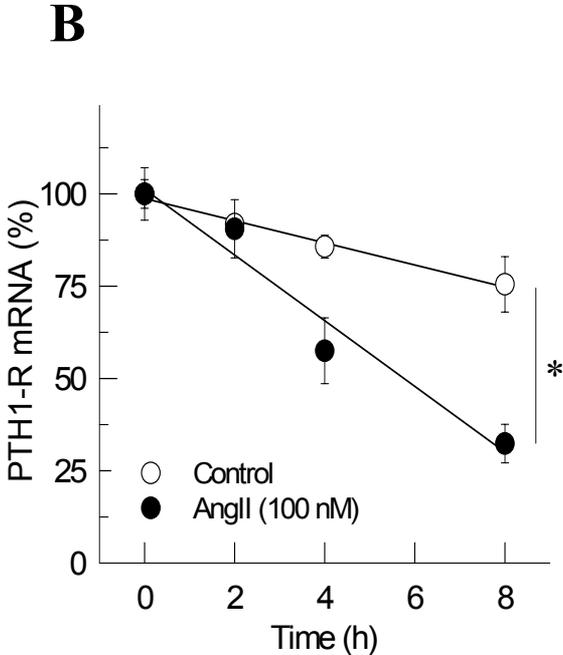
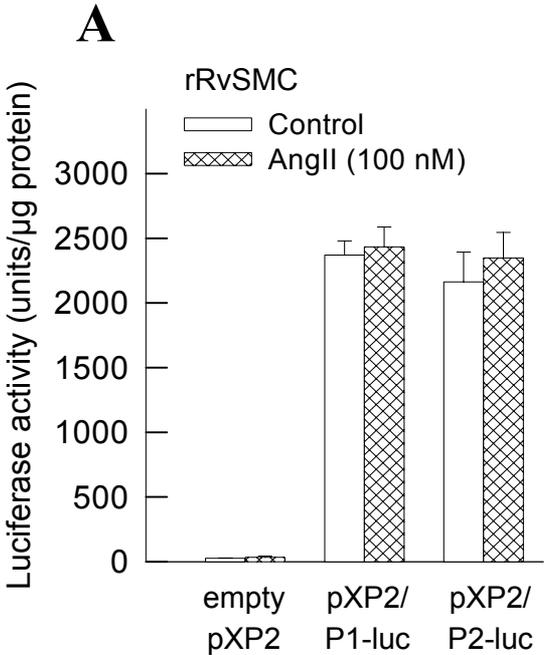
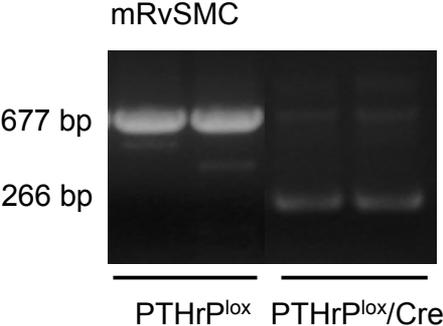


Figure 3

A



B

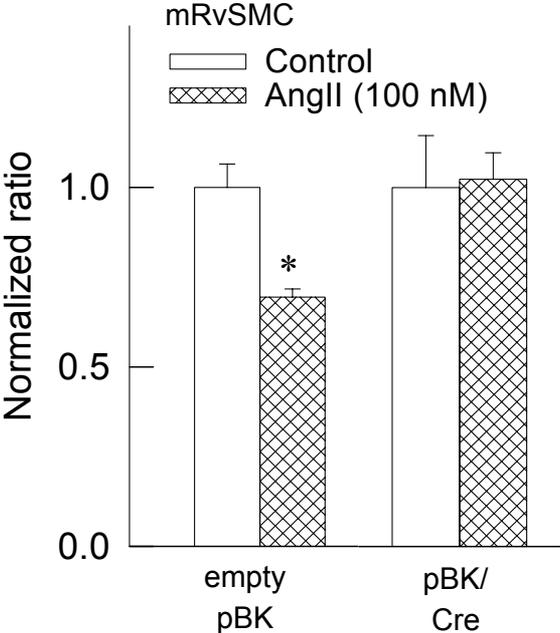


Figure 4

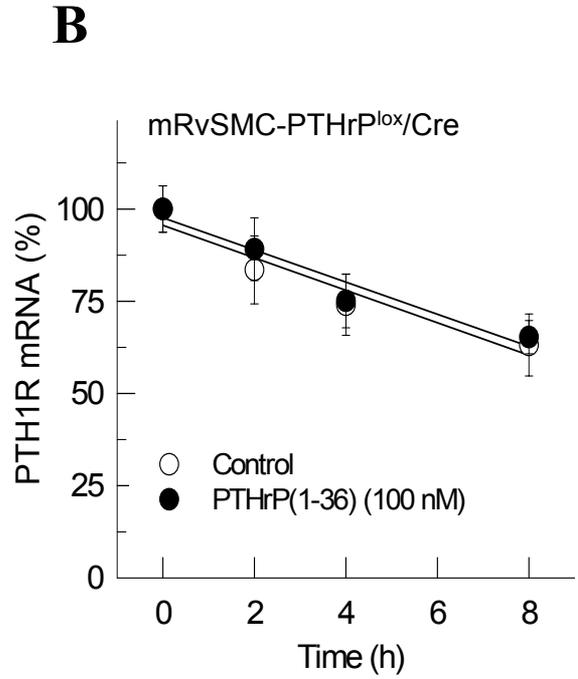
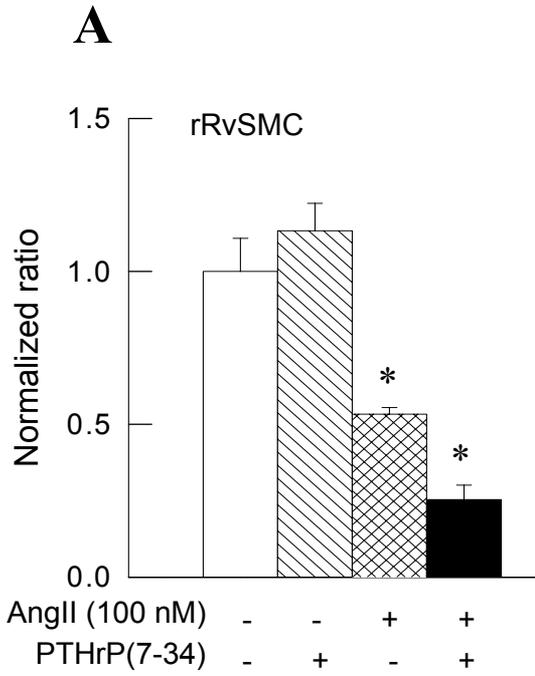


Figure 5

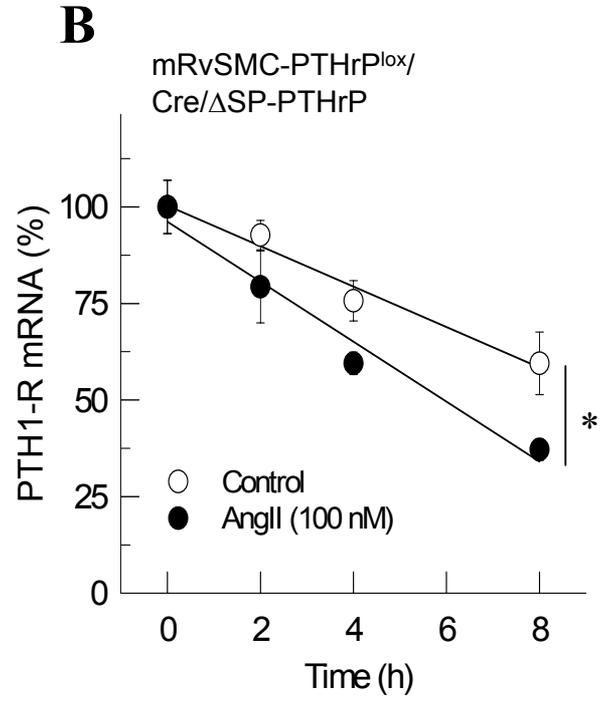
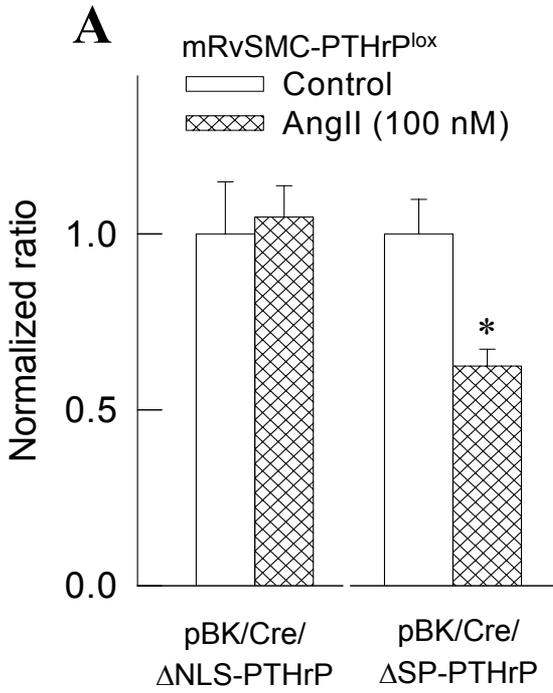


Figure 4

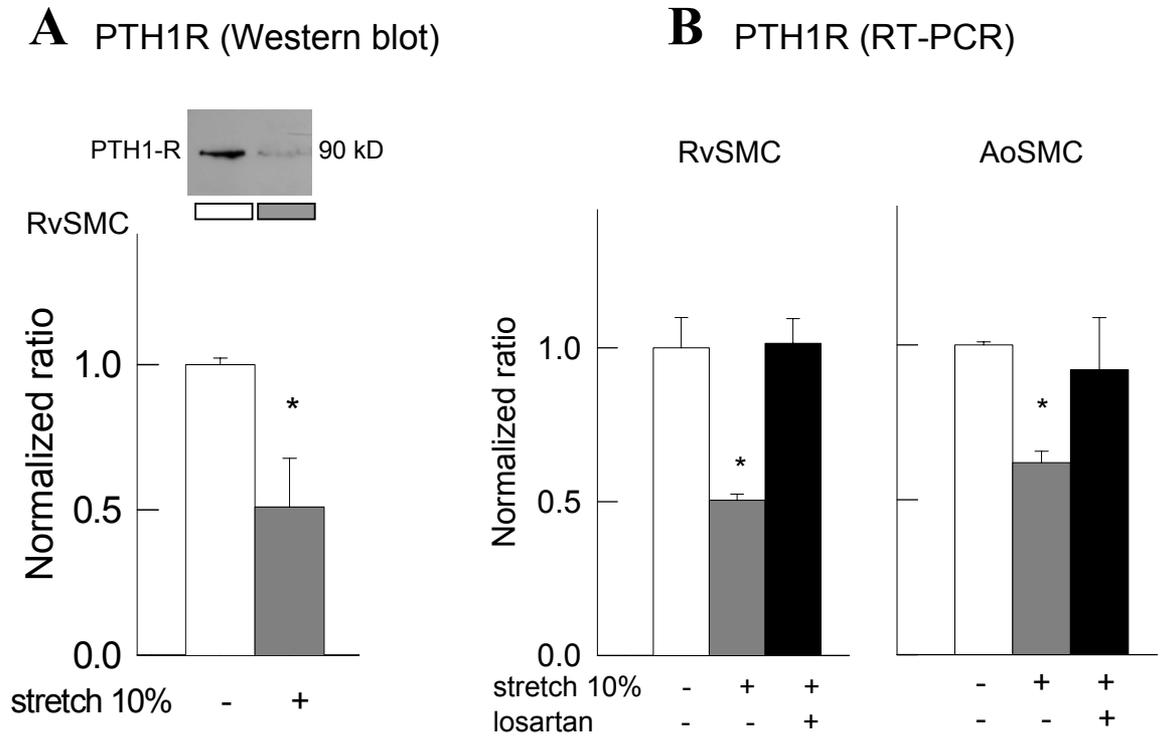
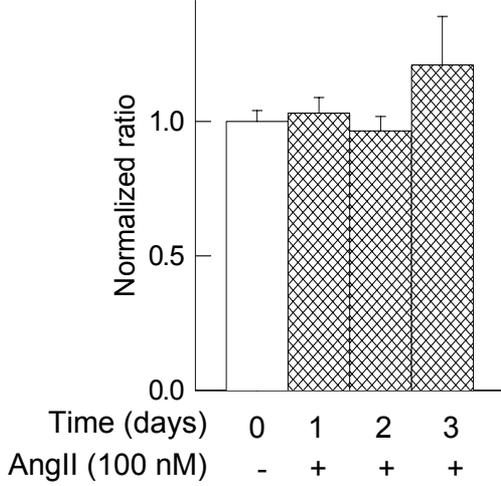
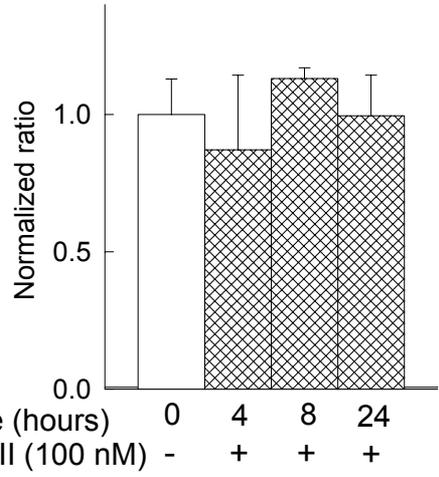


Figure 7

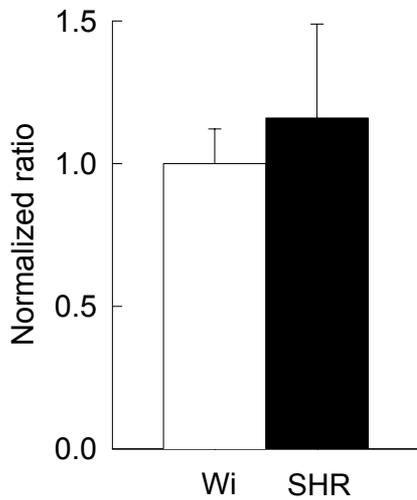
A SHR PTH1R (Western blot)

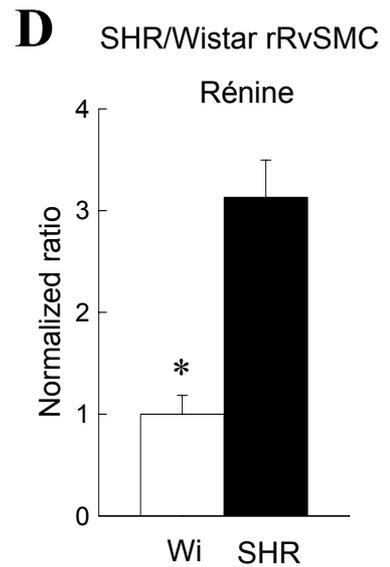
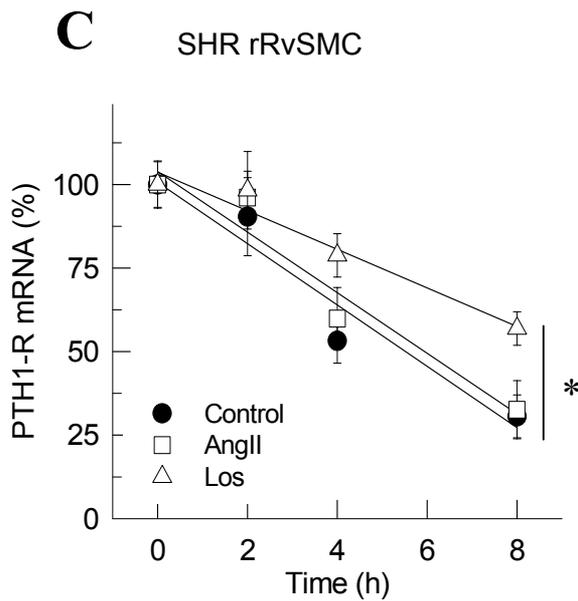
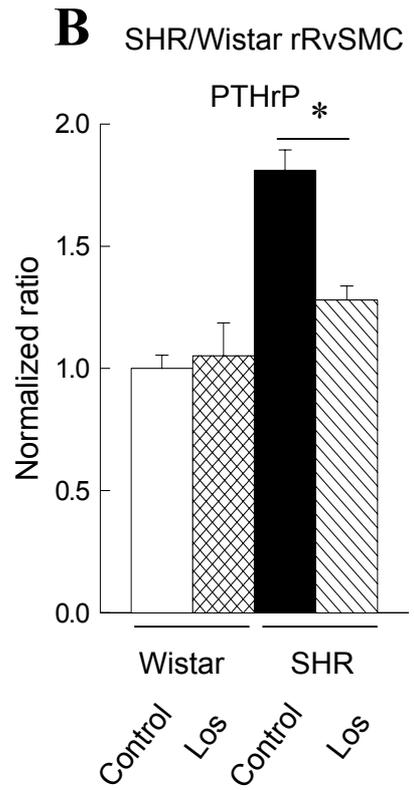
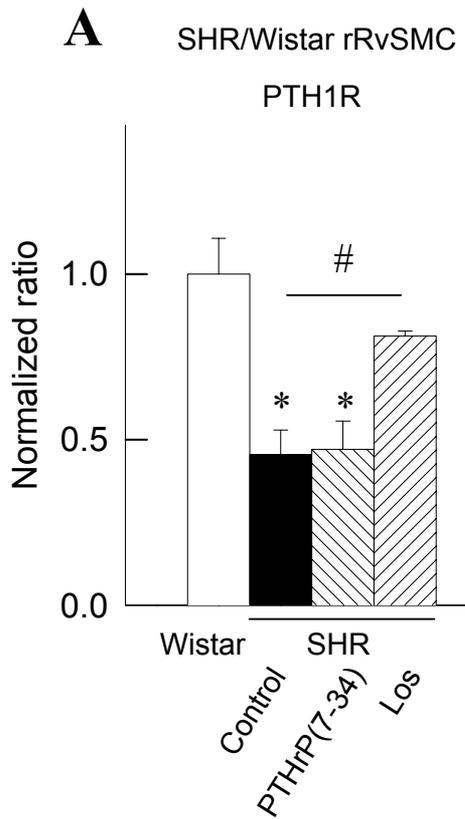


B SHR PTH1R (RT-PCR)



C SHR/Wistar AT1-R (RT-PCR)





PUBLICATION (soumise à Circulation Research)

Angiotensin II-Induced Parathyroid Hormone(PTH)-Related Protein Acts Through the Intracrine Pathway to Destabilize PTH1 Receptor mRNA in Vascular Smooth Muscle

Sandra Welsch, Eric Schordan, Mariette Barthelmebs, Thierry Massfelder and Jean-Jacques Helwig*

Section of Renal Pharmacology and Physiopathology (INSERM-U727), Strasbourg F-67085 France; University Louis Pasteur Medical School of Strasbourg, Strasbourg, F-67091 France

Running title

Post-transcriptional regulation of PTH1 receptor

6103 words

7 figures

1 table

*Corresponding author:

Jean-Jacques Helwig, PhD

INSERM U727

Faculté de Médecine-ULP

11 rue Humann

67085 STRASBOURG Cedex

Phone : 03 90 24 34 54

Fax : 03 90 24 34 59

jean-jacques.helwig@pharmaco-ulp.u-strasbg.fr

Abstract

In vascular smooth muscle (VSM), the pro-hormone parathyroid hormone-related protein (PTHrP) reduces tone and inhibits proliferation by the paracrine, PTH1-receptor(PTH1-R)-dependent route, but stimulates proliferation by an intracrine, nuclear localizing sequence(NLS)-dependent pathway. In hypertension or atherosclerosis-restenosis, angiotensin II (AngII) is a pathogenic factor and the expression of the PTHrP/PTH1-R is deregulated. We aimed to clarify the mechanism by which AngII modulates the PTH1-R gene in rat renovascular SMC (RvSMC) and aortic SMC (AoSMC). AngII (100nM) had no effect on PTH1-R promoter activity, but markedly increased PTH1-R mRNA decay in both cells. PTH1-R antagonism was unable to alter the AngII-induced PTH1-R mRNA destabilization. *Cre*-recombinase transfected RvSMC cultured from mice which express a floxed PTHrP gene, abolished PTHrP expression in these cells. In PTHrP^{-/-}-RvSMC, AngII or exogenous PTHrP were unable to destabilize PTH1-R mRNA. Transfection of PTHrP^{-/-}-RvSMC by NLS-deleted PTHrP, was unable to restore AngII-induced destabilization of PTH1-R mRNA. In marked contrast, transfection of PTHrP^{-/-}-RvSMC with signal peptide-deleted PTHrP, restored AngII-induced PTH1-R destabilization. In RvSMC and isolated perfused kidney of spontaneously hypertensive rat (SHR), endogenous AngII known to be increased in renal interstitial space, is shown to be responsible for the decrease of PTH1-R mRNA stability and PTHrP-induced vasodilation. PTH1-R blockade was unable to improve PTH1-R expression in SHR-RvSMC. These results demonstrate that AngII promotes intracrine PTHrP to destabilize PTH1-R transcript in vascular SMC, suggesting that in vascular diseases, Ang II triggers the proliferative effect of overproduced intracrine PTHrP to the detriment of its paracrine antiproliferative and vasodilatory action.

Introduction

Like angiotensin II (AngII) for which this has well been documented, parathyroid-hormone-related protein (PTHrP), a pro-hormone¹², is believed to play important roles in the regulation of vascular wall tone and growth⁵²⁰. PTHrP has initially been known as a classical secretory protein directed into the endoplasmic reticulum by its signal peptide (SP). But PTHrP has later been proven to be able to enter the nucleus as well, under the direction of a nuclear localization sequence (NLS). Thus PTHrP can either be secreted to act through the paracrine/autocrine route or to be translocated into the nucleus to produce regulatory functions through an intracrine route^{94,541}. Although it is now well established that PTHrP takes both routes to drive vascular smooth muscle cells (VSMC) growth and survival⁹⁵, the nuclear molecular mechanisms and nuclear functions of PTHrP in VSMC are poorly understood. When added exogenously, PTHrP(1-36), the N-terminal mature isoform of PTHrP, decreases vascular tone⁵²⁰ by activating the same receptor than PTH, the so-called PTH1-R, which has now been cloned in a number of species, including man, rat and mouse¹⁹⁷. But, whether locally produced PTHrP acts as an authentic physiological regulator of vascular tone, growth and remodeling remains uncertain, mainly because null-mice for PTHrP or PTH1-R are not viable⁵⁴², and because mice with targeted disruption of PTHrP or PTH1R genes in vascular cells are not available. On the other hand, the cardiovascular phenotype of transgenic mice overexpressing the PTH1-R or PTHrP gene in SMC, clearly points to the vascular tone as one of the physiological site of PTHrP action^{4,5}. In more recent studies, the intravenous delivery of PTH1R-cDNA in adult rats led to preferential overexpression of the PTH1-R gene in the liver and all vessels throughout the body⁶. In these animals, both blood pressure and renal tone were decreased. Moreover, liver production of angiotensinogen and thereby plasma renin activity were also markedly decreased⁶. Collectively, these studies add compelling, albeit circumstantial reasons to consider the PTHrP/PTH1-R system as a physiological actor of vascular tone and VSMC growth homeostasis. Moreover, they point towards narrow interactions between the renin-angiotensin system and the PTHrP/R-PTH1 system.

AngII, the central product of the renin-angiotensin system, is known to increase PTHrP gene transcription and PTHrP mRNA half-life in aortic VSMC^{124,315}. Moreover, AngII rapidly desensitizes and markedly decreases PTH1-R transcript in these cells²⁶⁴. In these studies, exogenous PTHrP appears unable to alter the expression of PTH1-R transcript, suggesting that the upregulation of PTHrP is not a prerequisite for the downregulation of the PTH1-R in response to AngII. In contradiction with these earlier *in vitro* studies however, systemic delivery of AngII, not only upregulates PTHrP, but also PTH1-R in the aorta and renal arteries³⁴⁹. Overall, if the importance of AngII in the control of PTHrP in VSMC is now univocally established, whether exposure to AngII increases or decreases the expression of the PTH1-R gene in VSMC and the molecular mechanisms underlying that effect are unresolved questions. In addition, the role, if any, of PTHrP in the AngII-mediated regulation of PTH1-R gene expression remains unresolved too.

In most examples of experimental vascular diseases in which the pathogenic role of AngII is well established, an upregulation of PTHrP faces a downregulation of PTH1-R. For instance, in hypertension, AngII has a long story as a worsening agent⁵⁴³. In the spontaneously hypertensive rat (SHR) model of genetic hypertension, PTHrP is upregulated and both PTH1-R and PTHrP-induced dilation are downregulated in renal vessels⁸. Another well documented example is atherosclerosis-restenosis, where AngII has along story as a worsening agent as well³⁷⁵. In this frame too, PTHrP is upregulated and PTH1-R downregulated in the media of angioplastied arteries, as well as in atherosclerotic human coronary arteries^{338,370}. In both hypertension and atherosclerosis, the possible pathogenic

roles of the PTH1-R/PTHrP system have been documented. In SHR downregulation of the PTH1-R contributes to the increase of renal and vascular tone⁸. In atherosclerosis-restenosis, PTHrP is involved in the neointimal hyperplasia in angioplastied arteries³⁷². Overall, investigating the mechanisms whereby AngII regulates the expression of the PTHrP/PTH1-R system might be relevant in understanding the pathogenesis and progression of a number of vascular disorders.

This background prompted us to address three major questions. First, is AngII acting through the AT1 receptor (AT1-R) able to modulate the transcriptional or post-transcriptional activity of the PTH1-R gene in VSMC? We chose VSMC cultured from intrarenal arteries because the high reactivity of these vessels and the abundance of AngII in the renal interstitial network⁴⁸⁷. Whether AngII-mediated regulation of the PTH1-R in RvSMC is a PTHrP-dependent process and if so, whether PTHrP acts through the paracrine or the intracrine pathway, is the second question we addressed in the present studies. Finally, the question as to whether the informations gained from these *in vitro* studies are relevant under a physiopathological condition is also considered in the present studies. For this latter purpose, we chose the SHR model of genetic hypertension where the pathogenic role of AngII is well documented and where PTH1-R is downregulated and PTHrP upregulated in the renal vascular bed⁶.

Materials and Methods

Cell cultures and experimental protocols

Renovascular and aortic SMC (RvSMC, AoSMC) were cultured from Wistar rats, SHR or mice with *floxed* PTHrP gene (obtained from Dr AC Karaplis, McGill University, Montreal, Canada)³²⁵ as primary culture, as previously described in details for the rat⁵¹². Cells were used at passage 8 to 20. Experiments were performed on cells at subconfluence, after serum starvation for 48h. Table 1 summarizes the nomenclature, the origin and the transfections of the various VSMC (with lipofectamine reagent) with the different plasmids (1µg/cm²). Cells were selected using G418 at 100 µg/ml. Cells transfected with the PTH1-R promoter-luciferase plasmid or the promoterless-luciferase plasmid (see Table 1) were analyzed for luciferase enzyme expression by the Luciferase Assay System E1500 (Promega, Madison, USA). Results were normalized and expressed as luciferase activity/µg of protein.

As a rule, RvSMC and AoSMC were exposed to AngII (100 nM) or losartan (1 µM, Merck & Co/Du Pont, Rahway, NJ, USA) for various time intervals, as indicated in the figures. For the mRNA decay analysis, RvSMC were exposed to 5 µg/ml actinomycin D (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). Total RNA was isolated at each time point, the relative intensity of the PTH1R mRNA signal (rPTH1-R/rGAPDH ratio) was quantified and expressed as a percentage of the signal obtained at the time of actinomycin D addition set to 100 %.

RNA analysis

Total RNA was extracted from RvSMC and AoSMC cells using the TRIzol method (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) according to the manufacturer's protocol. The same primers were used for both rat and mouse, to analyze the relative abundance of PTH1-R, PTHrP and GAPDH (for normalization) mRNAs by RT-PCR. The sequence of these primers have been described in earlier studies⁸. The sense and antisense primers used to detect *floxed* PTHrP gene were 5'-CAG-CGA-GCG-GCA-CGA-TGC-TGC-GGA-3' and 5'-GTG-CAG-TTT-CCT-GGG-AGA-CAG-TT-3'. The corresponding cDNAs were amplified by LightCycler[®], real-time PCR (Roche Diagnostics, Meylan, France).

PCR reactions for rPTH1-R, rGAPDH, mGAPDH, were run as following (temperature in °C/time in sec): 95/600, followed by 45 cycles of 95/10, 60/5, and 72/12 for rPTH1R and mGAPDH, or 72/16 for rGAPDH. cDNA was replaced by water as a negative control. Each sample was run twice and quantified with the LightCycler® analysis software according to the manufacturer's protocol. Relative expression in samples was calculated by normalizing to GAPDH, and results were expressed as a percentage of the expression obtained at time zero set to 100%. PCR products were also identified on agarose gels to check for expected size (in bp): 320 (rPTHrP), 677 (mPTHrP^{lox/lox} with exon 4), 266 (exon 4 Cre-excised PTHrP^{lox}), 817 (rPTH1-R, mPTH1-R) and 415 (rGAPDH).

PTH1-R Western blot analysis

Expression of rPTH1-R protein was evaluated by Western blot analysis as described before⁸ on 30µg protein extract, using a polyclonal rabbit anti-rPTH1-R antibody (peptide IV) from Eurogentec (Angers, France).

The isolated perfused rat kidney

Wistar rats and SHR were anesthetized, their right kidney was perfused *ex vivo* at constant flow and the vasodilator responses to PTHrP(1-36) (Neosystem, Strasbourg, France) were measured on phenylephrine-precontracted kidney, exactly as described before²⁹⁷. Losartan treatment was given in drinking water for 3 weeks to 9-wk-old SHR at a dose of 20-25 mg/kg/day. Thereafter, the rats were processed for renal vascular reactivity (isolated kidney) or tissue sampling for the analysis of the expression of rPTH1-R mRNA and protein.

Statistical Analysis

All values are expressed as means±SEM. Values were compared by 1-way or 2-way ANOVA followed by Turkey test for multiple comparisons, as appropriate. $P < 0.05$ was considered as significant.

Results

AT1-R mediated PTH1-R mRNA and protein downregulation in RvSMC and AoSMC

Ang II treatments for 4 or 8h reduced by ~45-60% PTH1-R mRNA in rRvSMC (Figure 1A), as well as in rAoSMC (Figure 1B). Western blot analysis in rRvSMC confirmed the real-time PCR studies and showed semi-quantitatively a marked reduction in PTH1-R after 1 to 3 days treatment with AngII (Figure 1C). The anti-PTH1-R antibody recognized a major band of 90kD, consistent with the predicted molecular mass of the glycosylated receptor. A 4h-exposure of rRvSMC to AngII produced a 3-fold increase in PTHrP transcript (Figure 1D). In any case, the AT1-R antagonist losartan (Los), virtually abolished the effects of AngII on the expression of PTH1-R or PTHrP (Figure 1). On the other hand, Los failed to display any effect by its own in both rat SMC types (not shown).

Effect of AngII on PTH1-R gene promoter activity and mRNA decay in rat VSMC

Two promoters have previously been identified, a TATA-rich P1 and a GC-rich P2 promoter, which control human, as well as mouse and rat PTH1-R transcription, with P1 activity accounting for most of the renal transcripts^{208,544}. The pXP2/P1-luc and pXP2/P2-luc luciferase reporter constructs²⁰⁸ were used to examine promoter activity in rRvSMC (Figure 2A). Both constructs exhibited promoter activity as compared to promoter-less pXP2 vector. However, the transcriptional activity of both promoters were insensitive to AngII treatment, suggesting that AngII

does not regulate the expression of PTH1-R at the transcriptional level in rRvSMC. Therefore, a putative AngII-induced of PTH1-R mRNA decay rate was tested in an *in vitro* decay assay (Figure 2B). AngII decreased the PTH1-R mRNA half-life from 12.5 ± 2.6 to 5.8 ± 0.2 h under transcriptional blockade with actinomycine-D in rRvSMC.

Agonist-dependency of AngII-induced PTH1-R mRNA destabilization

RvSMC cultured from mouse homozygous for a floxed PTHrP allele, i.e. two loxP sites flanking exon 4 of the PTHrP gene³²⁵, which encodes most of the protein, were used to test whether the AngII-induced downregulation of PTH1-R is agonist-dependent. Transfection of mRvSMC-PTHrP^{lox} (Table 1) with pBK/CMV-Cre, virtually abolished the expression of floxed PTHrP transcript, while PTHrP transcript missing exon 4 was still weakly expressed (Figure 3A). Like in rRvSMC, AngII downregulated by ~30% PTH1-R expression in mRvSMC with intact floxed PTHrP gene (Figure 3B). In marked contrast, in Cre-transfected mRvSMC, devoid of PTHrP, AngII became unable to downregulate the expression of the PTH1-R, suggesting that PTHrP is indeed required in that process.

To examine whether AngII-induced PTH1-R downregulation requires PTHrP acting through the autocrine pathway, rRvSMC -surface PTH1-R were blocked with PTHrP(7-34), a well known PTH1-R antagonist⁵²⁵. PTHrP(7-34) was unable to affect the expression of PTH1-R transcript by its own in these cells (Figure 4A). Furthermore, the PTH1-R antagonist had no effect on the AngII-induced PTH1-R downregulation, and even tended to increase the ability of AngII to downregulate PTH1-R transcript in these rat VSMC (Figure 4A). Finally, exogenously added PTHrP(1-36) did not alter PTH1-R mRNA half-life in mRvSMC devoid of endogenous PTHrP (11.4 ± 1.0 h) as compared to untreated mRvSMC-PTHrP^{lox}/Cre (12.4 ± 2.8 h; Figure 4B) or to the aforementioned rRvSMC (12.5 ± 2.6 h; Figure 2B). Therefore, endogenously secreted or exogenously added PTHrP does not regulate PTH1-R transcript, whether AngII is present in the culture medium or not, raising the possibility that AngII requires PTHrP acting through another, for instance the intracrine pathway, to downregulate the PTH1-R transcript.

The hypothesis that AngII-induced PTH1-R downregulation requires PTHrP acting through the intracrine pathway was tested in mRvSMC expressing only, either PTHrP with deleted SP (Δ SP-PTHrP) or PTHrP with deleted NLS (Δ NLS-PTHrP). It has been shown before that Δ SP-PTHrP, massively translocates into the nucleus, while Δ NLS-PTHrP remains into the secretory pathway⁹⁵. For this purpose, mRvSMC-PTHrP^{lox}/Cre were co-transfected either with plasmidic constructs containing either the Δ SP-PTHrP cDNA or the Δ NLS-PTHrP cDNA (see Table 1). Consistent with the results presented in Figure 3, when mRvSMC expressed Δ NLS-PTHrP only, AngII was unable to downregulate the PTH1-R gene (Figure 5A). In marked contrast to this, the ability of AngII to downregulate the PTH1-R in mRvSMC devoid of PTHrP was restored when the expression of PTHrP was re-established as Δ SP-PTHrP (Figure 5A). Importantly, in cells expressing Δ SP-PTHrP only, the downregulation of PTH1-R mRNA in response to AngII was accompanied by destabilization of PTH1-R mRNA, from 9.6 ± 0.2 to 6.5 ± 0.7 h, as shown by the mRNA decay analysis under transcriptional blockade (Figure 5B).

AngII destabilize PTH1-R mRNA in SHR renal vessels

The purpose of these studies performed on SHR was to examine whether the previously shown downregulation of PTH1-R in renal vessels⁸ results from cooperative actions of non-paracrine PTHrP and paracrine AngII to destabilize

PTH1-R mRNA. In SHR which received Los in drinking water over three weeks, downregulation of immunoreactive PTH1-R in protein extracts of isolated intrarenal arteries was significantly reversed as compared to untreated animals (Figure 6A). As a result, Los markedly reversed the downregulation of PTHrP(1-36)-induced vasodilation in *ex vivo* perfused kidney of SHR, as compared to normotensive Wistar rats⁸ (Figure 6B). Thus, endogenously secreted AngII acting through the AT1-R appeared responsible for the downregulation of PTH1-R in RvSMC.

With this observation in mind, RvSMC were subsequently cultured from SHR to examine whether exogenously added AngII, further downregulates the PTH1-R in these cells. Figure 7A clearly shows that added AngII for up to 3 days, indeed, was unable to further affect PTH1-R expression. On the other hand, blocking AT1-R with Los restored most of the PTH1-R expression seen in RvSMC cultured from Wistar normotensive rats. Since the upregulation of PTHrP faces the downregulation of PTH1-R in this model of genetic hypertension, the obvious question as to whether PTHrP acting through the paracrine pathway is involved in the process of PTH1-R downregulation in response to endogenous AngII has also been examined. As for the aforementioned Wistar RvSMC, PTHrP(7-34) was unable to modify the downregulation of PTH1-R mRNA in SHR RvSMC (Figure 7B). In these cells, AngII, not only was unable to further decrease PTH1-R mRNA (Figure 7A), but also to further destabilize PTH1-R mRNA (5.9 ± 1.2 vs. 4.8 ± 0.6 h; Figure 7C). On the other hand, treatment of SHR with Los, clearly increased PTH1-R mRNA half-life, close to the value seen in normotensive animals (8.9 ± 1.5 h; Figure 7C).

Discussion

AngII downregulates PTH1-R, *in vitro* and *in vivo*, in RvSMC and AoSMC

That the addition of AngII to AoSMC, downregulates the PTH1-R gene within 4-6h in an AT1-R-dependent fashion has well been demonstrated before²⁶⁴. We now extend this aspect to SMC cultured from small intra-renal arteries of rat and mouse. In RvSMC cultured from normal rat, AT1-R blockade had no effect on the expression of the PTH1-R gene, most likely because endogenous AngII, if any, is produced at too low levels. However, in SHR where the local accumulation of AngII is known to be increased⁴⁸⁷, the blockade of the AT1-R, not only prevented the downregulation of PTH1-R in RvSMC, but also restored the PTHrP-dependent dilation of renal vessels under *ex vivo* conditions. Thus, the present data provide evidence for a functional linkage between locally formed AngII and PTH1-R downregulation in renal vessels in the SHR model of genetic hypertension. In other respects, cyclic stretching of RvSMC has also been proven to downregulate the PTH1-R⁵¹⁹. We have been able to check that like in SHR, antagonizing the AT1-R prevented downregulation of the PTH1-R in response to cyclic stretch (results not shown). In other studies, long term systemic infusion of AngII by subcutaneous osmotic pump in rats (50 ng/kg/min), unexpectedly induced an AT1-R dependent increase of PTH1-R in both the aorta and renal arteries³⁴⁹. Many reasons may explain such a discrepancy, including the amount, duration and administration route of AngII. Thus, in these studies, whether the upregulation of renovascular PTH1-R resulted from direct action of AngII on RvSMC or from action on distant physiological targets is unclear. Overall, the available data strongly suggest that increasing AngII, the central product in the etiology of hypertension and a number of other cardiovascular and renal diseases³⁷⁴, downregulates the PTH1-R in VSMC.

AngII downregulates the PTH1-R gene through posttranscriptional mechanisms

The first major question addressed in the present studies was whether the decrease in PTH1-R mRNA resulted from a transcriptional or a posttranscriptional action of AngII. In RvSMC equipped with a luciferase gene driven by either the P1 promoter or the P2 promoter, AngII, clearly, had no effect on the basal rate of luciferase activity. Both promoters were active in RvSMC. In AoSMC cultured and treated under the same conditions, only the P2-driven luciferase activity was seen (results not shown), confirming the functional integrity of the transcription system used, as the P1 activity has indeed been shown to be kidney-specific^{208,544}. On the other hand, the breakdown of PTH1-R mRNA in RvSMC, in which mRNA synthesis has been blocked by actinomycin D, could be accelerated by AngII. Therefore, in RvSMC, AngII, within hours, decreases PTH1-R mRNA through a posttranscriptional, mRNA destabilizing mechanism.

PTHrP is required for the destabilizing effect of AngII on PTH1-R mRNA

Among the questions arising straight out from these results, one is most obvious: does PTHrP, which is potently induced by AngII through both transcriptional and posttranscriptional mechanisms^{124,315}, mediate the PTH1-R mRNA destabilization in response to AngII? In RvSMC cultured from mouse with *floxed* PTHrP gene, *Cre*-recombinase-mediated excision of PTHrP gene intron 4, virtually abolished the expression of functional (full-length) PTHrP. In these PTHrP-negative cells AngII became unable to downregulate the PTH1-R gene, strongly indicating that PTHrP, indeed, belongs to the mechanistic cascade activated by AngII to destabilize PTH1-R transcript.

PTHrP acts through a NLS-dependent intracrine pathway to downregulate the PTH1-R transcript in response to AngII

The present studies clearly demonstrate that exogenously added PTHrP(1-36), one of the PTH1-R ligand, is unable to destabilize the PTH1-R transcript in response to AngII in these PTHrP-negative RvSMC. Furthermore, in rat RvSMC which normally express PTHrP, the addition of a PTH1-R antagonist does not alter the downregulatory effect of AngII on this receptor. Earlier studies in AoSMC have also shown that PTHrP(1-34) *per se*, is unable to downregulate the PTH1-R gene in rat AoSMC²⁶⁴. All together, these observations strongly suggest that the required PTHrP is not acting through the paracrine pathway to downregulate the PTH1-R transcript in response to AngII in VSMC.

Another way for PTHrP to be involved in that process is to act through the intracrine pathway. It has been well demonstrated that PTHrP is a secreted protein able to enter the nucleus owing to a bipartite NLS in its 94-106 region, in bone cells⁷¹, as well as in VSMC⁹⁴. Surprisingly however, the molecular targets of PTHrP in the nucleus and the nuclear functions of PTHrP remain essentially unknown. The only well established notion in this field is that PTHrP, by entering the nucleus modulates cell proliferation and survival⁹⁴. The present studies provide strong evidence for the involvement of a NLS-dependent action of PTHrP in the downregulatory effect of AngII on PTH1-R gene. Indeed, when mouse RvSMC, exclusively express a PTHrP species equipped with the NLS but in which the signal peptide has been deleted, the downregulatory response to AngII is restored. Conversely, when mouse RvSMC, exclusively express a PTHrP species equipped with the signal peptide, but in which the NLS has been deleted, Ang II remains unable to downregulate the PTH1-R gene. Therefore, when upregulated by AngII, PTHrP acts through an intracrine NLS-dependent mechanism to downregulate PTH1-R mRNA.

Consistently, in SHR RvSMC in which AngII is increased, added AngII was unable to further destabilize the PTH1-R transcript. On the other hand, AT1-R antagonism, not only blunted the upregulation of PTHrP, but also increased PTH1-R mRNA stability and PTH1-R expression. Moreover, the absence of effect of PTH1-R antagonism further supports the notion that it is not PTHrP acting through the paracrine pathway which mediates the downregulatory activity of AngII. Whether PTHrP acts through the nuclear pathway to downregulate the PTH1-R in response to AngII in SHR remains unclear. Nevertheless, in previous immunohistochemical studies³⁵⁰, PTHrP was observed in the nucleus of cultured RvSMC, as well as on kidney slices in the nucleus of the SMC around the intrarenal arterial tree of both normotensive rats and SHR. Thus, the nuclear translocation of PTHrP in RvSMC is detected not only *in vitro*, but also *in situ* in both strains of rats.

AngII, a factor which promotes PTHrP as an intracrine factor in vascular diseases ?

As in A10 AoSMC, PTHrP has been shown to inhibit RvSMC proliferation through the paracrine pathway and to stimulate the growth of RvSMC through an intracrine pathway³⁵⁰. PTHrP also decreases vascular tone through the PTH1-R-dependent paracrine pathway. Thus, under conditions where AngII increases in the vicinity of the VSMC, one would speculate that the proliferative effect of overproduced PTHrP is promoted to the detriment of its antiproliferative and vasodilatory action. AngII has been established to induce cellular hypertrophy in cultured VSMC via AT1-R, and abnormal VSMC growth plays a major role in the development of various vascular diseases such as hypertension and atherosclerosis-restenosis³⁷⁴. Whether PTHrP acting through the intracrine pathway mediates or at least contributes to the AngII-induced vascular wall remodelling to the detriment of the beneficial antimitogenic and vasodilatory actions of PTHrP is an open question. In this scheme, PTHrP would function as a worsening agent. The recent demonstration that delivering PTHrP with deleted NLS to the arterial wall at the time of angioplasty abolishes neointimal proliferation³⁷², strongly supports such an hypothesis. In the SHR model of genetic hypertension, the dual opposite effects of PTHrP on RvSMC have been shown to be reversed³⁵⁰. In these studies, PTHrP acting through the paracrine pathway promoted RvSMC hypertrophy, while PTHrP acting through the NLS-dependent pathway inhibited RvSMC proliferation. In this latter case PTHrP appears as an intracrine factor with reduced vasodilatory action which might oppose the proliferative effect of AngII.

Conclusion

The present studies demonstrate that AngII promotes PTHrP as an intracrine factor to destabilize PTH1-R mRNA and in turn to decrease the amount of PTH1-R that can be translated from each molecule of transcript. Therefore, AngII stabilizes PTHrP mRNA^{124,315} which in turn destabilizes PTH1-R mRNA through NLS-dependent mechanisms. Among the questions arising from these conclusions, two are most obvious. First, what are the mechanisms by which AngII promotes PTHrP as an intracrine factor ? Second, what is the NLS-dependent mechanism by which PTHrP destabilizes PTH1-R mRNA? Neither question can be answered at present. Answers to such questions require the understanding of the regulation of the two-way switch which guides PTHrP, either towards the nucleus or towards the secretory pathway, as well as the identification of the nuclear targets of PTHrP³⁷². Among the different mechanisms which regulate the stability of the various mRNA⁵²⁶, are the degradation of mRNAs by deadenylation-dependent decapping, the binding of proteins to recognition sites at the 3'-untranslated region of the mRNA, either in the poly(A) region or more upstream to the destabilizing AU-rich elements (the latter

being present in the PTHrP mRNA but not in the PTH1-R mRNA), or by endonucleolytic cleavage. Which of these pathways are operative in AngII-induced, PTHrP-dependent acceleration of PTH1-R mRNA decay requires much more studies. Since the PTH1-R mRNA destabilization appears very rapidly upon exposure to AngII, this effect, most likely, depends more on a posttranscriptional modification of such a putative destabilizing factor by phosphorylation or dephosphorylation, rather than on its *de novo* synthesis.

Acknowledgments

This work was supported by grants (recipient J.J.H.) from INSERM, France and University Louis Pasteur, Strasbourg, France. This work is part of the PhD of thesis of S.W. and E.S., who are supported by fellowships from INSERM and French government. Dr J.H. White (Department of Physiology, McGill University, Quebec, Canada) is thanked for providing us with pXP2-P1-luc and pXP2-P2 plasmid constructs. Mrs V. Roques and S. Rothhut are thanked for skilled technical assistance and Mrs D. Kühlwein for secretarial help. We also warmly thank Prof A.F. Stewart (University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, PA) for stimulating discussions and helpful editorial assistance. The authors also gratefully acknowledge the gift of losartan by Merck & Co/Du Pont (Rahway, New Jersey).

Table 1–VSMC, plasmids and transfections: nomenclature and origin

Designation	Transfected construct	Plasmid	Origin/Ref
rRvSMC (Wistar):			512
• P1-luc	PTH1-R P1 5'-flanking promoter-luciferase cDNA	pXP2	208
• P2-luc	PTH1-R P2 5'-flanking promoter-luciferase cDNA	pXP2	208
rRvSMC (SHR)	none	none	512
mRvSMC-PTHrP ^{lox} :			325
• Cre	CMV promoter-Cre-recombinase cDNA	pBK	(a)
• Cre/ Δ NLS-PTHrP	CMV promoter-Cre-Recombinase cDNA CMV-PTHrP cDNA with deleted NLS	pBK pcDNA3	(a) 95
• Cre/ Δ SP-PTHrP	CMV promoter-Cre-Recombinase cDNA CMV-PTHrP cDNA with deleted SP	pBK pcDNA3	(a) 95

CMV: cytomegalo virus. **Cre:** Cre-recombinase. **luc:** luciferase. **NLS:** nuclear localizing sequence. **P1 and P2:** PTH1-R gene promoters. **rRvSMC** and **mRvSMC:** rat or mouse renovascular smooth muscle cell. **SHR:** spontaneously hypertensive rats. **SP:** signal peptide. (a) construct generously provided by Dr D. Metzger, Institute of Genetics and Molecular and Cellular Biology (IGBMC), Illkirch, France)

References

Les numéros correspondent aux références indiquées en fin de thèse.

Legends to Figures

Figure 1.

Panels A and B. Changes induced by AngII and losartan (Los) in PTH1-R mRNA as evaluated by quantitative RT-PCR analysis in rRvSMC (**A**; n=6) and rAoSMC. (**B**; n=4) Results were normalized for rGAPDH expression. * $P < 0.05$ vs. time 0.

Panel C. Changes induced by AngII and Los in PTH1-R as evaluated by Western blot analysis in rRvSMC (n=4). * $P < 0.05$ vs. time 0.

Panel D. Changes elicited by AngII and Los in PTHrP mRNA as evaluated by quantitative RT-PCR analysis in (n=4). Results were normalized for rGAPDH expression. * $P < 0.05$ vs. time 0.

Figure 2.

Panel A. Luciferase activity in rRvSMC transfected with pXP2/P1-luc and pXP2P/P2-luc (see Table 1) luciferase reporter constructs in response to AngII (n=3-4). Luciferase activities were measured under basal conditions and after 48h exposure to Ang II. * $P < 0.05$ vs. control.

Panel B. PTH1-R mRNA decay rate analyzed under transcriptional blockade by quantitative RT-PCR in RvSMC cultured in the presence or absence (control) of AngII (n=3-6). * $P < 0.05$ vs. control.

Figure 3.

Panel A. Typical example of ethidium bromide-stained agarose gel showing PTHrP mRNA expression on RvSMC prepared from PTHrP^{lox} mice before (with exon 4) and after transfection with pBK vector containing the Cre-recombinase cDNA (without exon 4) (n=8).

Panel B. Effect of AngII on PTH1-R mRNA evaluated by quantitative RT-PCR analysis in mRvSMC expressing PTHrP^{lox} gene (transfected with empty pBK plasmid) or mRvSMC devoid of PTHrP (transfected with pBK/Cre) (n=4). Results were normalized for rGAPDH expression. * $P < 0.01$ vs. empty pBK.

Figure 4.

Panel A. Effect of AngII on PTH1-R mRNA in rRvSMC, as evaluated by quantitative RT-PCR analysis, during PTH1-R antagonism with PTHrP(7-34) at 10 nM. Results were normalized for rGAPDH expression. * $P < 0.05$, vs. control (n=3-7).

Panel B. Effect of exogenously added PTHrP(1-36) on PTH1R mRNA decay, evaluated by quantitative RT-PCR analysis in mRvSMC devoid of endogenous PTHrP under transcriptional blockade (n=3).

Figure 5.

Panel A. Effect of AngII on PTH1-R mRNA evaluated by quantitative RT-PCR analysis in mRvSMC-PTHrP^{lox}/Cre devoid of endogenous PTHrP and re-transfected with pcDNA3/ Δ NLS-PTHrP or with pcDNA3/ Δ SP-PTHrP (n=4). Results were normalized for rGAPDH expression. * $P < 0.05$, vs. control.

Panel B. Effect of AngII on PTH1-R mRNA decay evaluated by quantitative RT-PCR analysis in mRvSMC-PTHrP^{lox}/Cre devoid of endogenous PTHrP and re-transfected with pcDNA3/ Δ SP-PTHrP (B; n=3). * $P < 0.05$, vs. control.

Figure 6.

Panel A. Effect of a 3-week treatment of spontaneously hypertensive rats by Los on PTH1-R expression as analyzed by Western blot in isolated intra-renal small arteries (n=4). * $P < 0.05$, vs. control.

Panel B. Vasorelaxation induced by PTHrP(1-36) in the isolated perfused kidney prepared from spontaneously hypertensive rat (SHR) or from normotensive Wistar rat. Results are expressed as the ability of PTHrP(1-36) to inhibit the PE-induced vasoconstriction (45-55 mmHg) in %. (n=7) * $P < 0.05$ vs. Wistar, # $P < 0.05$ for the effect of Los in SHR.

Figure 7.

Panel A. Effect of AngII on PTH1-R mRNA in SHR RvSMC, as evaluated by quantitative RT-PCR analysis under transcription blockade conditions (n=4). Results were normalized for rGAPDH expression.

Panel B. PTH1R mRNA in SHR and Wistar RvSMC and effect of Los and PTH1-R blockade with PTHrP(7-34) (10 nM) in SHR RvSMC (n=4). * $P < 0.05$ vs. Wistar.

Panel C. Effect of AngII and Los on PTH1-R mRNA decay evaluated by quantitative RT-PCR analysis in SHR RvSMC (n=3). * $P < 0.05$ vs. control.

Figure 1

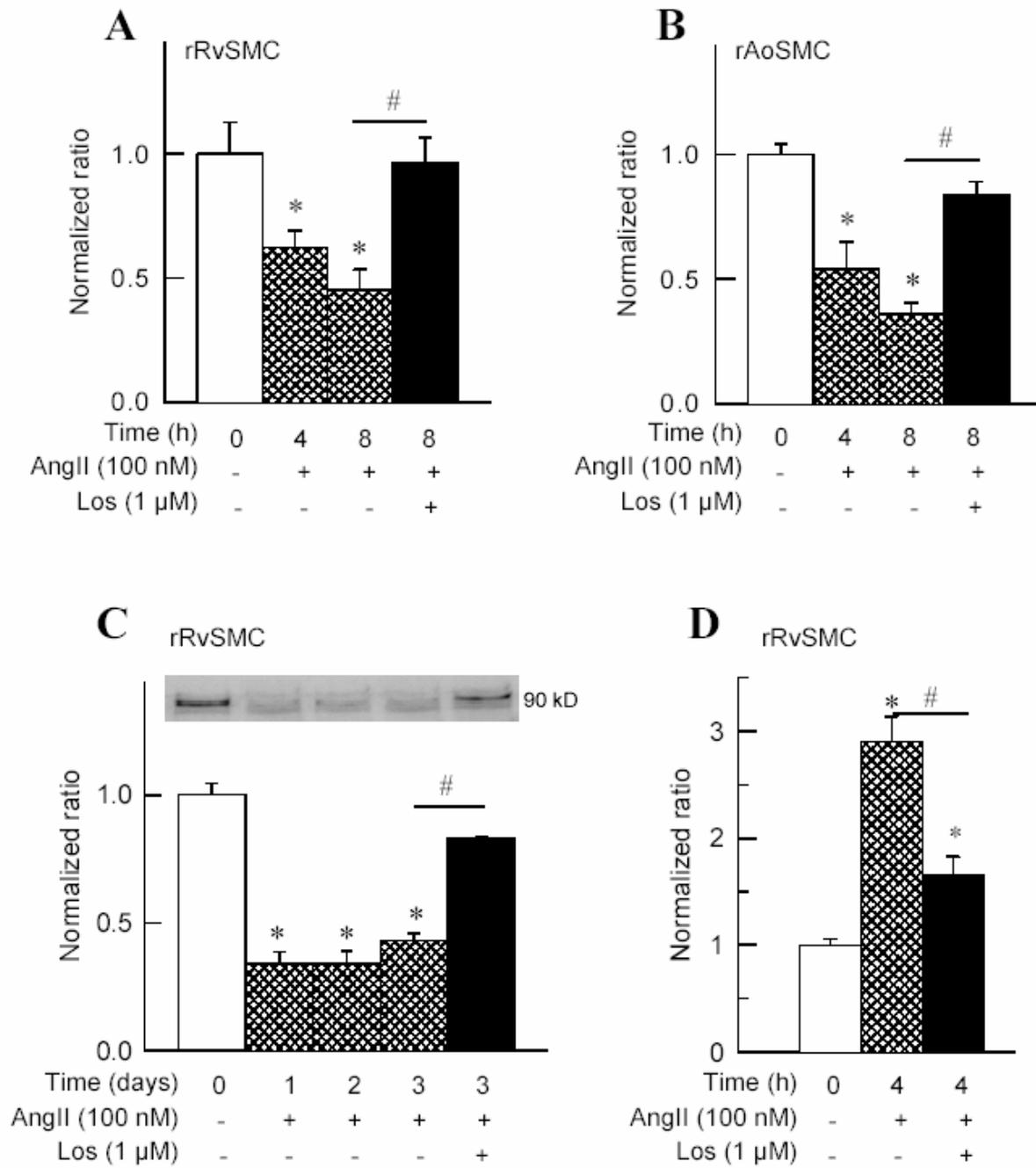


Figure 2

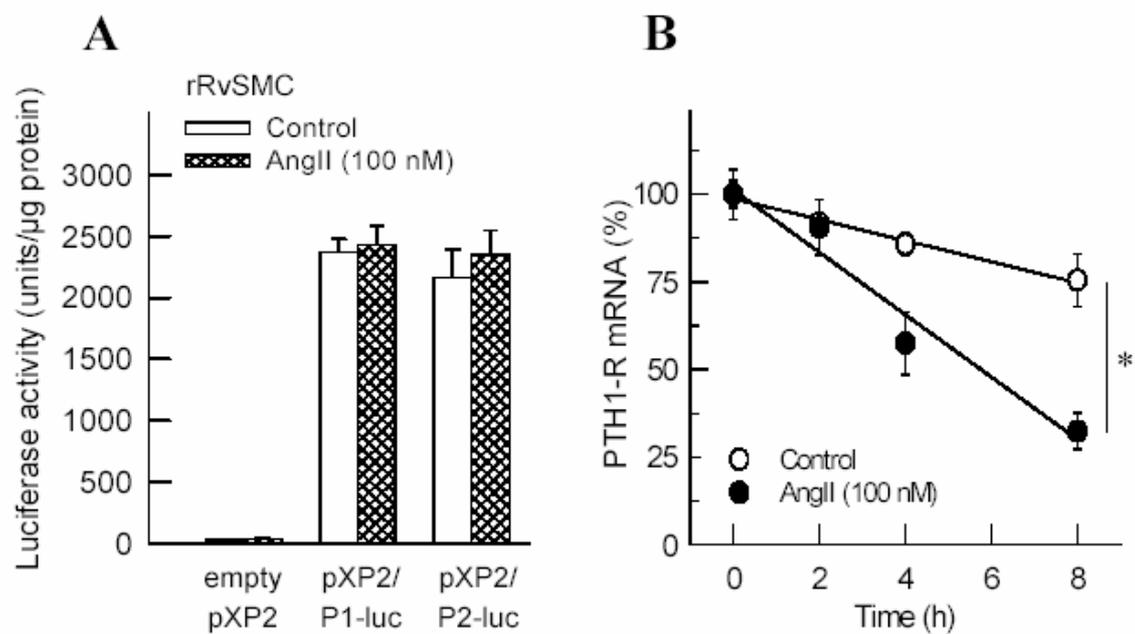


Figure 3

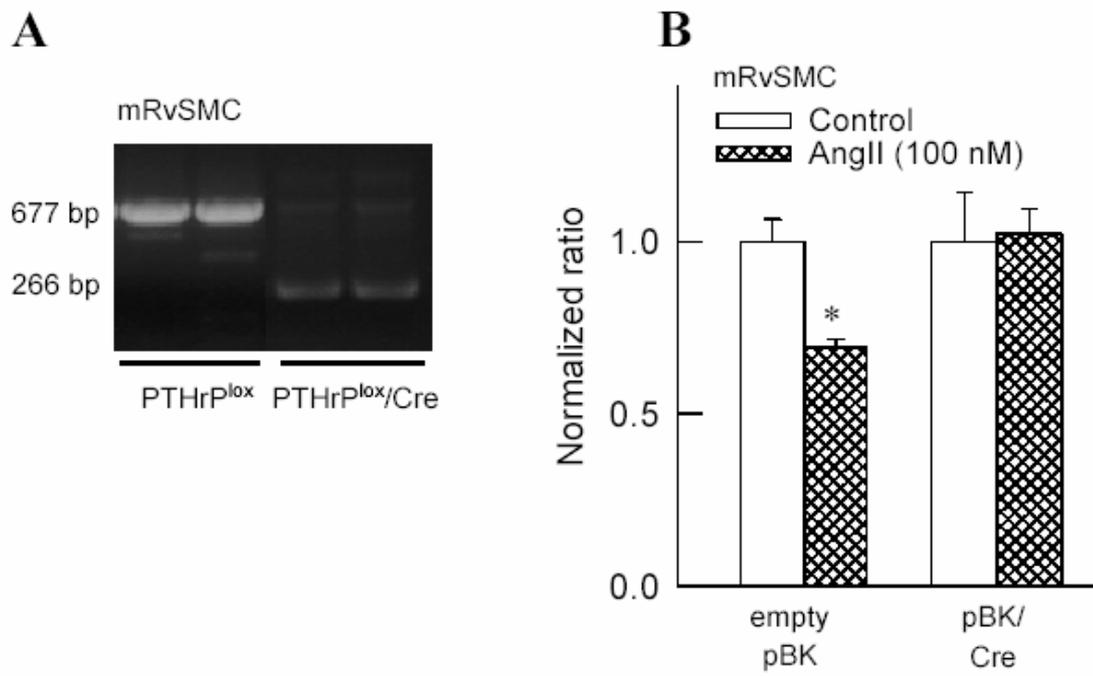


Figure 4

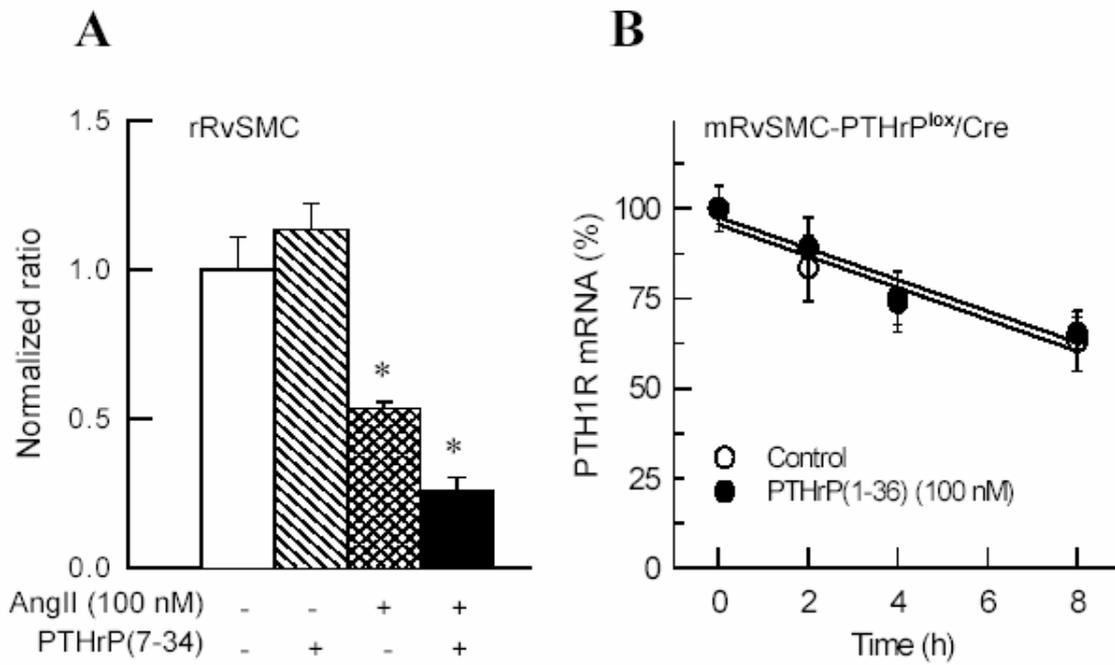


Figure 5

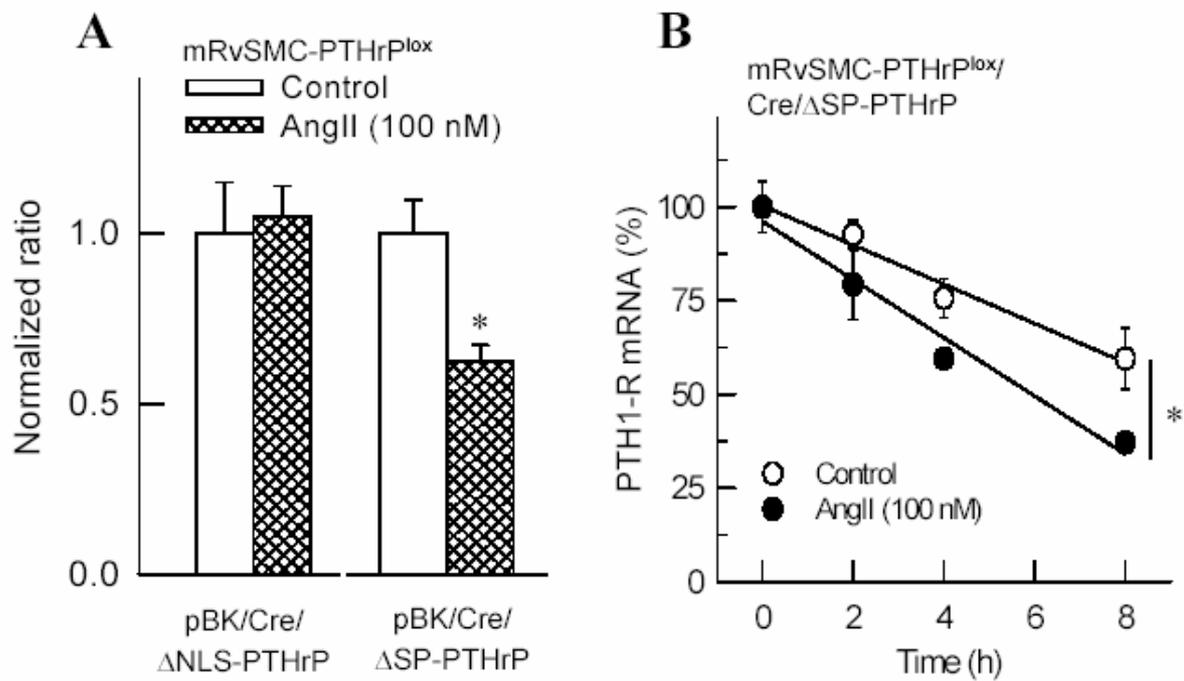


Figure 6

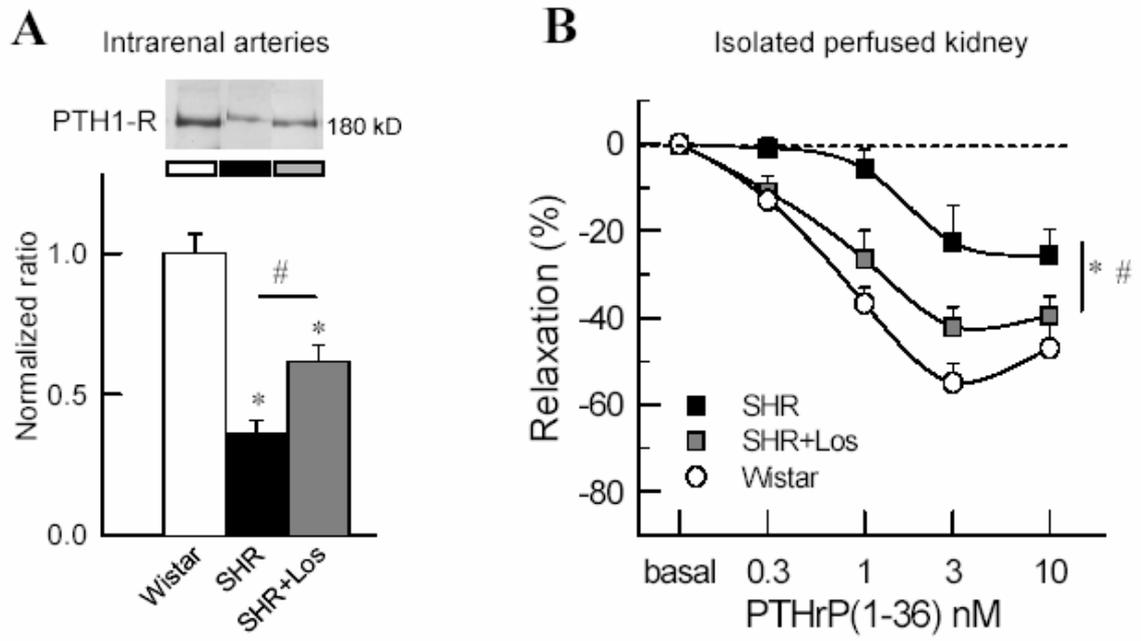
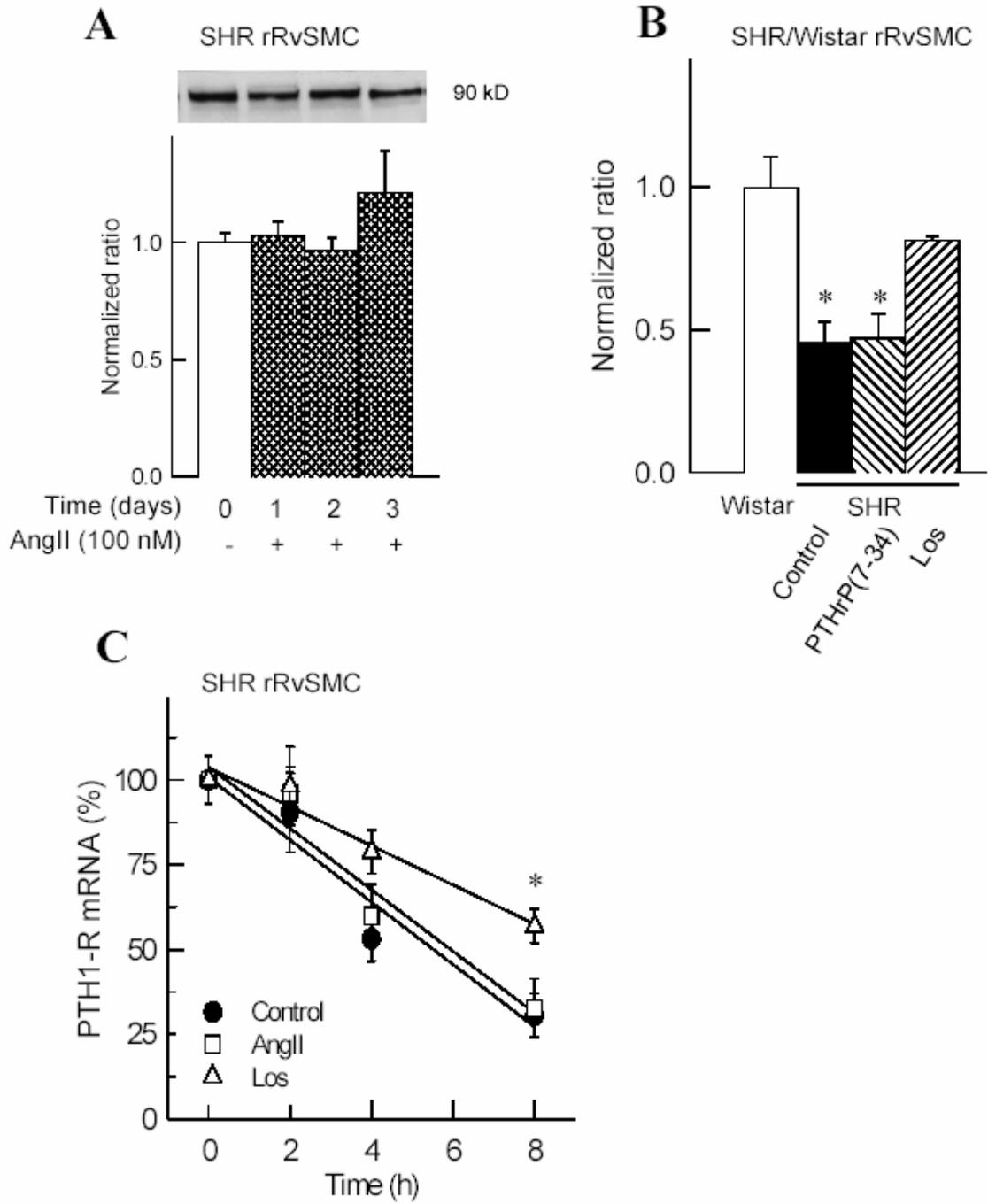


Figure 7



CONCLUSIONS

Dérégulation de la Protéine Apparentée à l'Hormone Parathyroïde (PTHrP) et du Récepteur PTH/PTHrP (R-PTH1) dans l'Hypertension Artérielle et en réponse à l'Angiotensine II

Ce travail de thèse a permis de préciser les facteurs impliqués dans la dérégulation du système PTHrP/RPTH1 dans les vaisseaux rénaux, notamment au cours de l'HTA. Mes résultats montrent que la sous-expression vasculaire rénale du R-PTH1 présente chez le SHR avec une HTA établie, est associée à une perte de la fonction vasodilatatrice rénale de la PTHrP non seulement *in vitro* (rein isolé perfusé) mais aussi *in vivo*, chez le rat anesthésié. La dérégulation du R-PTH1 apparaît comme une spécificité vasculaire rénale chez le SHR, non retrouvée sur d'autres vaisseaux, ni dans le cœur ou la médulla rénale. Elle ne semble pas avoir une origine génétique puisqu'elle n'est pas présente chez le SHR jeune préhypertensif. Elle requiert par contre un SRA intact puisqu'elle est réversible chez le SHR traité par le losartan, et absente dans une HTA à rénine basse. La surexpression vasculaire rénale de la PTHrP présente les mêmes caractéristiques (spécificité rénale, pas d'origine génétique, réversibilité par le losartan), mais dépend aussi plus directement de la pression artérielle.

Dans la seconde partie de ce travail, j'ai poursuivi mes investigations sur des CMLV en culture, afin d'évaluer plus précisément le rôle essentiel de l'Ang II dans la dérégulation du R-PTH1 vasculaire et les mécanismes impliqués. Mes résultats montrent que l'Ang II est capable d'abaisser l'expression du R-PTH1 sur des CMLV rénales provenant de rats Wistar normotendus. Pour ce faire, elle diminue la stabilité de l'ARNm du R-PTH1 sans modifier l'activité des promoteurs P1 ou P2 qui contrôlent l'activité transcriptionnelle du gène du R-PTH1. Cette déstabilisation de l'ARNm du R-PTH1 nécessite par ailleurs la présence de la PTHrP elle-même, en particulier active par la voie intracrine, qui semble agir en synergie avec l'Ang II. Sur des CMLV rénales provenant de SHR, une déstabilisation de l'ARNm du R-PTH1 a été mise en évidence dans les conditions de culture basales, où le SRA est spontanément activé et la PTHrP surexprimée. Ceci témoigne de la pertinence physiopathologique de ce processus.

L'ensemble de ce travail apporte ainsi de nouvelles données quant à la régulation du R-PTH1 vasculaire, un acteur essentiel dans les effets hémodynamiques de la PTHrP. L'Ang II, qui diminue l'expression du R-PTH1 vasculaire, joue un rôle primordial dans la dérégulation du R-PTH1 vasculaire rénal chez le SHR. La spécificité rénale de cet effet est alors probablement liée aux taux d'Ang II particulièrement importants dans le parenchyme rénal. De manière plus générale, la dérégulation du R-PTH1 pourrait être un processus général d'inactivation de la voie autocrine/paracrine de la PTHrP dans des situations physiopathologiques associant une activation du SRA et une surexpression de la PTHrP. Ceci conduirait alors à favoriser les effets nucléaires/nucléolaires de la PTHrP.

RESUME

Dérégulation de la Protéine Apparentée à l'Hormone Parathyroïde (PTHrP) et du Récepteur PTH/PTHrP (R-PTH1) dans l'Hypertension Artérielle et en réponse à l'Angiotensine II

Introduction bibliographique

Au cours des hypercalcémies humorales malignes, la protéine apparentée à l'hormone parathyroïde (PTHrP) est formée en abondance par les tumeurs, sécrétée dans la circulation et mime les effets calcitropiques de la PTH. L'homologie de séquence de leur région amino-terminale permet en effet à la PTHrP et à la PTH d'activer avec une égale affinité le récepteur PTH/PTHrP de type 1 (R-PTH1). Mais, contrairement à la PTH, la PTHrP est produite de façon ubiquitaire dans l'organisme normal. La PTHrP subit une protéolyse post-traductionnelle qui donne naissance aux PTHrP(1-36), (38-94) et (107-139), formes majeures matures de la PTHrP. Chacune de ces formes interagit probablement avec un récepteur spécifique, dont seul le R-PTH1 est actuellement bien connu. Les diverses formes de sécrétion de la PTHrP sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques au cours de la vie embryonnaire, fœtale et adulte : croissance et différenciation cellulaire, développement organique (squelette), transport du calcium et des phosphates, mais aussi la relaxation du muscle lisse vasculaire et viscéral. Dans la plupart de ces études, la PTHrP agit par la voie autocrine/paracrine. Plus récemment, une translocation du peptide vers des sites nucléaires / nucléolaires a été impliquée dans ses effets anti-apoptotiques. Cette voie intracrine met en œuvre une région consensus du peptide, dite NLS (« Nuclear Localization Sequence »). La PTHrP fait ainsi partie des rares protéines pouvant être à la fois sécrétée grâce à sa séquence prépro et ciblée vers les noyaux grâce à sa région NLS.

La PTHrP et le R-PTH1 sont exprimés dans le cœur et les vaisseaux. La PTHrP exerce des effets inotropes et chronotropes positifs, induit une hypotension et dilate les vaisseaux. Ses effets sont particulièrement marqués au niveau rénal où notre laboratoire a largement contribué à les caractériser : la PTHrP produit une relaxation concentration-dépendante *in vitro*, sur le rein isolé perfusé; elle augmente le débit sanguin rénal, le débit de filtration glomérulaire, la diurèse et la natriurèse *in vivo*, chez le rat anesthésié; ses effets vasodilatateurs intrarénaux s'expriment essentiellement sur le lit vasculaire préglomérulaire; elle stimule enfin la libération de rénine. La PTHrP exerce aussi des effets originaux sur la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV), anti-mitogéniques par la voie paracrine et mitogéniques par la voie intracrine.

Les forces d'étirement et les vasoconstricteurs dont l'angiotensine II (Ang II) stimulent l'expression de la PTHrP sur les CMLV. Or ces facteurs sont importants dans les altérations vasculaires structurales et fonctionnelles qui surviennent au cours de l'hypertension artérielle (HTA), suggérant que la PTHrP puisse y jouer un rôle. Notre laboratoire a montré précédemment, dans un modèle d'HTA génétique, que la PTHrP était surexprimée dans les vaisseaux intrarénaux chez le SHR adulte (HTA établie) comparativement au rat Wistar Kyoto (WKY) normotendu de même âge. Le R-PTH1 y était par contre sous-exprimé et la réponse vasodilatatrice rénale induite par la PTHrP réduite. Le transfert *in vivo* du gène humain du R-PTH1 restaurait l'expression du R-PTH1 dans les vaisseaux, et abaissait la résistance vasculaire rénale particulièrement élevée chez le SHR. Ces résultats montraient que le niveau d'expression du R-PTH1 était capable de moduler le tonus vasculaire rénal, contribuant ainsi probablement à l'installation et/ou au maintien de l'HTA.

Le rôle de la PTHrP endogène est difficile à cerner actuellement *in vivo* i) puisqu'il n'existe pas d'outils antagonistes adéquats, non-peptidiques, du R-PTH1, et ii) que les souris transgéniques avec invalidation des gènes de la PTHrP et/ou du R-PTH1 meurent *in utero* ou dès la naissance, de malformations osseuses. Les souris transgéniques surexprimant la PTHrP ou le R-PTH1 dans le muscle lisse ont une pression artérielle abaissée. Après surexpression du R-PTH1, la PTHrP endogène agit comme un facteur vasorelaxant modulant la réponse rénale à l'Ang II, confirmant par là que le niveau d'expression du R-PTH1 est un paramètre essentiel dans la compréhension du rôle du système PTHrP/R-PTH1 dans l'hémodynamique rénale.

L'objectif de ce travail a été de mieux comprendre la régulation du R-PTH1 vasculaire par une double approche :

1) en évaluant les caractéristiques de la dérégulation du R-PTH1 au cours d'une HTA d'origine génétique (rat spontanément hypertendu = SHR) ou induite par un traitement DOCA-sel, ainsi que les facteurs impliqués (pression artérielle élevée et/ou Ang II),

2) en analysant la régulation du R-PTH1 sur des CMLV d'origine rénale en culture, notamment en réponse à l'Ang II et au stretch mécanique; des CMLV rénales provenant de rats normotendus Wistar ont été comparées à celles de SHR.

L'ensemble de ce travail a fait appel à des techniques expérimentales très diverses, tant *in vivo* chez le rat anesthésié (débitmétrie vasculaire rénale et mésentérique), que *in vitro* sur des organes isolés (réactivité vasculaire sur le rein isolé perfusé et le mésentère isolé perfusé) et des CMLV en culture. Enfin, l'expression du R-PTH1 a été évaluée en terme d'ARNm (RT-PCR semi-quantitative puis quantitative) et de protéine (Western blot).

La dérégulation du R-PTH1 : une spécificité rénovasculaire chez le SHR adulte ?

Les résultats obtenus montrent que :

- La diminution de la réponse vasodilatatrice rénale de la PTHrP(1-36) décrite précédemment *in vitro* (rein isolé perfusé) est aussi une réalité *in vivo* chez le SHR adulte, que celui-ci soit comparé aux rats normotendus Wistar ou WKY; ceci a pu être montré chez le rat anesthésié en mesurant les variations de débit sanguin rénal lors d'une perfusion de PTHrP directement dans l'artère rénale du rein gauche, évitant ainsi les effets systémiques du peptide ;
- La vasodilatation induite par la PTHrP(1-36) sur le lit vasculaire mésentérique n'est pas altérée chez le SHR adulte, que les études soient réalisées *in vitro* ou *in vivo* ;
- La baisse de l'expression du R-PTH1 (ARNm et protéine) chez le SHR adulte est une particularité rénovasculaire ; elle n'a pas été retrouvée sur d'autres éléments du système cardio-vasculaire exposés à la même élévation de pression artérielle : vaisseaux de résistance (lit vasculaire mésentérique), artère de compliance (aorte), compartiments cardiaques (oreillette, ventricule), cortex rénal (riche en tubules proximaux et distaux, sites d'action privilégiés de la PTHrP), médulla rénale (impliquée dans la régulation de la natriurèse de pression) ;
- L'hyporéactivité vasculaire à la PTHrP diffère de celle observée avec l'isoprotérénol (*via* un autre récepteur couplé à Gs) ;
- La réponse vasodilatatrice rénale et l'expression du R-PTH1 ne sont pas modifiées chez le SHR de 4 semaines, à un stade préhypertensif, suggérant que ces altérations ne contribuent pas à l'installation de l'HTA chez le SHR ;
- Un traitement antihypertenseur par le losartan restaure un système PTHrP/R-PTH1 vasculaire rénal quasi normal chez le SHR adulte, que ce soit en terme d'expression du R-PTH1 ou de la PTHrP, ou de la vasodilatation rénale induite par la PTHrP(1-36) ; ces résultats montrent que la dérégulation du système PTHrP/R-PTH1 vasculaire rénal du SHR dépend de l'intégrité du SRA et est réversible ;
- Chez le rat DOCA-sel, un modèle d'hypertension artérielle à rénine basse, la dérégulation vasculaire rénale du R-PTH1 est absente (expression du R-PTH1 et réponse vasodilatatrice associée) mais la surexpression de la PTHrP persiste ; ce résultat montre que la dérégulation des deux partenaires du système PTHrP/R-PTH1 ne répond pas aux mêmes stimuli, l'HTA semblant suffisante pour induire une surexpression vasculaire rénale de la PTHrP, alors qu'un SRA doit intact est indispensable pour induire une sous-expression du R-PTH1.

Cette première partie de ma thèse conduit ainsi à proposer que l'Ang II soit un facteur essentiel chez le SHR dans la dérégulation du R-PTH1 et de la vasodilatation rénale associée. Nous proposons que la spécificité rénale de cette dérégulation soit liée aux concentrations en Ang II particulièrement élevées dans le parenchyme rénal. Afin de préciser le rôle fondamental de l'Ang II dans la dérégulation du R-PTH1 vasculaire, nous avons poursuivi

notre étude sur des CMLV en culture, où il est plus aisé d'analyser les facteurs de régulation dans un environnement contrôlé.

Mécanismes d'action de l'Ang II dans la dérégulation du R-PTH1

Le R-PTH1 appartient à la classe II des récepteurs couplés aux G protéines. Son activation met en jeu, selon le type cellulaire, l'une, l'autre ou les deux voies signalétiques intracellulaires de l'AC/AMPc/PKA (*via* G_s) et de PLC/IP₃/Ca⁺⁺ - DAG/PKC (*via* G_q). Au niveau des CMLV, seule la voie de AC/AMPc/PKA est impliquée et conduit uniformément à une relaxation des vaisseaux. Deux promoteurs P1 et P2 contrôlent la transcription du gène du R-PTH1 chez la souris et le rat, alors qu'un troisième promoteur (P3) s'y ajoute chez l'homme. Le promoteur P1 est spécifiquement actif dans le rein de rongeur (P1 et P3 chez l'homme), alors que l'activité du promoteur P2 est ubiquitaire.

Les études ont été conduites sur des cultures primaires de CMLV obtenues à partir d'explants d'arbres vasculaires intrarénaux et d'aortes, prélevés chez des SHR et des rats Wistar de 12 semaines (HTA établie) ou chez des souris portant un gène de la PTHrP floxé (séquences loxP de part et d'autre de l'exon 4 codant pour la plus grande partie de la PTHrP chez la souris). Ces cellules ont ensuite été utilisées au cours des passages 10 à 20. L'expression des deux partenaires du système PTHrP/R-PTH1 a été évaluée sur ces cellules à sous-confluence par RT-PCR (ARNm) et Western blot (protéine réceptrice). Puisque la PTHrP est généralement surexprimée au niveau vasculaire dans les situations où l'expression du R-PTH1 est abaissée, nous nous sommes posés la question d'une participation de la PTHrP elle-même dans cette dérégulation. La mise en culture au laboratoire de CMLRv à partir de souris « floxées » sur le gène de la PTHrP et leur transfection par la Cre recombinase (excision de la PTHrP) puis par des constructions plasmidiques comportant des cDNA de la PTHrP tronquée, nous fournissaient des outils puissants pour explorer la contribution de la PTHrP endogène dans la régulation du R-PTH1 vasculaire.

Les résultats montrent que :

- L'Ang II, *via* l'activation du récepteur AT1, diminue l'expression du R-PTH1 sur les CMLRv et les CMLAo provenant de rats Wistar ; l'effet de l'Ang II (100 nM) est maximum sur l'ARNm en 8h ; l'effet sur la protéine réceptrice atteint son maximum après 24h puis persiste au-delà de 3 jours.
- L'Ang II n'affecte pas l'activité des promoteurs P1 et P2 contrôlant la transcription du gène du R-PTH1 comme le montre nos résultats obtenus après transfections transitoires avec des constructions plasmidiques couplant respectivement l'un et l'autre promoteur du R-PTH1 au gène de la luciférase dépourvu de son propre promoteur ; l'activité des promoteurs dans différentes conditions expérimentales est alors proportionnelle à l'intensité de la lumière émise par la luciférase ;
- L'Ang II diminue la stabilité de l'ARNm du R-PTH1, évaluée en présence d'actinomycine D (5 µg/ml) ;
- La déstabilisation par l'Ang II de l'ARNm du R-PTH1 dépend de la PTHrP active par la voie intracrine ; 1) sur des CMLRv isolées à partir de souris floxées permettant l'excision de l'exon 4 codant pour la majeure partie de la PTHrP (mCMLRv PTHrP^{lox}), l'Ang II (100 nM) n'est plus capable de déréguler l'expression de l'ARNm du R-PTH1, alors que son effet perdure sur les mCMLRv contrôles ; 2) la PTHrP active par la voie autocrine/paracrine n'est pas impliquée dans cette régulation, puisque l'addition de PTHrP(1-36) exogène sur des mCMLRv PTHrP^{lox} ne la reproduit pas, et que l'antagoniste du R-PTH1, la PTHrP(7-34), ne restaure pas une expression normale du R-PTH1 sur des rCMLRv exposées à l'Ang II ; 3) des expériences de transfection de PTHrP dépourvue en séquence de localisation nucléaire (Δ NLS-PTHrP) ou en séquence signal (Δ SP-PTHrP) montrent que seule la transfection avec la PTHrP- Δ SP restaurant la voie intracrine rétablit la réponse à l'Ang II (sous-expression du R-PTH1) sur les mCMLRv PTHrP^{lox}/Cre invalidées pour la PTHrP endogène.
- L'étirement mécanique des CMLRv de rat Wistar diminue l'expression du R-PTH1 par un mécanisme qui met en jeu l'Ang II ;
- L'expression basale du R-PTH1 est abaissée sur des CMLRv de SHR comparées à des CMLRv de Wistar, en terme de protéine réceptrice ou d'ARNm ; la stabilité de l'ARNm du R-PTH1 est diminuée spontanément sur les CMLRv de SHR, où l'activation d'un SRA endogène reproduit les effets induits par l'Ang II sur des CMLRv de rats Wistar. Ces résultats montrent que la déstabilisation de l'ARNm du R-PTH1 a une pertinence physiopathologique dans des CMLRv provenant du SHR.

Ces études montrent que la PTHrP intracrine est indispensable à la déstabilisation de l'ARNm du R-PTH1 par l'Ang II, suggérant que l'Ang II et la PTHrP agissent en synergie dans ce processus. La déstabilisation du R-PTH1 en réponse au stretch mécanique, ou en réponse à l'Ang II sur des vaisseaux rénaux du SHR relève des mêmes processus (situations où la PTHrP est simultanément surexprimée). Les mécanismes moléculaires impliqués demeurent inconnus à l'heure actuelle.

Conclusions

L'ensemble de ce travail apporte ainsi de nouvelles données quant à la régulation du R-PTH1 vasculaire, un acteur essentiel dans les effets hémodynamiques de la PTHrP. L'Ang II, qui diminue l'expression du R-PTH1 vasculaire, joue un rôle primordial dans la dérégulation du R-PTH1 vasculaire rénal chez le SHR. La spécificité rénale de cet effet est alors probablement liée aux taux d'Ang II particulièrement importants dans le parenchyme rénal. De manière plus générale, la dérégulation du R-PTH1 pourrait être un processus d'inactivation de la voie autocrine/paracrine de la PTHrP dans des situations physiopathologiques associant une activation du SRA et une surexpression de la PTHrP. Ceci conduirait alors à favoriser les effets nucléaires/nucléolaires de la PTHrP.

Liste des Publications et Communications

□ Publications

S. Welsch, E. Schordan, T. Massfelder, N. Fiaschi-Taesch, A. Lambert, J.J. Helwig, M. Barthelmebs. Downregulation of type 1 PTH/PTHrP receptor is not a general feature in the cardiovascular system in hypertensive rats ? Soumis à *Hypertension*.

S. Welsch, E. Schordan, T. Massfelder, J.J. Helwig, M. Barthelmebs. Angiotensin II-induced Parathyroid Hormone (PTH)-Related Protein acts through the intracrine pathway to destabilize PTH1R mRNA in vascular smooth muscle. Soumis à *Circ Res*.

E. Schordan, **S. Welsch**, S. Rothhut, A. Lambert, M. Barthelmebs, J.J. Helwig, T. Massfelder. Role of Parathyroid Hormone-related Protein in the regulation of stretch-induced vascular smooth muscle cell proliferation. *J Am Soc Nephrol*. 2004 Dec 1; 15 (12).

S. Fritsch, V. Lindner, **S. Welsch**, T. Massfelder, M. Grima, S. Rothhut, M. Barthelmebs, J.J. Helwig. Intravenous Delivery of PTH/PTHrP Type 1 Receptor cDNA to Rats Decreases Heart Rate, Blood Pressure, Renal Tone, Renin Angiotensin System and Stress-Induced Cardiovascular Responses. *J Am Soc Nephrol*. 2004 Oct ; 15 (10): 2588-600.

T. Massfelder, H. Lang, E. Schordan, V. Lindner, S. Rothhut, **S. Welsch**, P. Simon-Assmann, M. Barthelmebs, D. Jacqmin, J.J. Helwig. Parathyroid hormone-related protein is an essential growth factor for human clear cell renal carcinoma and a target for the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene. *Cancer Res*. 2004 Jan 1;64(1):180-8.

□ Communications orales

S. Welsch, N. Taesch, T. Massfelder, J.J. Helwig, M. Barthelmebs. Reverse regulation of PTH-related protein-induced vasodilation and PTH1-receptor (PTH1-R) expression in renal and mesenteric vessels of spontaneously

hypertensive rats (SHR). 6ème Congrès Annuel de la Société Française de Pharmacologie, Rennes, 8-10 avril 2002. Abstract publié dans *Fund. Clin. Pharmacol.* 2002 (O12).

S. Welsch, T. Massfelder, J.J. Helwig, M. Barthelmebs. Modulation différentielle de la réponse dilatatrice à la PTHrP dans les lits vasculaires rénaux et mésentériques au cours de l'hypertension artérielle génétique. Congrès « Les cellules rénales et les interactions cellulaires dans les épithéliums : du gène à la physiopathologie ». Faculté de Médecine Necker, Paris, 20-21 juin 2002.

S. Welsch, E. Schordan, T. Massfelder, J.J. Helwig, M. Barthelmebs. Downregulation of renal PTHrP/PTH1R-mediated vasodilation in SHR: a primary defect in genetic hypertension? Annual PTHrP Meeting, PPP-7, Paris 8-10 juillet 2004.

□ Communications posters

S. Welsch, E. Schordan, T. Massfelder, J.J. Helwig, M. Barthelmebs. Angiotensin II but not high blood pressure is involved in the downregulation of renal vascular PTH/PTHrP receptor (PTH1R) in rats. 8ème Congrès Annuel de la Société Française de Pharmacologie, Strasbourg, 26-28 avril 2004. Abstract publié dans *Fund. Clin. Pharmacol.* 2004, 18: p 254 (P235).

E. Schordan, **S. Welsch**, M. Barthelmebs, J.J. Helwig, T. Massfelder. Role of Parathyroid Hormone-related Protein in the regulation of stretch-induced vascular smooth muscle cell proliferation. 8ème Congrès Annuel de la Société Française de Pharmacologie, Strasbourg, 26-28 avril 2004. Abstract publié dans *Fund. Clin. Pharmacol.* 2004, 18: p 254 (P180).

S. Welsch, E. Schordan, T. Massfelder, J.J. Helwig, M. Barthelmebs. Renal vessel-specific angiotensin II-mediated downregulation and promoter inactivation of type 1 PTH/PTHrP receptor (PTH1R) gene in genetic hypertension. 37th Annual Meeting of American Society of Nephrology, St Louis, Missouri, October 29th-November 1st 2004.

E. Schordan, **S. Welsch**, M. Barthelmebs, J.J. Helwig, T. Massfelder. Critical Role of Parathyroid Hormone-Related Protein (PTHrP) in Stretch-Induced Renal Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation. 37th Annual Meeting of American Society of Nephrology, St Louis, Missouri, October 29th-November 1st 2004.

Références bibliographiques

1. Massfelder T, Helwig JJ, Stewart AF. Parathyroid hormone-related protein as a cardiovascular regulatory peptide. *Endocrinology*. 1996;137:3151-3.
2. Wolzt M, Schmetterer L, Dorner G, Zelger G, Entlicher J, Kapiotis S, Eichler HG. Hemodynamic effects of parathyroid hormone-related peptide-(1-34) in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82:2548-51.
3. Strewler GJ. The physiology of parathyroid hormone-related protein. *N Engl J Med*. 2000;342:177-85.
4. Qian J, Lorenz JN, Maeda S, Sutliff RL, Weber C, Nakayama T, Colbert MC, Paul RJ, Fagin JA, Clemens TL. Reduced blood pressure and increased sensitivity of the vasculature to parathyroid hormone-related protein (PTHrP) in transgenic mice overexpressing the PTH/PTHrP receptor in vascular smooth muscle. *Endocrinology*. 1999;140:1826-33.
5. Maeda S, Sutliff RL, Qian J, Lorenz JN, Wang J, Tang H, Nakayama T, Weber C, Witte D, Strauch AR, Paul RJ, Fagin JA, Clemens TL. Targeted overexpression of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) to vascular smooth muscle in transgenic mice lowers blood pressure and alters vascular contractility. *Endocrinology*. 1999;140:1815-25.
6. Fritsch S, Lindner V, Welsch S, Massfelder T, Grima M, Rothhut S, Barthelmebs M, Helwig JJ. Intravenous delivery of PTH/PTHrP type 1 receptor cDNA to rats decreases heart rate, blood pressure, renal tone, renin angiotensin system, and stress-induced cardiovascular responses. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15:2588-600.
7. Fiaschi-Taesch N, Endlich N, Massfelder T, Endlich K, Stewart AF, Helwig JJ. Renovascular parathyroid hormone-related protein in spontaneously hypertensive rats: dilator or trophic factor? *Kidney Int Suppl*. 1998;67:S207-10.
8. Massfelder T, Taesch N, Fritsch S, Eichinger A, Barthelmebs M, Stewart AF, Helwig JJ. Type 1 parathyroid hormone receptor expression level modulates renal tone and plasma renin activity in spontaneously hypertensive rat. *J Am Soc Nephrol*. 2002;13:639-48.
9. Burtis WJ, Wu T, Bunch C, Wysolmerski JJ, Insogna KL, Weir EC, Broadus AE, Stewart AF. Identification of a novel 17,000-dalton parathyroid hormone-like adenylate cyclase-stimulating protein from a tumor associated with humoral hypercalcemia of malignancy. *J Biol Chem*. 1987;262:7151-6.
10. Moseley JM, Kubota M, Diefenbach-Jagger H, Wettenhall RE, Kemp BE, Suva LJ, Rodda CP, Ebeling PR, Hudson PJ, Zajac JD, et al. Parathyroid hormone-related protein purified from a human lung cancer cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84:5048-52.
11. Strewler GJ, Stern PH, Jacobs JW, Eveloff J, Klein RF, Leung SC, Rosenblatt M, Nissenson RA. Parathyroid hormonelike protein from human renal carcinoma cells. Structural and functional homology with parathyroid hormone. *J Clin Invest*. 1987;80:1803-7.
12. Philbrick WM, Wysolmerski JJ, Galbraith S, Holt E, Orloff JJ, Yang KH, Vasavada RC, Weir EC, Broadus AE, Stewart AF. Defining the roles of parathyroid hormone-related protein in normal physiology. *Physiol Rev*. 1996;76:127-73.
13. Gordan GS, Fitzpatrick ME, Lubich WP. Identification of osteolytic sterols in human breast cancer. *Trans Assoc Am Physicians*. 1967;80:183-9.
14. Rosenthal N, Insogna KL, Godsall JW, Smaldone L, Waldron JA, Stewart AF. Elevations in circulating 1,25-dihydroxyvitamin D in three patients with lymphoma-associated hypercalcemia. *J Clin Endocrinol Metab*. 1985;60:29-33.
15. Brenner DE, Harvey HA, Lipton A, Demers L. A study of prostaglandin E₂, parathormone, and response to indomethacin in patients with hypercalcemia of malignancy. *Cancer*. 1982;49:556-61.
16. Klein DC, Raisz LG. Prostaglandins: stimulation of bone resorption in tissue culture. *Endocrinology*. 1970;86:1436-40.
17. Stewart AF, Insogna KL, Goltzman D, Broadus AE. Identification of adenylate cyclase-stimulating activity and cytochemical glucose-6-phosphate dehydrogenase-stimulating activity in extracts of tumors from patients with humoral hypercalcemia of malignancy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983;80:1454-8.
18. Godsall JW, Burtis WJ, Insogna KL, Broadus AE, Stewart AF. Nephrogenous cyclic AMP, adenylate cyclase-stimulating activity, and the humoral hypercalcemia of malignancy. *Recent Prog Horm Res*. 1986;42:705-50.
19. Stewart AF, Horst R, Deftos LJ, Cadman EC, Lang R, Broadus AE. Biochemical evaluation of patients with cancer-associated hypercalcemia: evidence for humoral and nonhumoral groups. *N Engl J Med*. 1980;303:1377-83.
20. Strewler GJ, Williams RD, Nissenson RA. Human renal carcinoma cells produce hypercalcemia in the nude mouse and a novel protein recognized by parathyroid hormone receptors. *J Clin Invest*. 1983;71:769-74.
21. Rodan SB, Insogna KL, Vignery AM, Stewart AF, Broadus AE, D'Souza SM, Bertolini DR, Mundy GR, Rodan GA. Factors associated with humoral hypercalcemia of malignancy stimulate adenylate cyclase in osteoblastic cells. *J Clin Invest*. 1983;72:1511-5.
22. Stewart AF, Wu T, Goumas D, Burtis WJ, Broadus AE. N-terminal amino acid sequence of two novel tumor-derived adenylate cyclase-stimulating proteins: identification of parathyroid hormone-like and parathyroid hormone-unlike domains. *Biochem Biophys Res Commun*. 1987;146:672-8.
23. Suva LJ, Winslow GA, Wettenhall RE, Hammonds RG, Moseley JM, Diefenbach-Jagger H, Rodda CP, Kemp BE, Rodriguez H, Chen EY, et al. A parathyroid hormone-related protein implicated in malignant hypercalcemia: cloning and expression. *Science*. 1987;237:893-6.
24. Mangin M, Webb AC, Dreyer BE, Posillico JT, Ikeda K, Weir EC, Stewart AF, Bander NH, Milstone L, Barton DE, et al. Identification of a cDNA encoding a parathyroid hormone-like peptide from a human tumor associated with humoral hypercalcemia of malignancy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85:597-601.

25. Habener JF, Rosenblatt M, Potts JT, Jr. Parathyroid hormone: biochemical aspects of biosynthesis, secretion, action, and metabolism. *Physiol Rev.* 1984;64:985-1053.
26. Mangin M, Ikeda K, Dreyer BE, Milstone L, Broadus AE. Two distinct tumor-derived, parathyroid hormone-like peptides result from alternative ribonucleic acid splicing. *Mol Endocrinol.* 1988;2:1049-55.
27. Strewler GJ. The parathyroid hormone-related protein. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2000;29:629-45.
28. Solimando DA. Overview of hypercalcemia of malignancy. *Am J Health Syst Pharm.* 2001;58 Suppl 3:S4-7.
29. Rankin W, Grill V, Martin TJ. Parathyroid hormone-related protein and hypercalcemia. *Cancer.* 1997;80:1564-71.
30. Wysolmerski JJ, Broadus AE. Hypercalcemia of malignancy: the central role of parathyroid hormone-related protein. *Annu Rev Med.* 1994;45:189-200.
31. Broadus AE, Stewart AF. Parathyroid hormone-related protein structure, processing, and physiological actions. *The parathyroids. Basic and clinical concepts, edited by J.P. Bilezikian, New York: Raven.* 1994:259-294.
32. Gillespie MT, Martin TJ. The parathyroid hormone-related protein gene and its expression. *Mol Cell Endocrinol.* 1994;100:143-7.
33. Halloran BP, Nissenson RA. Parathyroid hormone-related protein: normal physiology and its role in cancer. *Boca Raton, FL: CRC.* 1992.
34. Strewler GJ, Nissenson RA. Parathyroid hormone-related protein. *Primer on the Metabolic and Disorders of Mineral Metabolism, edited by M. Favus, New York: Raven.* 1993:61-63.
35. Comings DE. Evidence for ancient tetraploidy and conservation of linkage groups in mammalian chromosomes. *Nature.* 1972;238:455-7.
36. Stewart AF, Broadus AE. Clinical review 16: Parathyroid hormone-related proteins: coming of age in the 1990s. *J Clin Endocrinol Metab.* 1990;71:1410-4.
37. Yasuda T, Banville D, Hendy GN, Goltzman D. Characterization of the human parathyroid hormone-like peptide gene. Functional and evolutionary aspects. *J Biol Chem.* 1989;264:7720-5.
38. Yasuda T, Banville D, Rabbani SA, Hendy GN, Goltzman D. Rat parathyroid hormone-like peptide: comparison with the human homologue and expression in malignant and normal tissue. *Mol Endocrinol.* 1989;3:518-25.
39. Mangin M, Ikeda K, Broadus AE. Structure of the mouse gene encoding parathyroid hormone-related peptide. *Gene.* 1990;95:195-202.
40. Seldin MF, Mattei MG, Hendy GN. Localization of mouse parathyroid hormone-like peptide gene (Pthlh) to distal chromosome 6 using interspecific backcross mice and in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet.* 1992;60:252-4.
41. Mangin M, Ikeda K, Dreyer BE, Broadus AE. Isolation and characterization of the human parathyroid hormone-like peptide gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86:2408-12.
42. Thiede MA, Strewler GJ, Nissenson RA, Rosenblatt M, Rodan GA. Human renal carcinoma expresses two messages encoding a parathyroid hormone-like peptide: evidence for the alternative splicing of a single-copy gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85:4605-9.
43. Vasavada RC, Wysolmerski JJ, Broadus AE, Philbrick WM. Identification and characterization of a GC-rich promoter of the human parathyroid hormone-related peptide gene. *Mol Endocrinol.* 1993;7:273-82.
44. Ganderton RH, Briggs RS. CpG island methylation and promoter usage in the parathyroid hormone-related protein gene of cultured lung cells. *Biochim Biophys Acta.* 1997;1352:303-10.
45. Bui TD, Shallal A, Malik AN, al-Mahdawi S, Moscoco G, Bailey ME, Burton PB, Moniz C. Parathyroid hormone related peptide gene expression in human fetal and adult heart. *Cardiovasc Res.* 1993;27:1204-8.
46. Chretien S, Dubart A, Beaupain D, Raich N, Grandchamp B, Rosa J, Goossens M, Romeo PH. Alternative transcription and splicing of the human porphobilinogen deaminase gene result either in tissue-specific or in housekeeping expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85:6-10.
47. Brandt DW, Wachsmann W, Defetos LJ. Parathyroid hormone-like protein: alternative messenger RNA splicing pathways in human cancer cell lines. *Cancer Res.* 1994;54:850-3.
48. Campos RV, Wang C, Drucker DJ. Regulation of parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) gene transcription: cell- and tissue-specific promoter utilization mediated by multiple positive and negative cis-acting DNA elements. *Mol Endocrinol.* 1992;6:1642-52.
49. Mangin M, Ikeda K, Dreyer BE, Broadus AE. Identification of an up-stream promoter of the human parathyroid hormone-related peptide gene. *Mol Endocrinol.* 1990;4:851-8.
50. Ikeda K, Okazaki R, Inoue D, Ogata E, Matsumoto T. Transcription of the gene for parathyroid hormone-related peptide from the human is activated through a cAMP-dependent pathway by prostaglandin E1 in HTLV-I-infected T cells. *J Biol Chem.* 1993;268:1174-9.
51. Dittmer J, Gitlin SD, Reid RL, Brady JN. Transactivation of the P2 promoter of parathyroid hormone-related protein by human T-cell lymphotropic virus type I Tax1: evidence for the involvement of transcription factor Ets1. *J Virol.* 1993;67:6087-95.
52. Dittmer J, Geggone A, Gitlin SD, Ghysdael J, Brady JN. Regulation of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) gene expression. Sp1 binds through an inverted CACCC motif and regulates promoter activity in cooperation with Ets1. *J Biol Chem.* 1994;269:21428-34.

53. Gainer H. Intracellular protein trafficking and proprotein processing: an overview. *In Mechanisms of Intracellular Trafficking and Processing of Proproteins* (Y.P. Loh, ed.) CRC Press, Boca Raton, FL. 1993:1-17.
54. Campos RV, Zhang L, Drucker DJ. Differential expression of RNA transcripts encoding unique carboxy-terminal sequences of human parathyroid hormone-related peptide. *Mol Endocrinol.* 1994;8:1656-66.
55. Ikeda K, Arnold A, Mangin M, Kinder B, Vydellingum NA, Brennan MF, Broadus AE. Expression of transcripts encoding a parathyroid hormone-related peptide in abnormal human parathyroid tissues. *J Clin Endocrinol Metab.* 1989;69:1240-8.
56. Ikeda K, Lu C, Weir EC, Mangin M, Broadus AE. Transcriptional regulation of the parathyroid hormone-related peptide gene by glucocorticoids and vitamin D in a human C-cell line. *J Biol Chem.* 1989;264:15743-6.
57. Lu C, Ikeda K, Deftos LJ, Gazdar AF, Mangin M, Broadus AE. Glucocorticoid regulation of parathyroid hormone-related peptide gene transcription in a human neuroendocrine cell line. *Mol Endocrinol.* 1989;3:2034-40.
58. Burtis WJ. Parathyroid hormone-related protein: structure, function, and measurement. *Clin Chem.* 1992;38:2171-83.
59. Karaplis AC, Yasuda T, Hendy GN, Goltzman D, Banville D. Gene-encoding parathyroid hormone-like peptide: nucleotide sequence of the rat gene and comparison with the human homologue. *Mol Endocrinol.* 1990;4:441-6.
60. Rosol TJ, Steinmeyer CL, McCauley LK, Grone A, DeWille JW, Capen CC. Sequences of the cDNAs encoding canine parathyroid hormone-related protein and parathyroid hormone. *Gene.* 1995;160:241-3.
61. Horiuchi N, Caulfield MP, Fisher JE, Goldman ME, McKee RL, Reagan JE, Levy JJ, Nutt RF, Rodan SB, Schofield TL, et al. Similarity of synthetic peptide from human tumor to parathyroid hormone in vivo and in vitro. *Science.* 1987;238:1566-8.
62. Everhart-Caye M, Inzucchi SE, Guinness-Henry J, Mitnick MA, Stewart AF. Parathyroid hormone (PTH)-related protein(1-36) is equipotent to PTH(1-34) in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81:199-208.
63. Soifer NE, Dee KE, Insogna KL, Burtis WJ, Matovcik LM, Wu TL, Milstone LM, Broadus AE, Philbrick WM, Stewart AF. Parathyroid hormone-related protein. Evidence for secretion of a novel mid-region fragment by three different cell types. *J Biol Chem.* 1992;267:18236-43.
64. Burtis WJ, Dann P, Gaich GA, Soifer NE. A high abundance midregion species of parathyroid hormone-related protein: immunological and chromatographic characterization in plasma. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994;78:317-22.
65. Plawner LL, Philbrick WM, Burtis WJ, Broadus AE, Stewart AF. Cell type-specific secretion of parathyroid hormone-related protein via the regulated versus the constitutive secretory pathway. *J Biol Chem.* 1995;270:14078-84.
66. Care AD, Abbas SK, Pickard DW, Barri M, Drinkhill M, Findlay JB, White IR, Caple IW. Stimulation of ovine placental transport of calcium and magnesium by mid-molecule fragments of human parathyroid hormone-related protein. *Exp Physiol.* 1990;75:605-8.
67. Orloff JJ, Ganz MB, Nathanson MH, Moyer MS, Kats Y, Mitnick M, Behal A, Gasalla-Herraiz J, Isaacs CM. A midregion parathyroid hormone-related peptide mobilizes cytosolic calcium and stimulates formation of inositol trisphosphate in a squamous carcinoma cell line. *Endocrinology.* 1996;137:5376-85.
68. Wu TL, Vasavada RC, Yang K, Massfelder T, Ganz M, Abbas SK, Care AD, Stewart AF. Structural and physiologic characterization of the mid-region secretory species of parathyroid hormone-related protein. *J Biol Chem.* 1996;271:24371-81.
69. Luparello C, Burtis WJ, Raue F, Birch MA, Gallagher JA. Parathyroid hormone-related peptide and 8701-BC breast cancer cell growth and invasion in vitro: evidence for growth-inhibiting and invasion-promoting effects. *Mol Cell Endocrinol.* 1995;111:225-32.
70. Luparello C, Romanotto R, Tipa A, Sirchia R, Olmo N, De Silanes IL, Turnay J, Lizarbe MA, Stewart AF. Midregion parathyroid hormone-related protein inhibits growth and invasion in vitro and tumorigenesis in vivo of human breast cancer cells. *J Bone Miner Res.* 2001;16:2173-81.
71. Henderson JE, Amizuka N, Warshawsky H, Biasotto D, Lanske BM, Goltzman D, Karaplis AC. Nucleolar localization of parathyroid hormone-related peptide enhances survival of chondrocytes under conditions that promote apoptotic cell death. *Mol Cell Biol.* 1995;15:4064-75.
72. Dittmer LS, Burton DW, Deftos LJ. Elimination of the carboxy-terminal sequences of parathyroid hormone-related protein 1-173 increases production and secretion of the truncated forms. *Endocrinology.* 1996;137:1608-17.
73. Fenton AJ, Kemp BE, Kent GN, Moseley JM, Zheng MH, Rowe DJ, Britto JM, Martin TJ, Nicholson GC. A carboxyl-terminal peptide from the parathyroid hormone-related protein inhibits bone resorption by osteoclasts. *Endocrinology.* 1991;129:1762-8.
74. Seitz PK, Zhang RW, Simmons DJ, Cooper CW. Effects of C-terminal parathyroid hormone-related peptide on osteoblasts. *Miner Electrolyte Metab.* 1995;21:180-3.
75. Valin A, Guillen C, Esbrit P. C-terminal parathyroid hormone-related protein (PTHrP) (107-139) stimulates intracellular Ca(2+) through a receptor different from the type 1 PTH/PTHrP receptor in osteoblastic osteosarcoma UMR 106 cells. *Endocrinology.* 2001;142:2752-9.
76. Esbrit P, Alvarez-Arroyo MV, De Miguel F, Martin O, Martinez ME, Caramelo C. C-terminal parathyroid hormone-related protein increases vascular endothelial growth factor in human osteoblastic cells. *J Am Soc Nephrol.* 2000;11:1085-92.
77. Burtis WJ, Fodero JP, Gaich G, Debeyssey M, Stewart AF. Preliminary characterization of circulating amino- and carboxy-terminal fragments of parathyroid hormone-related peptide in humoral hypercalcemia of malignancy. *J Clin Endocrinol Metab.* 1992;75:1110-4.
78. Petrin EM, Deftos LJ. Prostate cancers differentially express the three parathyroid hormone-related protein isoforms. *J Invest Med.* 1995;43:225A.

79. Brandt DW, Bruns ME, Bruns DE, Ferguson JE, 2nd, Burton DW, Deftos LJ. The parathyroid hormone-related protein (PTHrP) gene preferentially utilizes a GC-rich promoter and the PTHrP 1-139 coding pathway in normal human amnion. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992;189:938-43.
80. Wu TL, Soifer NE, Burtis WJ, Milstone LM, Stewart AF. Glycosylation of parathyroid hormone-related peptide secreted by human epidermal keratinocytes. *J Clin Endocrinol Metab*. 1991;73:1002-7.
81. Wenzel S, Schorr K, Degenhardt H, Frischkopf K, Kojda G, Wiesner RJ, Rosenkranz S, Piper HM, Schluter KD. TGF-beta(1) downregulates PTHrP in coronary endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol*. 2001;33:1181-90.
82. Yang KH, Stewart AF. Parathyroid hormone-related protein: the gene, its mRNA species, and protein products. *Principles of Bone Biology, Academic Press, Inc*. 1996:347-362.
83. De Miguel F, Martinez-Fernandez P, Guillen C, Valin A, Rodrigo A, Martinez ME, Esbrit P. Parathyroid hormone-related protein (107-139) stimulates interleukin-6 expression in human osteoblastic cells. *J Am Soc Nephrol*. 1999;10:796-803.
84. Grill V, Hillary J, Ho PM, Law FM, MacIsaac RJ, MacIsaac IA, Moseley JM, Martin TJ. Parathyroid hormone-related protein: a possible endocrine function in lactation. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1992;37:405-10.
85. Lippuner K, Zehnder HJ, Casez JP, Takkinen R, Jaeger P. PTH-related protein is released into the mother's bloodstream during lactation: evidence for beneficial effects on maternal calcium-phosphate metabolism. *J Bone Miner Res*. 1996;11:1394-9.
86. Anai T, Tomiyasu T, Takai N, Miyakawa I. Remission of idiopathic hypoparathyroidism during lactation: a case report. *J Obstet Gynaecol Res*. 1999;25:271-3.
87. Funk JL, Moser AH, Strewler GJ, Feingold KR, Grunfeld C. Parathyroid hormone-related protein is induced during lethal endotoxemia and contributes to endotoxin-induced mortality in rodents. *Mol Med*. 1996;2:204-10.
88. Orloff JJ, Soifer NE, Fodero JP, Dann P, Burtis WJ. Accumulation of carboxy-terminal fragments of parathyroid hormone-related protein in renal failure. *Kidney Int*. 1993;43:1371-6.
89. Kelly RB. Pathways of protein secretion in eukaryotes. *Science*. 1985;230:25-32.
90. Deftos LJ, Burton DW, Brandt DW. Parathyroid hormone-like protein is a secretory product of atrial myocytes. *J Clin Invest*. 1993;92:727-35.
91. Wysolmerski JJ, Stewart AF. The physiology of parathyroid hormone-related protein: an emerging role as a developmental factor. *Annu Rev Physiol*. 1998;60:431-60.
92. Kaiser SM, Laneuville P, Bernier SM, Rhim JS, Kremer R, Goltzman D. Enhanced growth of a human keratinocyte cell line induced by antisense RNA for parathyroid hormone-related peptide. *J Biol Chem*. 1992;267:13623-8.
93. Kaiser SM, Sebag M, Rhim JS, Kremer R, Goltzman D. Antisense-mediated inhibition of parathyroid hormone-related peptide production in a keratinocyte cell line impedes differentiation. *Mol Endocrinol*. 1994;8:139-47.
94. Fiaschi-Taesch NM, Stewart AF. Minireview: parathyroid hormone-related protein as an intracrine factor--trafficking mechanisms and functional consequences. *Endocrinology*. 2003;144:407-11.
95. Massfelder T, Dann P, Wu TL, Vasavada R, Helwig JJ, Stewart AF. Opposing mitogenic and anti-mitogenic actions of parathyroid hormone-related protein in vascular smooth muscle cells: a critical role for nuclear targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:13630-5.
96. Nguyen MT, Karaplis AC. The nucleus: a target site for parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) action. *J Cell Biochem*. 1998;70:193-9.
97. Lam MH, Briggs LJ, Hu W, Martin TJ, Gillespie MT, Jans DA. Importin beta recognizes parathyroid hormone-related protein with high affinity and mediates its nuclear import in the absence of importin alpha. *J Biol Chem*. 1999;274:7391-8.
98. de Miguel F, Fiaschi-Taesch N, Lopez-Talavera JC, Takane KK, Massfelder T, Helwig JJ, Stewart AF. The C-terminal region of PTHrP, in addition to the nuclear localization signal, is essential for the intracrine stimulation of proliferation in vascular smooth muscle cells. *Endocrinology*. 2001;142:4096-105.
99. Tovar Sepulveda VA, Shen X, Falzon M. Intracrine PTHrP protects against serum starvation-induced apoptosis and regulates the cell cycle in MCF-7 breast cancer cells. *Endocrinology*. 2002;143:596-606.
100. Maeda S, Wu S, Green J, Kim H, Bosch R, Lee I, Adams J, Clemens TL, Kurtz I. The N-terminal portion of parathyroid hormone-related protein mediates the inhibition of apical Na⁺/H⁺ exchange in opossum kidney cells. *J Am Soc Nephrol*. 1998;9:175-81.
101. Ishikawa M, Akishita M, Kozaki K, Toba K, Namiki A, Yamaguchi T, Orimo H, Ouchi Y. Amino-terminal fragment (1-34) of parathyroid hormone-related protein inhibits migration and proliferation of cultured vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*. 1998;136:59-66.
102. Gujral A, Burton DW, Terkeltaub R, Deftos LJ. Parathyroid hormone-related protein induces interleukin 8 production by prostate cancer cells via a novel intracrine mechanism not mediated by its classical nuclear localization sequence. *Cancer Res*. 2001;61:2282-8.
103. Baker PE, Fahey JV, Munck A. Prostaglandin inhibition of T-cell proliferation is mediated at two levels. *Cell Immunol*. 1981;61:52-61.
104. Ikeda K, Okazaki R, Inoue D, Ohno H, Ogata E, Matsumoto T. Interleukin-2 increases production and secretion of parathyroid hormone-related peptide by human T cell leukemia virus type I-infected T cells: possible role in hypercalcemia associated with adult T cell leukemia. *Endocrinology*. 1993;132:2551-6.

105. Chilco PJ, Leopold V, Zajac JD. Differential regulation of the parathyroid hormone-related protein gene P1 and P3 promoters by cAMP. *Mol Cell Endocrinol.* 1998;138:173-84.
106. Burton PB, Moniz C, Knight DE. Parathyroid hormone related peptide can function as an autocrine growth factor in human renal cell carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990;167:1134-8.
107. Rosol TJ, Capen CC, Danks JA, Suva LJ, Steinmeyer CL, Hayman J, Ebeling PR, Martin TJ. Identification of parathyroid hormone-related protein in canine apocrine adenocarcinoma of the anal sac. *Vet Pathol.* 1990;27:89-95.
108. Walsh CA, Bowler WB, Bilbe G, Fraser WD, Gallagher JA. Effects of PTH on PTHrP gene expression in human osteoblasts: up-regulation with the kinetics of an immediate early gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;239:155-9.
109. Kiriya T, Gillespie MT, Glatz JA, Fukumoto S, Moseley JM, Martin TJ. Transforming growth factor beta stimulation of parathyroid hormone-related protein (PTHrP): a paracrine regulator? *Mol Cell Endocrinol.* 1993;92:55-62.
110. Falzon M. DNA sequences in the rat parathyroid hormone-related peptide gene responsible for 1,25-dihydroxyvitamin D3-mediated transcriptional repression. *Mol Endocrinol.* 1996;10:672-81.
111. Sellers RS, LeRoy BE, Blomme EA, Tannehill-Gregg S, Corn S, Rosol TJ. Effects of transforming growth factor-beta1 on parathyroid hormone-related protein mRNA expression and protein secretion in canine prostate epithelial, stromal, and carcinoma cells. *Prostate.* 2004;58:366-73.
112. Sellers RS, Capen CC, Rosol TJ. Messenger RNA stability of parathyroid hormone-related protein regulated by transforming growth factor-beta1. *Mol Cell Endocrinol.* 2002;188:37-46.
113. Lindemann RK, Ballschiemier P, Nordheim A, Dittmer J. Transforming growth factor beta regulates parathyroid hormone-related protein expression in MDA-MB-231 breast cancer cells through a novel Smad/Ets synergism. *J Biol Chem.* 2001;276:46661-70.
114. Yasui T, Uemura H, Irahara M, Aono T. Effects of transforming growth factor-beta on the production of parathyroid hormone-related peptide in a human ovarian cancer cell line in vitro. *J Obstet Gynaecol Res.* 1997;23:231-8.
115. McCauley LK, Beecher CA, Melton ME, Werkmeister JR, Juppner H, Abou-Samra AB, Segre GV, Rosol TJ. Transforming growth factor-beta1 regulates steady-state PTH/PTHrP receptor mRNA levels and PTHrP binding in ROS 17/2.8 osteosarcoma cells. *Mol Cell Endocrinol.* 1994;101:331-6.
116. Southby J, Murphy LM, Martin TJ, Gillespie MT. Cell-specific and regulator-induced promoter usage and messenger ribonucleic acid splicing for parathyroid hormone-related protein. *Endocrinology.* 1996;137:1349-57.
117. Pateder DB, Ferguson CM, Ionescu AM, Schwarz EM, Rosier RN, Puzas JE, O'Keefe RJ. PTHrP expression in chick sternal chondrocytes is regulated by TGF-beta through Smad-mediated signaling. *J Cell Physiol.* 2001;188:343-51.
118. Heath JK, Southby J, Fukumoto S, O'Keefe LM, Martin TJ, Gillespie MT. Epidermal growth factor-stimulated parathyroid hormone-related protein expression involves increased gene transcription and mRNA stability. *Biochem J.* 1995;307 (Pt 1):159-67.
119. Kremer R, Karaplis AC, Henderson J, Gulliver W, Banville D, Hendy GN, Goltzman D. Regulation of parathyroid hormone-like peptide in cultured normal human keratinocytes. Effect of growth factors and 1,25 dihydroxyvitamin D3 on gene expression and secretion. *J Clin Invest.* 1991;87:884-93.
120. Allinson ET, Drucker DJ. Parathyroid hormone-like peptide shares features with members of the early response gene family: rapid induction by serum, growth factors, and cycloheximide. *Cancer Res.* 1992;52:3103-9.
121. Hongo T, Kupfer J, Enomoto H, Sharifi B, Giannella-Neto D, Forrester JS, Singer FR, Goltzman D, Hendy GN, Pirola C, et al. Abundant expression of parathyroid hormone-related protein in primary rat aortic smooth muscle cells accompanies serum-induced proliferation. *J Clin Invest.* 1991;88:1841-7.
122. Falzon M. Serum stimulation of parathyroid hormone-related peptide gene expression in ROS 17/2.8 osteosarcoma cells through transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *Endocrinology.* 1996;137:3681-8.
123. Streutker C, Drucker DJ. Rapid induction of parathyroid hormone-like peptide gene expression by sodium butyrate in a rat islet cell line. *Mol Endocrinol.* 1991;5:703-8.
124. Pirola CJ, Wang HM, Kamyar A, Wu S, Enomoto H, Sharifi B, Forrester JS, Clemens TL, Fagin JA. Angiotensin II regulates parathyroid hormone-related protein expression in cultured rat aortic smooth muscle cells through transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *J Biol Chem.* 1993;268:1987-94.
125. Pirola CJ, Wang HM, Strgacich MI, Kamyar A, Cercek B, Forrester JS, Clemens TL, Fagin JA. Mechanical stimuli induce vascular parathyroid hormone-related protein gene expression in vivo and in vitro. *Endocrinology.* 1994;134:2230-6.
126. Henderson J, Sebag M, Rhim J, Goltzman D, Kremer R. Dysregulation of parathyroid hormone-like peptide expression and secretion in a keratinocyte model of tumor progression. *Cancer Res.* 1991;51:6521-8.
127. Haq M, Kremer R, Goltzman D, Rabbani SA. A vitamin D analogue (EB1089) inhibits parathyroid hormone-related peptide production and prevents the development of malignancy-associated hypercalcemia in vivo. *J Clin Invest.* 1993;91:2416-22.
128. Liu B, Goltzman D, Rabbani SA. Regulation of parathyroid hormone-related peptide production in vitro by the rat hypercalcemic Leydig cell tumor H-500. *Endocrinology.* 1993;132:1658-64.
129. Merryman JI, Capen CC, McCauley LK, Werkmeister JR, Suter MM, Rosol TJ. Regulation of parathyroid hormone-related protein production by a squamous carcinoma cell line in vitro. *Lab Invest.* 1993;69:347-54.
130. Thiede MA, Harm SC, Hasson DM, Gardner RM. In vivo regulation of parathyroid hormone-related peptide messenger ribonucleic acid in the rat uterus by 17 beta-estradiol. *Endocrinology.* 1991;128:2317-23.

131. Motokura T, Fukumoto S, Takahashi S, Watanabe T, Matsumoto T, Igarashi T, Ogata E. Expression of parathyroid hormone-related protein in a human T cell lymphotropic virus type I-infected T cell line. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988;154:1182-8.
132. Motokura T, Fukumoto S, Matsumoto T, Takahashi S, Fujita A, Yamashita T, Igarashi T, Ogata E. Parathyroid hormone-related protein in adult T-cell leukemia-lymphoma. *Ann Intern Med.* 1989;111:484-8.
133. Watanabe T, Yamaguchi K, Takatsuki K, Osame M, Yoshida M. Constitutive expression of parathyroid hormone-related protein gene in human T cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) carriers and adult T cell leukemia patients that can be trans-activated by HTLV-1 tax gene. *J Exp Med.* 1990;172:759-65.
134. Adachi N, Yamaguchi K, Miyake Y, Honda S, Nagasaki K, Akiyama Y, Adachi I, Abe K. Parathyroid hormone-related protein is a possible autocrine growth inhibitor for lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990;166:1088-94.
135. Zajac JD, Callaghan J, Eldridge C, Diefenbach-Jagger H, Suva LJ, Hudson P, Moseley JM, Michelangeli VP, Pasquini G. Production of parathyroid hormone-related protein by a rat parathyroid cell line. *Mol Cell Endocrinol.* 1989;67:107-12.
136. Connor CS, Drees BM, Thurston A, Forte L, Hermreck AS, Hamilton JW. Bovine parathyroid tissue: a model to compare the biosynthesis and secretion of parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide. *Surgery.* 1989;106:1057-62.
137. Insogna KL, Stewart AF, Morris CA, Hough LM, Milstone LM, Centrella M. Native and a synthetic analogue of the malignancy-associated parathyroid hormone-like protein have in vitro transforming growth factor-like properties. *J Clin Invest.* 1989;83:1057-60.
138. Brandt DW, Pandol SJ, Deftos LJ. Calcium-stimulated parathyroid hormone-like protein secretion: potentiation through a protein kinase-C pathway. *Endocrinology.* 1991;128:2999-3004.
139. Sanders JL, Chattopadhyay N, Kifor O, Yamaguchi T, Brown EM. Extracellular calcium-sensing receptor (CaR) expression and its potential role in parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) secretion in the H-500 rat Leydig cell model of humoral hypercalcemia of malignancy. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;269:427-32.
140. Pang PK, Kanek T, Harvey S. Immunocytochemical distribution of PTH immunoreactivity in vertebrates brains. *Am J Physiol.* 1988;255:R643-7.
141. Massfelder T, Lang H, Schordan E, Lindner V, Rothhut S, Welsch S, Simon-Assmann P, Barthelmebs M, Jacqmin D, Helwig JJ. Parathyroid hormone-related protein is an essential growth factor for human clear cell renal carcinoma and a target for the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene. *Cancer Res.* 2004;64:180-8.
142. Schermer DT, Chan SD, Bruce R, Nissenson RA, Wood WI, Strewler GJ. Chicken parathyroid hormone-related protein and its expression during embryologic development. *J Bone Miner Res.* 1991;6:149-55.
143. van de Stolpe A, Karperien M, Lowik CW, Juppner H, Segre GV, Abou-Samra AB, de Laat SW, Defize LH. Parathyroid hormone-related peptide as an endogenous inducer of parietal endoderm differentiation. *J Cell Biol.* 1993;120:235-43.
144. Moseley JM, Hayman JA, Danks JA, Alcorn D, Grill V, Southby J, Horton MA. Immunohistochemical detection of parathyroid hormone-related protein in human fetal epithelia. *J Clin Endocrinol Metab.* 1991;73:478-84.
145. Moniz C, Burton PB, Malik AN, Dixit M, Banga JP, Nicolaidis K, Quirke P, Knight DE, McGregor AM. Parathyroid hormone-related peptide in normal human fetal development. *J Mol Endocrinol.* 1990;5:259-66.
146. Dunne FP, Lee S, Ratcliffe WA, Hutchesson AC, Bundred NJ, Heath DA. Parathyroid hormone-related protein (PTHrP) gene expression in solid tumours associated with normocalcaemia and hypercalcaemia. *J Pathol.* 1993;171:215-21.
147. Amizuka N, Warshawsky H, Henderson JE, Goltzman D, Karaplis AC. Parathyroid hormone-related peptide-depleted mice show abnormal epiphyseal cartilage development and altered endochondral bone formation. *J Cell Biol.* 1994;126:1611-23.
148. Amizuka N, Karaplis AC, Henderson JE, Warshawsky H, Lipman ML, Matsuki Y, Ejiri S, Tanaka M, Izumi N, Ozawa H, Goltzman D. Haploinsufficiency of parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) results in abnormal postnatal bone development. *Dev Biol.* 1996;175:166-76.
149. Karaplis AC, Luz A, Glowacki J, Bronson RT, Tybulewicz VL, Kronenberg HM, Mulligan RC. Lethal skeletal dysplasia from targeted disruption of the parathyroid hormone-related peptide gene. *Genes Dev.* 1994;8:277-89.
150. Weir EC, Philbrick WM, Amling M, Neff LA, Baron R, Broadus AE. Targeted overexpression of parathyroid hormone-related peptide in chondrocytes causes chondrodysplasia and delayed endochondral bone formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:10240-5.
151. Thiede MA, Rodan GA. Expression of a calcium-mobilizing parathyroid hormone-like peptide in lactating mammary tissue. *Science.* 1988;242:278-80.
152. Budayr AA, Halloran BP, King JC, Diep D, Nissenson RA, Strewler GJ. High levels of a parathyroid hormone-like protein in milk. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86:7183-5.
153. Burtis WJ, Brady TG, Orloff JJ, Erbak JB, Warrell RP, Jr., Olson BR, Wu TL, Mitnick ME, Broadus AE, Stewart AF. Immunochemical characterization of circulating parathyroid hormone-related protein in patients with humoral hypercalcemia of cancer. *N Engl J Med.* 1990;322:1106-12.
154. Yamamoto M, Fisher JE, Thiede MA, Caulfield MP, Rosenblatt M, Duong LT. Concentrations of parathyroid hormone-related protein in rat milk change with duration of lactation and interval from previous suckling, but not with milk calcium. *Endocrinology.* 1992;130:741-7.
155. Liapis H, Crouch EC, Roby J, Rader JS. In situ localization of parathyroid hormone-like protein and mRNA in intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma of the uterine cervix. *Hum Pathol.* 1993;24:1058-66.

156. Atillasoy EJ, Burtis WJ, Milstone LM. Immunohistochemical localization of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) in normal human skin. *J Invest Dermatol.* 1991;96:277-80.
157. Danks JA, Ebeling PR, Hayman J, Chou ST, Moseley JM, Dunlop J, Kemp BE, Martin TJ. Parathyroid hormone-related protein: immunohistochemical localization in cancers and in normal skin. *J Bone Miner Res.* 1989;4:273-8.
158. Hayman JA, Danks JA, Ebeling PR, Moseley JM, Kemp BE, Martin TJ. Expression of parathyroid hormone related protein in normal skin and in tumours of skin and skin appendages. *J Pathol.* 1989;158:293-6.
159. Holick MF, Ray S, Chen TC, Tian X, Persons KS. A parathyroid hormone antagonist stimulates epidermal proliferation and hair growth in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91:8014-6.
160. Nakase T, Miyaji T, Kuriyama K, Tamai N, Horiki M, Tomita T, Myoui A, Shimada K, Yoshikawa H. Immunohistochemical detection of parathyroid hormone-related peptide, Indian hedgehog, and patched in the process of endochondral ossification in the human. *Histochem Cell Biol.* 2001;116:277-84.
161. Kronenberg HM, Lee K, Lanske B, Segre GV. Parathyroid hormone-related protein and Indian hedgehog control the pace of cartilage differentiation. *J Endocrinol.* 1997;154 Suppl:S39-45.
162. Vortkamp A, Lee K, Lanske B, Segre GV, Kronenberg HM, Tabin CJ. Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science.* 1996;273:613-22.
163. Lanske B, Karaplis AC, Lee K, Luz A, Vortkamp A, Pirro A, Karperien M, Defize LH, Ho C, Mulligan RC, Abou-Samra AB, Juppner H, Segre GV, Kronenberg HM. PTH/PTHrP receptor in early development and Indian hedgehog-regulated bone growth. *Science.* 1996;273:663-6.
164. Miao D, He B, Lanske B, Bai XY, Tong XK, Hendy GN, Goltzman D, Karaplis AC. Skeletal abnormalities in Pth-null mice are influenced by dietary calcium. *Endocrinology.* 2004;145:2046-53.
165. Miao D, Li J, Xue Y, Su H, Karaplis AC, Goltzman D. Parathyroid hormone-related peptide is required for increased trabecular bone volume in parathyroid hormone-null mice. *Endocrinology.* 2004;145:3554-62.
166. Horwitz MJ, Tedesco MB, Gundberg C, Garcia-Ocana A, Stewart AF. Short-term, high-dose parathyroid hormone-related protein as a skeletal anabolic agent for the treatment of postmenopausal osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88:569-75.
167. Weir EC, Brines ML, Ikeda K, Burtis WJ, Broadus AE, Robbins RJ. Parathyroid hormone-related peptide gene is expressed in the mammalian central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87:108-12.
168. Weaver DR, Deeds JD, Lee K, Segre GV. Localization of parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) and PTH/PTHrP receptor mRNAs in rat brain. *Brain Res Mol Brain Res.* 1995;28:296-310.
169. Holt EH, Broadus AE, Brines ML. Parathyroid hormone-related peptide is produced by cultured cerebellar granule cells in response to L-type voltage-sensitive Ca²⁺ channel flux via a Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase pathway. *J Biol Chem.* 1996;271:28105-11.
170. Yamamoto S, Morimoto I, Zeki K, Ueta Y, Yamashita H, Kannan H, Eto S. Centrally administered parathyroid hormone (PTH)-related protein(1-34) but not PTH(1-34) stimulates arginine-vasopressin secretion and its messenger ribonucleic acid expression in supraoptic nucleus of the conscious rats. *Endocrinology.* 1998;139:383-8.
171. Nagao S, Seto S, Kitamura S, Akahoshi M, Kiriya T, Yano K. Central pressor effect of parathyroid hormone-related protein in conscious rats. *Brain Res.* 1998;785:75-9.
172. Kramer S, Reynolds FH, Jr., Castillo M, Valenzuela DM, Thorikay M, Sorvillo JM. Immunological identification and distribution of parathyroid hormone-like protein polypeptides in normal and malignant tissues. *Endocrinology.* 1991;128:1927-37.
173. Campos RV, Asa SL, Drucker DJ. Immunocytochemical localization of parathyroid hormone-like peptide in the rat fetus. *Cancer Res.* 1991;51:6351-7.
174. Burton PB, Knight DE. Parathyroid hormone-related peptide can regulate the growth of human lung cancer cells, and may form part of an autocrine TGF-alpha loop. *FEBS Lett.* 1992;305:228-32.
175. Senior PV, Heath DA, Beck F. Expression of parathyroid hormone-related protein mRNA in the rat before birth: demonstration by hybridization histochemistry. *J Mol Endocrinol.* 1991;6:281-90.
176. Asa SL, Henderson J, Goltzman D, Drucker DJ. Parathyroid hormone-like peptide in normal and neoplastic human endocrine tissues. *J Clin Endocrinol Metab.* 1990;71:1112-8.
177. Grone A, Werkmeister JR, Steinmeyer CL, Capen CC, Rosol TJ. Parathyroid hormone-related protein in normal and neoplastic canine tissues: immunohistochemical localization and biochemical extraction. *Vet Pathol.* 1994;31:308-15.
178. Kitazawa S, Fukase M, Kitazawa R, Takenaka A, Gotoh A, Fujita T, Maeda S. Immunohistologic evaluation of parathyroid hormone-related protein in human lung cancer and normal tissue with newly developed monoclonal antibody. *Cancer.* 1991;67:984-9.
179. Torday JS, Sanchez-Esteban J, Rubin LP. Paracrine mediators of mechanotransduction in lung development. *Am J Med Sci.* 1998;316:205-8.
180. Torday JS, Rehan VK. Stretch-stimulated surfactant synthesis is coordinated by the paracrine actions of PTHrP and leptin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002;283:L130-5.
181. Rubin LP, Kovacs CS, De Paepe ME, Tsai SW, Torday JS, Kronenberg HM. Arrested pulmonary alveolar cytodifferentiation and defective surfactant synthesis in mice missing the gene for parathyroid hormone-related protein. *Dev Dyn.* 2004;230:278-89.

182. Drucker DJ, Asa SL, Henderson J, Goltzman D. The parathyroid hormone-like peptide gene is expressed in the normal and neoplastic human endocrine pancreas. *Mol Endocrinol.* 1989;3:1589-95.
183. Gaich G, Orloff JJ, Atillasoy EJ, Burtis WJ, Ganz MB, Stewart AF. Amino-terminal parathyroid hormone-related protein: specific binding and cytosolic calcium responses in rat insulinoma cells. *Endocrinology.* 1993;132:1402-9.
184. Vasavada RC, Cavaliere C, D'Ercole AJ, Dann P, Burtis WJ, Madlener AL, Zawalich K, Zawalich W, Philbrick W, Stewart AF. Overexpression of parathyroid hormone-related protein in the pancreatic islets of transgenic mice causes islet hyperplasia, hyperinsulinemia, and hypoglycemia. *J Biol Chem.* 1996;271:1200-8.
185. Ito M, Enomoto H, Usa T, Villadolid MC, Ohtsuru A, Namba H, Sekine I, Yamashita S. Expression of parathyroid hormone related peptide in human pituitary tumours. *J Clin Pathol.* 1993;46:682-3.
186. Ikeda K, Mangin M, Dreyer BE, Webb AC, Posillico JT, Stewart AF, Bander NH, Weir EC, Insogna KL, Broadus AE. Identification of transcripts encoding a parathyroid hormone-like peptide in messenger RNAs from a variety of human and animal tumors associated with humoral hypercalcemia of malignancy. *J Clin Invest.* 1988;81:2010-4.
187. Thiede MA, Daifotis AG, Weir EC, Brines ML, Burtis WJ, Ikeda K, Dreyer BE, Garfield RE, Broadus AE. Intrauterine occupancy controls expression of the parathyroid hormone-related peptide gene in preterm rat myometrium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87:6969-73.
188. Daifotis AG, Weir EC, Dreyer BE, Broadus AE. Stretch-induced parathyroid hormone-related peptide gene expression in the rat uterus. *J Biol Chem.* 1992;267:23455-8.
189. Thiede MA, Harm SC, McKee RL, Grasser WA, Duong LT, Leach RM, Jr. Expression of the parathyroid hormone-related protein gene in the avian oviduct: potential role as a local modulator of vascular smooth muscle tension and shell gland motility during the egg-laying cycle. *Endocrinology.* 1991;129:1958-66.
190. Yamamoto M, Harm SC, Grasser WA, Thiede MA. Parathyroid hormone-related protein in the rat urinary bladder: a smooth muscle relaxant produced locally in response to mechanical stretch. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89:5326-30.
191. Ito M, Ohtsuru A, Enomoto H, Ozeki S, Nakashima M, Nakayama T, Shichijo K, Sekine I, Yamashita S. Expression of parathyroid hormone-related peptide in relation to perturbations of gastric motility in the rat. *Endocrinology.* 1994;134:1936-42.
192. Abou-Samra AB, Juppner H, Kong XF, Schipani E, Iida-Klein A, Karga H, Urena P, Gardella TF, Potts JT, Jr., Kronenberg HM, et al. Structure, function, and expression of the receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide. *Adv Nephrol Necker Hosp.* 1994;23:247-64.
193. Juppner H, Abou-Samra AB, Freeman M, Kong XF, Schipani E, Richards J, Kolakowski LF, Jr., Hock J, Potts JT, Jr., Kronenberg HM, et al. A G protein-linked receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide. *Science.* 1991;254:1024-6.
194. Schipani E, Karga H, Karaplis AC, Potts JT, Jr., Kronenberg HM, Segre GV, Abou-Samra AB, Juppner H. Identical complementary deoxyribonucleic acids encode a human renal and bone parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor. *Endocrinology.* 1993;132:2157-65.
195. Usdin TB. The PTH2 receptor and TIP39: a new peptide-receptor system. *Trends Pharmacol Sci.* 2000;21:128-30.
196. Lin HY, Harris TL, Flannery MS, Aruffo A, Kaji EH, Gorn A, Kolakowski LF, Jr., Lodish HF, Goldring SR. Expression cloning of an adenylate cyclase-coupled calcitonin receptor. *Science.* 1991;254:1022-4.
197. Gardella TJ, Juppner H. Interaction of PTH and PTHrP with their receptors. *Rev Endocr Metab Disord.* 2000;1:317-29.
198. Gardella TJ, Juppner H. Molecular properties of the PTH/PTHrP receptor. *Trends Endocrinol Metab.* 2001;12:210-7.
199. Kong XF, Schipani E, Lanske B, Joun H, Karperien M, Defize LH, Juppner H, Potts JT, Jr., Segre GV, Kronenberg HM, et al. The rat, mouse, and human genes encoding the receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide are highly homologous. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994;201:1058.
200. Gelbert L, Schipani E, Juppner H, Abou-Samra AB, Segre GV, Naylor S, Drabkin H, Heath H, 3rd. Chromosomal localization of the parathyroid hormone/parathyroid hormone-related protein receptor gene to human chromosome 3p21.1-p24.2. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994;79:1046-8.
201. Pausova Z, Bourdon J, Clayton D, Mattei MG, Seldin MF, Janicic N, Riviere M, Szpirer J, Levan G, Szpirer C, et al. Cloning of a parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor (PTHrP) cDNA from a rat osteosarcoma (UMR 106) cell line: chromosomal assignment of the gene in the human, mouse, and rat genomes. *Genomics.* 1994;20:20-6.
202. Minagawa M, Kwan MY, Bettoun JD, Mansour FW, Dassa J, Hendy GN, Goltzman D, White JH. Dissection of differentially regulated (G+C)-rich promoters of the human parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor gene. *Endocrinology.* 2000;141:2410-21.
203. Chorev M. Parathyroid hormone 1 receptor: insights into structure and function. *Receptors Channels.* 2002;8:219-42.
204. McCuaig KA, Clarke JC, White JH. Molecular cloning of the gene encoding the mouse parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91:5051-5.
205. Lee H, McCuaig KA, White JH. Structure et expression tissulaire spécifique du gène codant pour le récepteur de l'hormone parathyroïdienne. *Médecine/Sciences.* 1996;12:183-188.
206. Bettoun JD, Minagawa M, Kwan MY, Lee HS, Yasuda T, Hendy GN, Goltzman D, White JH. Cloning and characterization of the promoter regions of the human parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor gene: analysis of deoxyribonucleic acid from normal subjects and patients with pseudohypoparathyroidism type 1b. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82:1031-40.

207. Joun H, Lanske B, Karperien M, Qian F, Defize L, Abou-Samra A. Tissue-specific transcription start sites and alternative splicing of the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide (PTHrP) receptor gene: a new PTH/PTHrP receptor splice variant that lacks the signal peptide. *Endocrinology*. 1997;138:1742-9.
208. Amizuka N, Lee HS, Kwan MY, Arazani A, Warshawsky H, Hendy GN, Ozawa H, White JH, Goltzman D. Cell-specific expression of the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor gene in kidney from kidney-specific and ubiquitous promoters. *Endocrinology*. 1997;138:469-81.
209. Bettoun JD, Minagawa M, Hendy GN, Alpert LC, Goodyer CG, Goltzman D, White JH. Developmental upregulation of human parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor gene expression from conserved and human-specific promoters. *J Clin Invest*. 1998;102:958-67.
210. Bettoun JD, Kwan MY, Minagawa M, Alpert LC, Goodyer CG, Hendy GN, Goltzman D, White JH. Methylation patterns of human parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor gene promoters are established several weeks prior to onset of their function. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;267:482-7.
211. Abou-Samra AB, Uneno S, Jueppner H, Keutmann H, Potts JT, Jr., Segre GV, Nussbaum SR. Non-homologous sequences of parathyroid hormone and the parathyroid hormone related peptide bind to a common receptor on ROS 17/2.8 cells. *Endocrinology*. 1989;125:2215-7.
212. Caulfield MP, McKee RL, Goldman ME, Duong LT, Fisher JE, Gay CT, DeHaven PA, Levy JJ, Roubini E, Nutt RF, et al. The bovine renal parathyroid hormone (PTH) receptor has equal affinity for two different amino acid sequences: the receptor binding domains of PTH and PTH-related protein are located within the 14-34 region. *Endocrinology*. 1990;127:83-7.
213. Mannstadt M, Juppner H, Gardella TJ. Receptors for PTH and PTHrP: their biological importance and functional properties. *Am J Physiol*. 1999;277:F665-75.
214. Gardella TJ, Juppner H, Wilson AK, Keutmann HT, Abou-Samra AB, Segre GV, Bringhurst FR, Potts JT, Jr., Nussbaum SR, Kronenberg HM. Determinants of [Arg2]PTH-(1-34) binding and signaling in the transmembrane region of the parathyroid hormone receptor. *Endocrinology*. 1994;135:1186-94.
215. Lee K, Deeds JD, Segre GV. Expression of parathyroid hormone-related peptide and its receptor messenger ribonucleic acids during fetal development of rats. *Endocrinology*. 1995;136:453-63.
216. Shimizu M, Potts JT, Jr., Gardella TF. Minimization of parathyroid hormone. Novel amino-terminal parathyroid hormone fragments with enhanced potency in activating the type-1 parathyroid hormone receptor. *J Biol Chem*. 2000;275:21836-43.
217. Tsomaia N, Shimizu M, Shimizu N, Gardella TJ, Mierke DF. Cooperative interaction of arginine-19 and the N-terminal signaling domain in the affinity and potency of parathyroid hormone. *Biochemistry*. 2004;43:3459-70.
218. Karpf DB, Arnaud CD, Bambino T, Duffy D, King KL, Winer J, Nissenson RA. Structural properties of the renal parathyroid hormone receptor: hydrodynamic analysis and protease sensitivity. *Endocrinology*. 1988;123:2611-20.
219. Bisello A, Greenberg Z, Behar V, Rosenblatt M, Suva LJ, Chorev M. Role of glycosylation in expression and function of the human parathyroid hormone/parathyroid hormone-related protein receptor. *Biochemistry*. 1996;35:15890-5.
220. Karpf DB, Bambino T, Alford G, Nissenson RA. Features of the renal parathyroid hormone-parathyroid hormone-related protein receptor derived from structural studies of receptor fragments. *J Bone Miner Res*. 1991;6:173-82.
221. Nissenson RA, Mann E, Winer J, Teitelbaum AP, Arnaud CD. Solubilization of a guanine nucleotide-sensitive parathyroid hormone-receptor complex from canine renal cortex. *Endocrinology*. 1986;118:932-9.
222. Rodan SB, Noda M, Wesolowski G, Rosenblatt M, Rodan GA. Comparison of postreceptor effects of 1-34 human hypercalcemia factor and 1-34 human parathyroid hormone in rat osteosarcoma cells. *J Clin Invest*. 1988;81:924-7.
223. Schwindinger WF, Fredericks J, Watkins L, Robinson H, Bathon JM, Pines M, Suva LJ, Levine MA. Coupling of the PTH/PTHrP receptor to multiple G-proteins. Direct demonstration of receptor activation of Gs, Gq/11, and Gi(1) by [alpha-32P]GTP-gamma-azidoanilide photoaffinity labeling. *Endocrine*. 1998;8:201-9.
224. Sugimoto T, Kanatani M, Kaji H, Yamaguchi T, Fukase M, Chihara K. Second messenger signaling of PTH- and PTHrP-stimulated osteoclast-like cell formation from hemopoietic blast cells. *Am J Physiol*. 1993;265:E367-73.
225. Ishikawa M, Ouchi Y, Akishita M, Kozaki K, Toba K, Namiki A, Yamaguchi T, Orimo H. Immunocytochemical detection of parathyroid hormone-related protein in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994;199:547-51.
226. Henderson JE, Kremer R, Rhim JS, Goltzman D. Identification and functional characterization of adenylate cyclase-linked receptors for parathyroid hormone-like peptides on immortalized human keratinocytes. *Endocrinology*. 1992;130:449-57.
227. Takasu H, Bringhurst FR. Type-1 parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide (PTHrP) receptors activate phospholipase C in response to carboxyl-truncated analogs of PTH(1-34). *Endocrinology*. 1998;139:4293-9.
228. Takasu H, Guo J, Bringhurst FR. Dual signaling and ligand selectivity of the human PTH/PTHrP receptor. *J Bone Miner Res*. 1999;14:11-20.
229. Whitfield JF, Isaacs R, MacLean S, Morley P, Barbier JR, Willick GE. Stimulation of membrane-associated protein kinase-C activity in spleen lymphocytes by hPTH-(1-31)NH₂, its lactam derivative, [Leu27]-cyclo(Glu22-Lys26)-hPTH-(1-31)NH₂, and hPTH-(1-30)NH₂. *Cell Signal*. 1999;11:159-64.
230. Sugimoto T, Kano J, Ikeda K, Fukase M, Chihara K. Interaction of parathyroid hormone-related peptide-responsive dual signal transduction systems in osteoblastic osteosarcoma cells: role in PTHrP-induced homologous desensitization. *J Bone Miner Res*. 1993;8:451-8.
231. Sugimoto T, Chihara K. Signal transduction mechanisms of parathyroid hormone- and parathyroid hormone-related-peptide-stimulated osteoclast-like cell formation from hemopoietic blast cells. *Miner Electrolyte Metab*. 1995;21:161-5.

232. Kaji H, Sugimoto T, Kanatani M, Fukase M, Chihara K. Involvement of dual signal transduction systems in the stimulation of osteoclast-like cell formation by parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993;194:157-62.
233. Dunlay R, Hruska K. PTH receptor coupling to phospholipase C is an alternate pathway of signal transduction in bone and kidney. *Am J Physiol*. 1990;258:F223-31.
234. Fujimori A, Cheng SL, Avioli LV, Civitelli R. Structure-function relationship of parathyroid hormone: activation of phospholipase-C, protein kinase-A and -C in osteosarcoma cells. *Endocrinology*. 1992;130:29-36.
235. Takasu H, Gardella TJ, Luck MD, Potts JT, Jr., Bringham FR. Amino-terminal modifications of human parathyroid hormone (PTH) selectively alter phospholipase C signaling via the type 1 PTH receptor: implications for design of signal-specific PTH ligands. *Biochemistry*. 1999;38:13453-60.
236. Guo J, Iida-Klein A, Huang X, Abou-Samra AB, Segre GV, Bringham FR. Parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor density modulates activation of phospholipase C and phosphate transport by PTH in LLC-PK1 cells. *Endocrinology*. 1995;136:3884-91.
237. Wu S, Pirola CJ, Green J, Yamaguchi DT, Okano K, Jueppner H, Forrester JS, Fagin JA, Clemens TL. Effects of N-terminal, midregion, and C-terminal parathyroid hormone-related peptides on adenosine 3',5'-monophosphate and cytoplasmic free calcium in rat aortic smooth muscle cells and UMR-106 osteoblast-like cells. *Endocrinology*. 1993;133:2437-44.
238. Maeda S, Wu S, Jueppner H, Green J, Aragay AM, Fagin JA, Clemens TL. Cell-specific signal transduction of parathyroid hormone (PTH)-related protein through stably expressed recombinant PTH/PTHrP receptors in vascular smooth muscle cells. *Endocrinology*. 1996;137:3154-62.
239. Mahon MJ, Donowitz M, Yun CC, Segre GV. Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger regulatory factor 2 directs parathyroid hormone 1 receptor signalling. *Nature*. 2002;417:858-61.
240. Whitfield JF. Calcium signals and cancer. *Crit Rev Oncog*. 1992;3:55-90.
241. Bringham FR, Jueppner H, Guo J, Urena P, Potts JT, Jr., Kronenberg HM, Abou-Samra AB, Segre GV. Cloned, stably expressed parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptors activate multiple messenger signals and biological responses in LLC-PK1 kidney cells. *Endocrinology*. 1993;132:2090-8.
242. Friedman PA. PTH revisited. *Kidney Int Suppl*. 2004;S13-9.
243. Bockaert J, Marin P, Dumuis A, Fagni L. The 'magic tail' of G protein-coupled receptors: an anchorage for functional protein networks. *FEBS Lett*. 2003;546:65-72.
244. Murer H, Hernando N, Forster I, Biber J. Regulation of Na/Pi transporter in the proximal tubule. *Annu Rev Physiol*. 2003;65:531-42.
245. Wade JB, Welling PA, Donowitz M, Shenolikar S, Weinman EJ. Differential renal distribution of NHERF isoforms and their colocalization with NHE3, ezrin, and ROMK. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001;280:C192-8.
246. Ferguson SS. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev*. 2001;53:1-24.
247. Ferrari SL, Behar V, Chorev M, Rosenblatt M, Bisello A. Endocytosis of ligand-human parathyroid hormone receptor 1 complexes is protein kinase C-dependent and involves beta-arrestin2. Real-time monitoring by fluorescence microscopy. *J Biol Chem*. 1999;274:29968-75.
248. Vilardaga JP, Krasel C, Chauvin S, Bambino T, Lohse MJ, Nissenson RA. Internalization determinants of the parathyroid hormone receptor differentially regulate beta-arrestin/receptor association. *J Biol Chem*. 2002;277:8121-9.
249. Bisello A, Chorev M, Rosenblatt M, Monticelli L, Mierke DF, Ferrari SL. Selective ligand-induced stabilization of active and desensitized parathyroid hormone type 1 receptor conformations. *J Biol Chem*. 2002;277:38524-30.
250. Vilardaga JP, Frank M, Krasel C, Dees C, Nissenson RA, Lohse MJ. Differential conformational requirements for activation of G proteins and the regulatory proteins arrestin and G protein-coupled receptor kinase in the G protein-coupled receptor for parathyroid hormone (PTH)/PTH-related protein. *J Biol Chem*. 2001;276:33435-43.
251. Tawfeek HA, Che J, Qian F, Abou-Samra AB. Parathyroid hormone receptor internalization is independent of protein kinase A and phospholipase C activation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001;281:E545-57.
252. Qian F, Leung A, Abou-Samra A. Agonist-dependent phosphorylation of the parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor. *Biochemistry*. 1998;37:6240-6.
253. Malecz N, Bambino T, Bencsik M, Nissenson RA. Identification of phosphorylation sites in the G protein-coupled receptor for parathyroid hormone. Receptor phosphorylation is not required for agonist-induced internalization. *Mol Endocrinol*. 1998;12:1846-56.
254. Tawfeek HA, Qian F, Abou-Samra AB. Phosphorylation of the receptor for PTH and PTHrP is required for internalization and regulates receptor signaling. *Mol Endocrinol*. 2002;16:1-13.
255. Sneddon WB, Magyar CE, Willick GE, Syme CA, Galbiati F, Bisello A, Friedman PA. Ligand-selective dissociation of activation and internalization of the parathyroid hormone (PTH) receptor: conditional efficacy of PTH peptide fragments. *Endocrinology*. 2004;145:2815-23.
256. Gelber EI, Kroeze WK, Willins DL, Gray JA, Sinar CA, Hyde EG, Gurevich V, Benovic J, Roth BL. Structure and function of the third intracellular loop of the 5-hydroxytryptamine_{2A} receptor: the third intracellular loop is alpha-helical and binds purified arrestins. *J Neurochem*. 1999;72:2206-14.

257. Nakamura K, Liu X, Ascoli M. Seven non-contiguous intracellular residues of the lutropin/choriogonadotropin receptor dictate the rate of agonist-induced internalization and its sensitivity to non-visual arrestins. *J Biol Chem.* 2000;275:241-7.
258. Tawfeek HA, Abou-Samra AB. Important role for the V-type H(+)-ATPase and the Golgi apparatus in the recycling of PTH/PTHrP receptor. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2004;286:E704-10.
259. Urena P, Kong XF, Abou-Samra AB, Juppner H, Kronenberg HM, Potts JT, Jr., Segre GV. Parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor messenger ribonucleic acids are widely distributed in rat tissues. *Endocrinology.* 1993;133:617-23.
260. Abou-Samra AB, Goldsmith PK, Xie LY, Juppner H, Spiegel AM, Segre GV. Down-regulation of parathyroid (PTH)/PTH-related peptide receptor immunoreactivity and PTH binding in opossum kidney cells by PTH and dexamethasone. *Endocrinology.* 1994;135:2588-94.
261. Urena P, Iida-Klein A, Kong XF, Juppner H, Kronenberg HM, Abou-Samra AB, Segre GV. Regulation of parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor messenger ribonucleic acid by glucocorticoids and PTH in ROS 17/2.8 and OK cells. *Endocrinology.* 1994;134:451-6.
262. Fukayama S, Schipani E, Juppner H, Lanske B, Kronenberg HM, Abou-Samra AB, Bringhurst FR. Role of protein kinase-A in homologous down-regulation of parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor messenger ribonucleic acid in human osteoblast-like SaOS-2 cells. *Endocrinology.* 1994;134:1851-8.
263. Gonzalez EA, Martin KJ. Coordinate regulation of PTH/PTHrP receptors by PTH and calcitriol in UMR 106-01 osteoblast-like cells. *Kidney Int.* 1996;50:63-70.
264. Okano K, Wu S, Huang X, Pirola CJ, Juppner H, Abou-Samra AB, Segre GV, Iwasaki K, Fagin JA, Clemens TL. Parathyroid hormone (PTH)/PTH-related protein (PTHrP) receptor and its messenger ribonucleic acid in rat aortic vascular smooth muscle cells and UMR osteoblast-like cells: cell-specific regulation by angiotensin-II and PTHrP. *Endocrinology.* 1994;135:1093-9.
265. Law F, Rizzoli R, Bonjour JP. Transforming growth factor-beta modulates the parathyroid hormone-related protein-induced responses in renal epithelial cells. *Endocrinology.* 1993;133:145-51.
266. McCauley LK, Koh AJ, Beecher CA, Cui Y, Decker JD, Franceschi RT. Effects of differentiation and transforming growth factor beta 1 on PTH/PTHrP receptor mRNA levels in MC3T3-E1 cells. *J Bone Miner Res.* 1995;10:1243-55.
267. Tam VK, Clemens TL, Green J. The effect of cell-matrix interaction on parathyroid hormone (PTH) receptor binding and PTH responsiveness in proximal renal tubular cells and osteoblast-like cells. *Endocrinology.* 1998;139:3072-80.
268. Celic S, Chilco PJ, Zajac JD, Martin TJ, Findlay DM. A type I collagen substrate increases PTH/PTHrP receptor mRNA expression and suppresses PTHrP mRNA expression in UMR106-06 osteoblast-like cells. *J Endocrinol.* 1996;150:299-308.
269. Luparello C, Schilling T, Cirincione R, Pucci-Minafra I. Extracellular matrix regulation of PTHrP and PTH/PTHrP receptor in a human breast cancer cell line. *FEBS Lett.* 1999;463:265-9.
270. Sneddon WB, Barry EL, Coutermarsh BA, Gesek FA, Liu F, Friedman PA. Regulation of renal parathyroid hormone receptor expression by 1, 25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid. *Cell Physiol Biochem.* 1998;8:261-77.
271. Titus L, Jackson E, Nanes MS, Rubin JE, Catherwood BD. 1,25-dihydroxyvitamin D reduces parathyroid hormone receptor number in ROS 17/2.8 cells and prevents the glucocorticoid-induced increase in these receptors: relationship to adenylate cyclase activation. *J Bone Miner Res.* 1991;6:631-7.
272. Cros M, Silve C, Graulet AM, Morieux C, Urena P, de Vernejoul MC, Bouiziar Z. Estrogen stimulates PTHrP but not PTH/PTHrP receptor gene expression in the kidney of ovariectomized rat. *J Cell Biochem.* 1998;70:84-93.
273. Schneider HG, Allan EH, Moseley JM, Martin TJ, Findlay DM. Specific down-regulation of parathyroid hormone (PTH) receptors and responses to PTH by tumour necrosis factor alpha and retinoic acid in UMR 106-06 osteoblast-like osteosarcoma cells. *Biochem J.* 1991;280 (Pt 2):451-7.
274. Katz MS, Gutierrez GE, Mundy GR, Hymer TK, Caulfield MP, McKee RL. Tumor necrosis factor and interleukin 1 inhibit parathyroid hormone-responsive adenylate cyclase in clonal osteoblast-like cells by down-regulating parathyroid hormone receptors. *J Cell Physiol.* 1992;153:206-13.
275. Schipani E, Lanske B, Hunzelman J, Luz A, Kovacs CS, Lee K, Pirro A, Kronenberg HM, Juppner H. Targeted expression of constitutively active receptors for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide delays endochondral bone formation and rescues mice that lack parathyroid hormone-related peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:13689-94.
276. Soegiarto DW, Kiachopoulos S, Schipani E, Juppner H, Erben RG, Lanske B. Partial rescue of PTH/PTHrP receptor knockout mice by targeted expression of the Jansen transgene. *Endocrinology.* 2001;142:5303-10.
277. Blomstrand S, Claesson I, Save-Soderbergh J. A case of lethal congenital dwarfism with accelerated skeletal maturation. *Pediatr Radiol.* 1985;15:141-3.
278. Clemens TL, Cormier S, Eichinger A, Endlich K, Fiaschi-Taesch N, Fischer E, Friedman PA, Karaplis AC, Massfelder T, Rossert J, Schluter KD, Silve C, Stewart AF, Takane K, Helwig JJ. Parathyroid hormone-related protein and its receptors: nuclear functions and roles in the renal and cardiovascular systems, the placental trophoblasts and the pancreatic islets. *Br J Pharmacol.* 2001;134:1113-36.
279. Usdin TB, Gruber C, Bonner TI. Identification and functional expression of a receptor selectively recognizing parathyroid hormone, the PTH2 receptor. *J Biol Chem.* 1995;270:15455-8.
280. Usdin TB, Wang T, Hoare SR, Mezey E, Palkovits M. New members of the parathyroid hormone/parathyroid hormone receptor family: the parathyroid hormone 2 receptor and tuberoinfundibular peptide of 39 residues. *Front Neuroendocrinol.* 2000;21:349-83.

281. Usdin TB, Hilton J, Vertesi T, Harta G, Segre G, Mezey E. Distribution of the parathyroid hormone 2 receptor in rat: immunolocalization reveals expression by several endocrine cells. *Endocrinology*. 1999;140:3363-71.
282. Turner PR, Mefford S, Bambino T, Nissenson RA. Transmembrane residues together with the amino terminus limit the response of the parathyroid hormone (PTH) 2 receptor to PTH-related peptide. *J Biol Chem*. 1998;273:3830-7.
283. Hoare SR, Bonner TI, Usdin TB. Comparison of rat and human parathyroid hormone 2 (PTH2) receptor activation: PTH is a low potency partial agonist at the rat PTH2 receptor. *Endocrinology*. 1999;140:4419-25.
284. Usdin TB, Hoare SR, Wang T, Mezey E, Kowalak JA. TIP39: a new neuropeptide and PTH2-receptor agonist from hypothalamus. *Nat Neurosci*. 1999;2:941-3.
285. Jonsson KB, John MR, Gensure RC, Gardella TJ, Juppner H. Tuberoinfundibular peptide 39 binds to the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor, but functions as an antagonist. *Endocrinology*. 2001;142:704-9.
286. Hoare SR, Clark JA, Usdin TB. Molecular determinants of tuberoinfundibular peptide of 39 residues (TIP39) selectivity for the parathyroid hormone-2 (PTH2) receptor. N-terminal truncation of TIP39 reverses PTH2 receptor/PTH1 receptor binding selectivity. *J Biol Chem*. 2000;275:27274-83.
287. Behar V, Pines M, Nakamoto C, Greenberg Z, Bisello A, Stueckle SM, Bessalle R, Usdin TB, Chorev M, Rosenblatt M, Suva LJ. The human PTH2 receptor: binding and signal transduction properties of the stably expressed recombinant receptor. *Endocrinology*. 1996;137:2748-57.
288. Behar V, Nakamoto C, Greenberg Z, Bisello A, Suva LJ, Rosenblatt M, Chorev M. Histidine at position 5 is the specificity "switch" between two parathyroid hormone receptor subtypes. *Endocrinology*. 1996;137:4217-24.
289. Bisello A, Manen D, Pierroz DD, Usdin TB, Rizzoli R, Ferrari SL. Agonist-specific regulation of parathyroid hormone (PTH) receptor type 2 activity: structural and functional analysis of PTH- and tuberoinfundibular peptide (TIP) 39-stimulated desensitization and internalization. *Mol Endocrinol*. 2004;18:1486-98.
290. Gardella TJ, Luck MD, Jensen GS, Usdin TB, Juppner H. Converting parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) into a potent PTH-2 receptor agonist. *J Biol Chem*. 1996;271:19888-93.
291. Goad CP, Usdin TB, Hoare SR. Regions in rat and human parathyroid hormone (PTH) 2 receptors controlling receptor interaction with PTH and with antagonists ligands. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001;299:678-90.
292. John MR, Arai M, Rubin DA, Jonsson KB, Juppner H. Identification and characterization of the murine and human gene encoding the tuberoinfundibular peptide of 39 residues. *Endocrinology*. 2002;143:1047-57.
293. Wang T, Palkovits M, Rusnak M, Mezey E, Usdin TB. Distribution of parathyroid hormone-2 receptor-like immunoreactivity and messenger RNA in the rat nervous system. *Neuroscience*. 2000;100:629-49.
294. LaBuda CJ, Usdin TB. Tuberoinfundibular peptide of 39 residues decreases pain-related affective behavior. *Neuroreport*. 2004;15:1779-82.
295. LaBuda CJ, Dobolyi A, Usdin TB. Tuberoinfundibular peptide of 39 residues produces anxiolytic and antidepressant actions. *Neuroreport*. 2004;15:881-5.
296. Usdin TB, Bonner TI, Harta G, Mezey E. Distribution of parathyroid hormone-2 receptor messenger ribonucleic acid in rat. *Endocrinology*. 1996;137:4285-97.
297. Eichinger A, Fiaschi-Taesch N, Massfelder T, Fritsch S, Barthelmebs M, Helwig JJ. Transcript expression of the tuberoinfundibular peptide (TIP)39/PTH2 receptor system and non-PTH1 receptor-mediated tonic effects of TIP39 and other PTH2 receptor ligands in renal vessels. *Endocrinology*. 2002;143:3036-43.
298. Rubin DA, Juppner H. Zebrafish express the common parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor (PTH1R) and a novel receptor (PTH3R) that is preferentially activated by mammalian and fugu fish parathyroid hormone-related peptide. *J Biol Chem*. 1999;274:28185-90.
299. Rubin DA, Hellman P, Zon LI, Lobb CJ, Bergwitz C, Juppner H. A G protein-coupled receptor from zebrafish is activated by human parathyroid hormone and not by human or teleost parathyroid hormone-related peptide. Implications for the evolutionary conservation of calcium-regulating peptide hormones. *J Biol Chem*. 1999;274:23035-42.
300. Orloff JJ, Kats Y, Urena P, Schipani E, Vasavada RC, Philbrick WM, Behal A, Abou-Samra AB, Segre GV, Juppner H. Further evidence for a novel receptor for amino-terminal parathyroid hormone-related protein on keratinocytes and squamous carcinoma cell lines. *Endocrinology*. 1995;136:3016-23.
301. Cuthbertson RM, Kemp BE, Barden JA. Structure study of osteostatin PTHrP[Thr107](107-139). *Biochim Biophys Acta*. 1999;1432:64-72.
302. Valin A, Garcia-Ocana A, De Miguel F, Sarasa JL, Esbrit P. Antiproliferative effect of the C-terminal fragments of parathyroid hormone-related protein, PTHrP-(107-111) and (107-139), on osteoblastic osteosarcoma cells. *J Cell Physiol*. 1997;170:209-15.
303. Burton DW, Brandt DW, Deftos LJ. Parathyroid hormone-related protein in the cardiovascular system. *Endocrinology*. 1994;135:253-61.
304. Schluter K, Katzer C, Frischkopf K, Wenzel S, Taimor G, Piper HM. Expression, release, and biological activity of parathyroid hormone-related peptide from coronary endothelial cells. *Circ Res*. 2000;86:946-51.
305. Schorr K, Taimor G, Degenhardt H, Weber K, Schluter KD. Parathyroid hormone-related peptide is induced by stimulation of alpha 1A-adrenoceptors and improves resistance against apoptosis in coronary endothelial cells. *Mol Pharmacol*. 2003;63:111-8.

306. Ogino K, Ogura K, Kinugasa Y, Furuse Y, Uchida K, Shimoyama M, Kinugawa T, Osaki S, Kato M, Tomikura Y, Igawa O, Hisatome I, Bilezikian JP, Shigemasa C. Parathyroid hormone-related protein is produced in the myocardium and increased in patients with congestive heart failure. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87:4722-7.
307. Schluter KD, Weber M, Piper HM. Effects of PTH-rP(107-111) and PTH-rP(7-34) on adult cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 1997;29:3057-65.
308. Schluter K, Piper HM. Cardiovascular actions of parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide. *Cardiovasc Res.* 1998;37:34-41.
309. Qian J, Colbert MC, Witte D, Kuan CY, Gruenstein E, Osinska H, Lanske B, Kronenberg HM, Clemens TL. Midgestational lethality in mice lacking the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor is associated with abrupt cardiomyocyte death. *Endocrinology.* 2003;144:1053-61.
310. Hara M, Liu YM, Zhen L, Cohen IS, Yu H, Danilo P, Jr., Ogino K, Bilezikian JP, Rosen MR. Positive chronotropic actions of parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide are associated with increases in the current, I(f), and the slope of the pacemaker potential. *Circulation.* 1997;96:3704-9.
311. Ogino K, Burkhoff D, Bilezikian JP. The hemodynamic basis for the cardiac effects of parathyroid hormone (PTH) and PTH-related protein. *Endocrinology.* 1995;136:3024-30.
312. Nickols GA, Nana AD, Nickols MA, DiPette DJ, Asimakis GK. Hypotension and cardiac stimulation due to the parathyroid hormone-related protein, humoral hypercalcemia of malignancy factor. *Endocrinology.* 1989;125:834-41.
313. Degenhardt H, Jansen J, Schulz R, Sedding D, Braun-Dullaeus R, Schluter KD. Mechanosensitive release of parathyroid hormone-related peptide from coronary endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;283:H1489-96.
314. Jansen J, Gres P, Umschlag C, Heinzel FR, Degenhardt H, Schluter KD, Heusch G, Schulz R. Parathyroid hormone-related peptide improves contractile function of stunned myocardium in rats and pigs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;284:H49-55.
315. Noda M, Katoh T, Takuwa N, Kumada M, Kurokawa K, Takuwa Y. Synergistic stimulation of parathyroid hormone-related peptide gene expression by mechanical stretch and angiotensin II in rat aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 1994;269:17911-7.
316. Rian E, Jemtland R, Olstad OK, Endresen MJ, Grasser WA, Thiede MA, Henriksen T, Bucht E, Gautvik KM. Parathyroid hormone-related protein is produced by cultured endothelial cells: a possible role in angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994;198:740-7.
317. Isales CM, Sumpio B, Bollag RJ, Zhong Q, Ding KH, Du W, Rodriguez-Combes J, Lopez R, Rosales OR, Gasalla-Herraiz J, McCarthy R, Barrett PQ. Functional parathyroid hormone receptors are present in an umbilical vein endothelial cell line. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2000;279:E654-62.
318. Jiang B, Morimoto S, Yang J, Niinoabu T, Fukuo K, Ogihara T. Expression of parathyroid hormone/parathyroid hormone-related protein receptor in vascular endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1998;31 Suppl 1:S142-4.
319. Jiang B, Morimoto S, Fukuo K, Hirotsu A, Tamatani M, Nakahashi T, Nishibe A, Niinobu T, Hata S, Chen S, Ogihara T. Parathyroid hormone-related protein inhibits endothelin-1 production. *Hypertension.* 1996;27:360-3.
320. Collip JP, Clark EP. Further studies on the physiological action of a parathyroid hormone. *J Biol Chem.* 1925;64:485-507.
321. Mok LL, Nickols GA, Thompson JC, Cooper CW. Parathyroid hormone as a smooth muscle relaxant. *Endocr Rev.* 1989;10:420-36.
322. Bukoski RD, Ishibashi K, Bian K. Vascular actions of the calcium-regulating hormones. *Semin Nephrol.* 1995;15:536-49.
323. Roca-Cusachs A, DiPette DJ, Nickols GA. Regional and systemic hemodynamic effects of parathyroid hormone-related protein: preservation of cardiac function and coronary and renal flow with reduced blood pressure. *J Pharmacol Exp Ther.* 1991;256:110-8.
324. Noonan WT, Qian J, Stuart WD, Clemens TL, Lorenz JN. Altered renal hemodynamics in mice overexpressing the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide type 1 receptor in smooth muscle. *Endocrinology.* 2003;144:4931-8.
325. He B, Deckelbaum RA, Miao D, Lipman ML, Pollak M, Goltzman D, Karaplis AC. Tissue-specific targeting of the pthrp gene: the generation of mice with floxed alleles. *Endocrinology.* 2001;142:2070-7.
326. Metzger D, Clifford J, Chiba H, Chambon P. Conditional site-specific recombination in mammalian cells using a ligand-dependent chimeric Cre recombinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:6991-5.
327. Yamamoto S, Morimoto I, Tanaka Y, Yanagihara N, Eto S. The mutual regulation of arginine-vasopressin and PTHrP secretion in dissociated supraoptic neurons. *Endocrinology.* 2002;143:1521-9.
328. Pang PK, Yang MC, Shew R, Tenner TE, Jr. The vasorelaxant action of parathyroid hormone fragments on isolated rat tail artery. *Blood Vessels.* 1985;22:57-64.
329. Winquist RJ, Baskin EP, Vlasuk GP. Synthetic tumor-derived human hypercalcemic factor exhibits parathyroid hormone-like vasorelaxation in renal arteries. *Biochem Biophys Res Commun.* 1987;149:227-32.
330. Nickols GA, Nickols MA, Helwig JJ. Binding of parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein to vascular smooth muscle of rabbit renal microvessels. *Endocrinology.* 1990;126:721-7.
331. Ishikawa M, Ouchi Y, Han SZ, Akishita M, Kozaki K, Toba K, Namiki A, Yamaguchi T, Orimo H. Parathyroid hormone-related protein reduces cytosolic free Ca²⁺ level and tension in rat aortic smooth muscle. *Eur J Pharmacol.* 1994;269:311-7.

332. Massfelder T, Parekh N, Endlich K, Saussine C, Steinhausen M, Helwig JJ. Effect of intrarenally infused parathyroid hormone-related protein on renal blood flow and glomerular filtration rate in the anaesthetized rat. *Br J Pharmacol*. 1996;118:1995-2000.
333. Hino T, Nyby MD, Fittingoff M, Tuck ML, Brickman AS. Parathyroid hormone analogues inhibit calcium mobilization in cultured vascular cells. *Hypertension*. 1994;23:402-8.
334. Massfelder T, Stewart AF, Endlich K, Soifer N, Judes C, Helwig JJ. Parathyroid hormone-related protein detection and interaction with NO and cyclic AMP in the renovascular system. *Kidney Int*. 1996;50:1591-603.
335. Simeoni U, Massfelder T, Saussine C, Judes C, Geisert J, Helwig JJ. Involvement of nitric oxide in the vasodilatory response to parathyroid hormone-related peptide in the isolated rabbit kidney. *Clin Sci (Lond)*. 1994;86:245-9.
336. Kalinowski L, Dobrucki LW, Malinski T. Nitric oxide as a second messenger in parathyroid hormone-related protein signaling. *J Endocrinol*. 2001;170:433-40.
337. Sutliff RL, Weber CS, Qian J, Miller ML, Clemens TL, Paul RJ. Vasorelaxant properties of parathyroid hormone-related protein in the mouse: evidence for endothelium involvement independent of nitric oxide formation. *Endocrinology*. 1999;140:2077-83.
338. Nakayama T, Ohtsuru A, Enomoto H, Namba H, Ozeki S, Shibata Y, Yokota T, Nobuyoshi M, Ito M, Sekine I, et al. Coronary atherosclerotic smooth muscle cells overexpress human parathyroid hormone-related peptides. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994;200:1028-35.
339. Massfelder T, Fiaschi-Taesch N, Stewart AF, Helwig JJ. Parathyroid hormone-related peptide--a smooth muscle tone and proliferation regulatory protein. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 1998;7:27-32.
340. Massfelder T, Helwig JJ. Parathyroid hormone-related protein in cardiovascular development and blood pressure regulation. *Endocrinology*. 1999;140:1507-10.
341. Jiang B, Morimoto S, Fukuo K, Yasuda O, Chen S, Ogihara T. Role of parathyroid hormone-related protein in the proliferation of vascular smooth muscle cells. *Miner Electrolyte Metab*. 1995;21:157-60.
342. Lam MH, Olsen SL, Rankin WA, Ho PW, Martin TJ, Gillespie MT, Moseley JM. PTHrP and cell division: expression and localization of PTHrP in a keratinocyte cell line (HaCaT) during the cell cycle. *J Cell Physiol*. 1997;173:433-46.
343. Okano K, Pirola CJ, Wang HM, Forrester JS, Fagin JA, Clemens TL. Involvement of cell cycle and mitogen-activated pathways in induction of parathyroid hormone-related protein gene expression in rat aortic smooth muscle cells. *Endocrinology*. 1995;136:1782-9.
344. Lam MH, House CM, Tiganis T, Mitchelhill KI, Sarcevic B, Cures A, Ramsay R, Kemp BE, Martin TJ, Gillespie MT. Phosphorylation at the cyclin-dependent kinases site (Thr85) of parathyroid hormone-related protein negatively regulates its nuclear localization. *J Biol Chem*. 1999;274:18559-66.
345. Jans DA, Ackermann MJ, Bischoff JR, Beach DH, Peters R. p34cdc2-mediated phosphorylation at T124 inhibits nuclear import of SV-40 T antigen proteins. *J Cell Biol*. 1991;115:1203-12.
346. Soifer NE, Van Why SK, Ganz MB, Kashgarian M, Siegel NJ, Stewart AF. Expression of parathyroid hormone-related protein in the rat glomerulus and tubule during recovery from renal ischemia. *J Clin Invest*. 1993;92:2850-7.
347. Largo R, Gomez-Garre D, Santos S, Penaranda C, Blanco J, Esbrit P, Egido J. Renal expression of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) and PTH/PTHrP receptor in a rat model of tubulointerstitial damage. *Kidney Int*. 1999;55:82-90.
348. Lee K, Brown D, Urena P, Ardaillou N, Ardaillou R, Deeds J, Segre GV. Localization of parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor mRNA in kidney. *Am J Physiol*. 1996;270:F186-91.
349. Lorenzo O, Ruiz-Ortega M, Esbrit P, Ruperez M, Ortega A, Santos S, Blanco J, Ortega L, Egido J. Angiotensin II increases parathyroid hormone-related protein (PTHrP) and the type 1 PTH/PTHrP receptor in the kidney. *J Am Soc Nephrol*. 2002;13:1595-607.
350. Massfelder T, Taesch N, Endlich N, Eichinger A, Escande B, Endlich K, Barthelmebs M, Helwig JJ. Paradoxical actions of exogenous and endogenous parathyroid hormone-related protein on renal vascular smooth muscle cell proliferation: reversion in the SHR model of genetic hypertension. *Faseb J*. 2001;15:707-18.
351. Endlich N, Nobiling R, Kriz W, Endlich K. Expression and signaling of parathyroid hormone-related protein in cultured podocytes. *Exp Nephrol*. 2001;9:436-43.
352. Law F, Ferrari S, Rizzoli R, Bonjour JP. Parathyroid hormone-related protein and calcium phosphate metabolism. *Pediatr Nephrol*. 1993;7:827-33.
353. Biber J, Gisler SM, Hernando N, Wagner CA, Murer H. PDZ interactions and proximal tubular phosphate reabsorption. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004;287:F871-5.
354. Musso MJ, Barthelmebs M, Imbs JL, Plante M, Bollack C, Helwig JJ. The vasodilator action of parathyroid hormone fragments on isolated perfused rat kidney. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1989;340:246-51.
355. Endlich K, Massfelder T, Helwig JJ, Steinhausen M. Vascular effects of parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein in the split hydronephrotic rat kidney. *J Physiol*. 1995;483 (Pt 2):481-90.
356. Saussine C, Massfelder T, Pamin F, Judes C, Simeoni U, Helwig JJ. Renin stimulating properties of parathyroid hormone-related peptide in the isolated perfused rat kidney. *Kidney Int*. 1993;44:764-73.
357. Saussine C, Judes C, Massfelder T, Musso MJ, Simeoni U, Hannedouche T, Helwig JJ. Stimulatory action of parathyroid hormone on renin secretion in vitro: a study using isolated rat kidney, isolated rabbit glomeruli and superfused dispersed rat juxtaglomerular cells. *Clin Sci (Lond)*. 1993;84:11-9.

358. Usdin TB. Evidence for a parathyroid hormone-2 receptor selective ligand in the hypothalamus. *Endocrinology*. 1997;138:831-4.
359. Garcia-Ocana A, Galbraith SC, Van Why SK, Yang K, Golovyan L, Dann P, Zager RA, Stewart AF, Siegel NJ, Orloff JJ. Expression and role of parathyroid hormone-related protein in human renal proximal tubule cells during recovery from ATP depletion. *J Am Soc Nephrol*. 1999;10:238-44.
360. Garcia-Ocana A, De Miguel F, Penaranda C, Albar JP, Sarasa JL, Esbrit P. Parathyroid hormone-related protein is an autocrine modulator of rabbit proximal tubule cell growth. *J Bone Miner Res*. 1995;10:1875-84.
361. Garcia-Ocana A, Gomez-Casero E, Penaranda C, Esbrit P. Parathyroid hormone-related protein increases DNA synthesis in proximal tubule cells by cyclic AMP- and protein kinase C-dependent pathways. *Life Sci*. 1998;62:2267-73.
362. Bosch RJ, Rojo-Linares P, Torrecillas-Casamayor G, Iglesias-Cruz MC, Rodriguez-Puyol D, Rodriguez-Puyol M. Effects of parathyroid hormone-related protein on human mesangial cells in culture. *Am J Physiol*. 1999;277:E990-5.
363. Edwards RM, Contino LC, Gellai M, Brooks DP. Parathyroid hormone-1 receptor down-regulation in kidneys from rats with chronic renal failure. *Pharmacology*. 2001;62:243-7.
364. Brossard JH, Yamamoto LN, D'Amour P. Parathyroid hormone metabolites in renal failure: bioactivity and clinical implications. *Semin Dial*. 2002;15:196-201.
365. Massry SG, Smogorzewski M. PTH-PTHrP receptor in chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant*. 1998;13 Suppl 1:50-7.
366. Santos S, Bosch RJ, Ortega A, Largo R, Fernandez-Agullo T, Gazapo R, Egido J, Esbrit P. Up-regulation of parathyroid hormone-related protein in folic acid-induced acute renal failure. *Kidney Int*. 2001;60:982-95.
367. Fiaschi-Taesch NM, Santos S, Reddy V, Van Why SK, Philbrick WF, Ortega A, Esbrit P, Orloff JJ, Garcia-Ocana A. Prevention of acute ischemic renal failure by targeted delivery of growth factors to the proximal tubule in transgenic mice: the efficacy of parathyroid hormone-related protein and hepatocyte growth factor. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15:112-25.
368. Funk JL, Migliati E, Chen G, Wei H, Wilson J, Downey KJ, Mullarky PJ, Coull BM, McDonagh PF, Ritter LS. Parathyroid hormone-related protein induction in focal stroke: a neuroprotective vascular peptide. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003;284:R1021-30.
369. Ross G, Schluter KD. Cardiac-specific effects of parathyroid hormone-related peptide: Modification by aging and hypertension. *Cardiovasc Res*. 2005;66:334-44.
370. Ozeki S, Ohtsuru A, Seto S, Takeshita S, Yano H, Nakayama T, Ito M, Yokota T, Nobuyoshi M, Segre GV, Yamashita S, Yano K. Evidence that implicates the parathyroid hormone-related peptide in vascular stenosis. Increased gene expression in the intima of injured carotid arteries and human restenotic coronary lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996;16:565-75.
371. Ishikawa M, Akishita M, Kozaki K, Toba K, Namiki A, Yamaguchi T, Orimo H, Ouchi Y. Expression of parathyroid hormone-related protein in human and experimental atherosclerotic lesions: functional role in arterial intimal thickening. *Atherosclerosis*. 2000;152:97-105.
372. Fiaschi-Taesch N, Takane KK, Masters S, Lopez-Talavera JC, Stewart AF. Parathyroid-hormone-related protein as a regulator of pRb and the cell cycle in arterial smooth muscle. *Circulation*. 2004;110:177-85.
373. Martin-Ventura JL, Ortego M, Esbrit P, Hernandez-Presa MA, Ortega L, Egido J. Possible role of parathyroid hormone-related protein as a proinflammatory cytokine in atherosclerosis. *Stroke*. 2003;34:1783-9.
374. Kim S, Iwao H. Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol Rev*. 2000;52:11-34.
375. Weiss D, Sorescu D, Taylor WR. Angiotensin II and atherosclerosis. *Am J Cardiol*. 2001;87:25C-32C.
376. Urena P, Kubrusly M, Mannstadt M, Hruby M, Trinh MM, Silve C, Lacour B, Abou-Samra AB, Segre GV, Drueke T. The renal PTH/PTHrP receptor is down-regulated in rats with chronic renal failure. *Kidney Int*. 1994;45:605-11.
377. Smogorzewski M, Tian J, Massry SG. Down-regulation of PTH-PTHrP receptor of heart in CRF: role of [Ca²⁺]_i. *Kidney Int*. 1995;47:1182-6.
378. Josifovska T, Nonoguchi H, Machida K, Tomita K. Mechanisms of down-regulation of the renal parathyroid hormone receptor in rats with chronic renal failure. *Nephron Exp Nephrol*. 2003;93:e141-9.
379. Edwards RC, Ratcliffe WA, Walls J, Morrison JM, Ratcliffe JG, Holder R, Bundred NJ. Parathyroid hormone-related protein (PTHrP) in breast cancer and benign breast tissue. *Eur J Cancer*. 1995;31A:334-9.
380. Tian J, Smogorzewski M, Kedes L, Massry SG. PTH-PTHrP receptor mRNA is downregulated in chronic renal failure. *Am J Nephrol*. 1994;14:41-6.
381. Pictou ML, Moore PR, Mawer EB, Houghton D, Freemont AJ, Hutchison AJ, Gokal R, Hoyland JA. Down-regulation of human osteoblast PTH/PTHrP receptor mRNA in end-stage renal failure. *Kidney Int*. 2000;58:1440-9.
382. Chen J, Zhang J, Lin S. Down-regulation of PTH/PTHrP receptor in the kidney of patients with renal impairment. *Chin Med J (Engl)*. 1998;111:24-7.
383. Marcinkowski W, Zhang G, Smogorzewski M, Massry SG. Elevation of [Ca²⁺]_i of renal proximal tubular cells and down-regulation of mRNA of PTH-PTHrP, V1a and AT1 receptors in kidney of diabetic rats. *Kidney Int*. 1997;51:1950-5.
384. Ishida H, Suzuki K, Someya Y, Nishimura M, Sugimoto C, Goto M, Taguchi Y, Kasahara H, Kadowaki S, Imura H, et al. Possible compensatory role of parathyroid hormone-related peptide on maintenance of calcium homeostasis in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1993;129:519-24.

385. Garcia-Ocana A, Gomez-Casero E, Penaranda C, Sarasa JL, Esbrit P. Cyclosporine increases renal parathyroid hormone-related protein expression in vivo in the rat. *Transplantation*. 1998;65:860-3.
386. Horiuchi T, Yoshida T, Koshihara Y, Sakamoto H, Kanai H, Yamamoto S, Ito H. The increase of parathyroid hormone-related peptide and cytokine levels in synovial fluid of elderly rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Endocr J*. 1999;46:643-9.
387. Yoshida T, Horiuchi T, Sakamoto H, Inoue H, Takayanagi H, Nishikawa T, Yamamoto S, Koshihara Y. Production of parathyroid hormone-related peptide by synovial fibroblasts in human osteoarthritis. *FEBS Lett*. 1998;433:331-4.
388. Yoshida T, Sakamoto H, Horiuchi T, Yamamoto S, Suematsu A, Oda H, Koshihara Y. Involvement of prostaglandin E(2) in interleukin-1alpha-induced parathyroid hormone-related peptide production in synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86:3272-8.
389. Okano K, Tsukazaki T, Ohtsuru A, Osaki M, Yonekura A, Iwasaki K, Yamashita S. Expression of parathyroid hormone-related peptide in human osteoarthritis. *J Orthop Res*. 1997;15:175-80.
390. Funk JL, Krul EJ, Moser AH, Shigenaga JK, Strewler GJ, Grunfeld C, Feingold KR. Endotoxin increases parathyroid hormone-related protein mRNA levels in mouse spleen. Mediation by tumor necrosis factor. *J Clin Invest*. 1993;92:2546-52.
391. Funk JL, Lausier J, Moser AH, Shigenaga JK, Huling S, Nissenson RA, Strewler GJ, Grunfeld C, Feingold KR. Endotoxin induces parathyroid hormone-related protein gene expression in splenic stromal and smooth muscle cells, not in splenic lymphocytes. *Endocrinology*. 1995;136:3412-21.
392. Funk JL, Moser AH, Grunfeld C, Feingold KR. Parathyroid hormone-related protein is induced in the adult liver during endotoxemia and stimulates the hepatic acute phase response. *Endocrinology*. 1997;138:2665-73.
393. Ito M, Ohtsuru A. [PTH/PTHrP receptor]. *Nippon Rinsho*. 1997;55 Suppl 2:495-8.
394. Marcinkowski W, Smogorzewski M, Zhang G, Ni Z, Kedes L, Massry SG. Renal mRNA of PTH-PTHrP receptor, $[Ca^{2+}]_i$ and phosphaturic response to PTH in phosphate depletion. *Miner Electrolyte Metab*. 1997;23:48-57.
395. Masuyama R, Kajita Y, Odachi J, Uehara M, Shigematsu T, Suzuki K, Goto S. Chronic phosphorus supplementation decreases the expression of renal PTH/PTHrP receptor mRNA in rats. *Am J Nephrol*. 2000;20:491-5.
396. Kawane T, Saikatsu S, Akeno N, Abe M, Horiuchi N. Starvation-induced increase in the parathyroid hormone/PTH-related protein receptor mRNA of bone and kidney in sham-operated and thyroparathyroidectomized rats. *Eur J Endocrinol*. 1997;137:273-80.
397. Ishikawa M, Ouchi Y, Akishita M, Kozaki K, Toba K, Namiki A, Yamaguchi T, Ito H, Orimo H. Age-related decrease in the effect of parathyroid hormone-related protein on cytosolic free calcium level and tension in rat aortic smooth muscle. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1995;351:517-22.
398. Martinez P, Esbrit P, Rodrigo A, Alvarez-Arroyo MV, Martinez ME. Age-related changes in parathyroid hormone-related protein and vascular endothelial growth factor in human osteoblastic cells. *Osteoporos Int*. 2002;13:874-81.
399. Gentili C, Morelli S, De Boland AR. Characterization of PTH/PTHrP receptor in rat duodenum: Effects of ageing. *J Cell Biochem*. 2003;88:1157-67.
400. Guyton AC. Renal function curve—a key to understanding the pathogenesis of hypertension. *Hypertension*. 1987;10:1-6.
401. Cowley AW, Jr., Roman RJ. The role of the kidney in hypertension. *Jama*. 1996;275:1581-9.
402. Kawabe K, Watanabe TX, Shiono K, Sokabe H. Influence on blood pressure of renal isografts between spontaneously hypertensive and normotensive rats, utilizing the F1 hybrids. *Jpn Heart J*. 1978;19:886-94.
403. Kopf D, Waldherr R, Rettig R. Source of kidney determines blood pressure in young renal transplanted rats. *Am J Physiol*. 1993;265:F104-11.
404. Rettig R, Schmitt B, Pelz B, Speck T. The kidney and primary hypertension: contributions from renal transplantation studies in animals and humans. *J Hypertens*. 1993;11:883-91.
405. Churchill PC, Churchill MC, Bidani AK. Kidney cross transplants in Dahl salt-sensitive and salt-resistant rats. *Am J Physiol*. 1992;262:H1809-17.
406. Dahl LK, Heine M. Primary role of renal homografts in setting chronic blood pressure levels in rats. *Circ Res*. 1975;36:692-6.
407. Morgan DA, DiBona GF, Mark AL. Effects of interstrain renal transplantation on NaCl-induced hypertension in Dahl rats. *Hypertension*. 1990;15:436-42.
408. Heller J, Schubert G, Havlickova J, Thurau K. The role of the kidney in the development of hypertension: a transplantation study in the Prague hypertensive rat. *Pflugers Arch*. 1993;425:208-12.
409. Curtis JJ, Luke RG, Dustan HP, Kashgarian M, Whelchel JD, Jones P, Diethelm AG. Remission of essential hypertension after renal transplantation. *N Engl J Med*. 1983;309:1009-15.
410. Schalekamp MA, Krauss XH, Schalekamp-Kuyken MP, Kolsters G, Birkenhager WH. Studies on the mechanism of hypernatremia in essential hypertension in relation to measurements of plasma renin concentration, body fluid compartments and renal function. *Clin Sci*. 1971;41:219-31.
411. Woolfson RG, de Wardener HE. Primary renal abnormalities in hereditary hypertension. *Kidney Int*. 1996;50:717-31.
412. Mountokalakis TD. The renal consequences of arterial hypertension. *Kidney Int*. 1997;51:1639-53.
413. Zatz R, Meyer TW, Rennke HG, Brenner BM. Predominance of hemodynamic rather than metabolic factors in the pathogenesis of diabetic glomerulopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985;82:5963-7.

414. Manunta P, Del Vecchio L, Amar K, Bianchi G. Genetic determinants and renal mechanisms in essential hypertension. *J Hum Hypertens*. 1996;10:649-56.
415. Manning RD, Jr., Meng S, Tian N. Renal and vascular oxidative stress and salt-sensitivity of arterial pressure. *Acta Physiol Scand*. 2003;179:243-50.
416. Jacob HJ, Lindpaintner K, Lincoln SE, Kusumi K, Bunker RK, Mao YP, Ganten D, Dzau VJ, Lander ES. Genetic mapping of a gene causing hypertension in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Cell*. 1991;67:213-24.
417. Lindpaintner K, Hilbert P, Ganten D, Nadal-Ginard B, Inagami T, Iwai N. Molecular genetics of the SA-gene: cosegregation with hypertension and mapping to rat chromosome 1. *J Hypertens*. 1993;11:19-23.
418. Iwai N, Inagami T. Identification of a candidate gene responsible for the high blood pressure of spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 1992;10:1155-7.
419. Clemitson JR, Pratt JR, Frantz S, Sacks S, Samani NJ. Kidney specificity of rat chromosome 1 blood pressure quantitative trait locus region. *Hypertension*. 2002;40:292-7.
420. de Wardener HE. Sodium and the kidney in essential hypertension. *J Hum Hypertens*. 1996;10:645-8.
421. Yamori Y. Neural and non-neural mechanisms in spontaneous hypertension. *Clin Sci Mol Med Suppl*. 1976;3:431s-434s.
422. de Champlain J, Krakoff L, Axelrod J. Interrelationships of sodium intake, hypertension, and norepinephrine storage in the rat. *Circ Res*. 1969;24:Suppl:75-92.
423. Gavras H, Brunner HR, Laragh JH, Vaughan ED, Jr., Koss M, Cote LJ, Gavras I. Malignant hypertension resulting from deoxycorticosterone acetate and salt excess: role of renin and sodium in vascular changes. *Circ Res*. 1975;36:300-9.
424. Ruilope LM, Lahera V, Rodicio JL, Carlos Romero J. Are renal hemodynamics a key factor in the development and maintenance of arterial hypertension in humans? *Hypertension*. 1994;23:3-9.
425. Iwashina M, Hirata Y, Imai T, Sato K, Marumo F. Molecular cloning of endothelial, inducible nitric oxide synthase gene from rat aortic endothelial cell. *Eur J Biochem*. 1996;237:668-73.
426. Feng JJ, Arendshorst WJ. Enhanced renal vasoconstriction induced by vasopressin in SHR is mediated by V1 receptors. *Am J Physiol*. 1996;271:F304-13.
427. Steele TH, Gottstein JH, Challoner-Hue L, Underwood JL. Actions of angiotensin II on the isolated spontaneously hypertensive rat kidney. *Kidney Int*. 1982;21:466-70.
428. Berecek KH, Schwertschlag U, Gross F. Alterations in renal vascular resistance and reactivity in spontaneous hypertension of rats. *Am J Physiol*. 1980;238:H287-93.
429. Cowley AW, Jr., Roman RR. Countercurrent exchange in the renal medulla. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003;284:R1151.
430. Bergstrom G, Evans RG. Mechanisms underlying the antihypertensive functions of the renal medulla. *Acta Physiol Scand*. 2004;181:475-86.
431. Lassegue B, Griendling KK. Reactive oxygen species in hypertension; An update. *Am J Hypertens*. 2004;17:852-60.
432. Chatziantoniou C, Daniels FH, Arendshorst WJ. Exaggerated renal vascular reactivity to angiotensin and thromboxane in young genetically hypertensive rats. *Am J Physiol*. 1990;259:F372-82.
433. Chatziantoniou C, Arendshorst WJ. Impaired ability of prostaglandins to buffer renal vasoconstriction in genetically hypertensive rats. *Am J Physiol*. 1992;263:F573-80.
434. Chatziantoniou C, Ruan X, Arendshorst WJ. Defective G protein activation of the cAMP pathway in rat kidney during genetic hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:2924-8.
435. Smeda JS, Lee RM, Forrest JB. Structural and reactivity alterations of the renal vasculature of spontaneously hypertensive rats prior to and during established hypertension. *Circ Res*. 1988;63:518-33.
436. Kost CK, Jr., Herzer WA, Li P, Jackson EK. Vascular reactivity to angiotensin II is selectively enhanced in the kidneys of spontaneously hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 1994;269:82-8.
437. Li P, Jackson EK. Enhanced slow-pressor response to angiotensin II in spontaneously hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 1989;251:909-21.
438. Jackson EK, Herzer WA, Vyas SJ, Kost CK, Jr. Angiotensin II-induced renal vasoconstriction in genetic hypertension. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999;291:329-34.
439. Chatziantoniou C, Ruan X, Arendshorst WJ. Interactions of cAMP-mediated vasodilators with angiotensin II in rat kidney during hypertension. *Am J Physiol*. 1993;265:F845-52.
440. Jackson EK, Herzer WA. Defective modulation of angiotensin II-induced renal vasoconstriction in hypertensive rats. *Hypertension*. 1994;23:329-36.
441. Ruan X, Chatziantoniou C, Arendshorst WJ. Impaired prostaglandin E(2)/prostaglandin I(2) receptor-G(s) protein interactions in isolated renal resistance arterioles of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1999;34:1134-40.
442. Anderson WP, Kett MM, Evans RG, Alcorn D. Pre-glomerular structural changes in the renal vasculature in hypertension. *Blood Press Suppl*. 1995;2:74-80.
443. Kett MM, Alcorn D, Bertram JF, Anderson WP. Enalapril does not prevent renal arterial hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1995;25:335-42.

444. Kett MM, Anderson WP, Bertram JF, Alcorn D. Structural changes in the renal vasculature in the spontaneously hypertensive rat: no effect of angiotensin II blockade. *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl.* 1996;3:S132-5.
445. Bazan A, Van Emmelo J, Fraeyman N. G-proteins in kidneys of spontaneously hypertensive rats. *Life Sci.* 2000;66:511-20.
446. Michel MC, Farke W, Erdbrugger W, Philipp T, Brodde OE. Ontogenesis of sympathetic responsiveness in spontaneously hypertensive rats. II. Renal G proteins in male and female rats. *Hypertension.* 1994;23:653-8.
447. Marcil J, Thibault C, Anand-Srivastava MB. Enhanced expression of Gi-protein precedes the development of blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *J Mol Cell Cardiol.* 1997;29:1009-22.
448. Gurich RW, Beach RE. Abnormal regulation of renal proximal tubule Na(+)-K(+)-ATPase by G proteins in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol.* 1994;267:F1069-75.
449. White BH, Sidhu A. Increased expression of inhibitory guanine nucleotide binding proteins in membranes from renal proximal tubules, but not brain striata, of the normotensive and the spontaneously hypertensive rat. *J Hypertens.* 1996;14:1281-5.
450. Mokkalatti R, Vyas SJ, Jackson EK. G protein mRNA expression in renal microvessels from spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *Am J Physiol.* 1997;273:F877-82.
451. Vyas SJ, Mokkalatti R, Dubey RK, Chinoy MR, Jackson EK. Guanine nucleotide-binding inhibitory protein-mediated inhibition of adenylyl cyclase is enhanced in spontaneously hypertensive rat preglomerular arteriolar smooth muscle cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998;285:828-34.
452. Clark CJ, Milligan G, McLellan AR, Connell JM. Guanine nucleotide regulatory proteins in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension.* 1993;21:204-9.
453. Thibault C, Anand-Srivastava MB. Altered expression of G-protein mRNA in spontaneously hypertensive rats. *FEBS Lett.* 1992;313:160-4.
454. Anand-Srivastava MB. G-proteins and adenylyl cyclase signalling in hypertension. *Mol Cell Biochem.* 1996;157:163-70.
455. Feldman RD, Tan CM, Chorazyczewski J. G protein alterations in hypertension and aging. *Hypertension.* 1995;26:725-32.
456. Diez J, Fortuno MA, Zalba G, Etayo JC, Fortuno A, Ravassa S, Beaumont J. Altered regulation of smooth muscle cell proliferation and apoptosis in small arteries of spontaneously hypertensive rats. *Eur Heart J.* 1998;19 Suppl G:G29-33.
457. Hadrava V, Kruppa U, Russo RC, Lacourciere Y, Tremblay J, Hamet P. Vascular smooth muscle cell proliferation and its therapeutic modulation in hypertension. *Am Heart J.* 1991;122:1198-203.
458. Hadrava V, Tremblay J, Sekaly RP, Hamet P. Accelerated entry of aortic smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats into the S phase of the cell cycle. *Biochem Cell Biol.* 1992;70:599-604.
459. Hamada M, Nishio I, Baba A, Fukuda K, Takeda J, Ura M, Hano T, Kuchii M, Masuyama Y. Enhanced DNA synthesis of cultured vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. Difference of response to growth factor, intracellular free calcium concentration and DNA synthesizing cell cycle. *Atherosclerosis.* 1990;81:191-8.
460. Kuriyama S, Nakamura K, Kaguchi Y, Tomonari H, Tokutome G, Hashimoto T, Sakai O. Differential effects of antihypertensive agents on proliferation of vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Jpn Heart J.* 1991;32:835-41.
461. Kuriyama S, Horiguchi M, Hashimoto T, Sakai O. A greater stimulation of vascular smooth muscle cell proliferation by serum from spontaneously hypertensive rats. *Acta Cardiol.* 1992;47:305-9.
462. Scott-Burden T, Resink TJ, Buhler FR. Enhanced growth and growth factor responsiveness of vascular smooth muscle cells from hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1989;14 Suppl 6:S16-21.
463. Saltis J, Agrotis A, Bobik A. TGF-beta 1 potentiates growth factor-stimulated proliferation of vascular smooth muscle cells in genetic hypertension. *Am J Physiol.* 1992;263:C420-8.
464. Lassegue B, Clempus RE. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003;285:R277-97.
465. Cai H, Griendling KK, Harrison DG. The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. *Trends Pharmacol Sci.* 2003;24:471-8.
466. Cuzzocrea S, Mazzon E, Dugo L, Di Paola R, Caputi AP, Salvemini D. Superoxide: a key player in hypertension. *Faseb J.* 2004;18:94-101.
467. Li JM, Shah AM. Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004;287:R1014-30.
468. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res.* 2000;87:840-4.
469. Touyz RM. Reactive oxygen species in vascular biology: role in arterial hypertension. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2003;1:91-106.
470. Touyz RM, Wu XH, He G, Salomon S, Schiffrin EL. Increased angiotensin II-mediated Src signaling via epidermal growth factor receptor transactivation is associated with decreased C-terminal Src kinase activity in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 2002;39:479-85.
471. Touyz RM, Yao G, Quinn MT, Pagano PJ, Schiffrin EL. p47phox Associates With the Cytoskeleton Through Cortactin in Human Vascular Smooth Muscle Cells. Role in NAD(P)H Oxidase Regulation by Angiotensin II. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004.
472. Suzuki Y, Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Esteban V, Egido J. Inflammation and angiotensin II. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003;35:881-900.

473. Suzuki H, Swee A, Zweifach BW, Schmid-Schonbein GW. In vivo evidence for microvascular oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. Hydroethidine microfluorography. *Hypertension*. 1995;25:1083-9.
474. Kerr S, Brosnan MJ, McIntyre M, Reid JL, Dominiczak AF, Hamilton CA. Superoxide anion production is increased in a model of genetic hypertension: role of the endothelium. *Hypertension*. 1999;33:1353-8.
475. Chabrashvili T, Tojo A, Onozato ML, Kitiyakara C, Quinn MT, Fujita T, Welch WJ, Wilcox CS. Expression and cellular localization of classic NADPH oxidase subunits in the spontaneously hypertensive rat kidney. *Hypertension*. 2002;39:269-74.
476. Adler S, Huang H. Oxidant stress in kidneys of spontaneously hypertensive rats involves both oxidase overexpression and loss of extracellular superoxide dismutase. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004;287:F907-13.
477. Grunfeld S, Hamilton CA, Mesaros S, McClain SW, Dominiczak AF, Bohr DF, Malinski T. Role of superoxide in the depressed nitric oxide production by the endothelium of genetically hypertensive rats. *Hypertension*. 1995;26:854-7.
478. Schnackenberg CG, Welch WJ, Wilcox CS. Normalization of blood pressure and renal vascular resistance in SHR with a membrane-permeable superoxide dismutase mimetic: role of nitric oxide. *Hypertension*. 1998;32:59-64.
479. Schnackenberg CG, Wilcox CS. Two-week administration of tempol attenuates both hypertension and renal excretion of 8-Iso prostaglandin f₂alpha. *Hypertension*. 1999;33:424-8.
480. Zhan CD, Sindhu RK, Pang J, Ehdaie A, Vaziri ND. Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in the spontaneously hypertensive rat kidney: effect of antioxidant-rich diet. *J Hypertens*. 2004;22:2025-33.
481. Welch WJ, Wilcox CS. AT1 receptor antagonist combats oxidative stress and restores nitric oxide signaling in the SHR. *Kidney Int*. 2001;59:1257-63.
482. Chatziantoniou C, Arendshorst WJ. Angiotensin and thromboxane in genetically hypertensive rats: renal blood flow and receptor studies. *Am J Physiol*. 1991;261:F238-47.
483. Stegbauer J, Oberhauser V, Vonend O, Rump LC. Angiotensin-(1-7) modulates vascular resistance and sympathetic neurotransmission in kidneys of spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res*. 2004;61:352-9.
484. Tamura K, Umemura S, Nyui N, Yamakawa T, Yamaguchi S, Ishigami T, Tanaka S, Tanimoto K, Takagi N, Sekihara H, Murakami K, Ishii M. Tissue-specific regulation of angiotensinogen gene expression in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1996;27:1216-23.
485. Campbell DJ, Duncan AM, Kladis A, Harrap SB. Angiotensin peptides in spontaneously hypertensive and normotensive Donryu rats. *Hypertension*. 1995;25:928-34.
486. Navar LG. The intrarenal renin-angiotensin system in hypertension. *Kidney Int*. 2004;65:1522-32.
487. Navar LG, Nishiyama A. Why are angiotensin concentrations so high in the kidney? *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2004;13:107-15.
488. Rodriguez-Iturbe B, Quiroz Y, Ferrebuz A, Parra G, Vaziri ND. Evolution of Renal Interstitial Inflammation and NF-kappaB Activation in Spontaneously Hypertensive Rats. *Am J Nephrol*. 2004;24:587-594.
489. Nyui N, Tamura K, Yamaguchi S, Nakamaru M, Ishigami T, Yabana M, Kihara M, Ochiai H, Miyazaki N, Umemura S, Ishii M. Tissue angiotensinogen gene expression induced by lipopolysaccharide in hypertensive rats. *Hypertension*. 1997;30:859-67.
490. Grima M, Welsch C, Giesen-Crouse EM, Coquard C, Barthelmebs M, Imbs JL. Age-related variations in tissue angiotensin converting enzyme activities: comparison between spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *J Hypertens*. 1990;8:697-702.
491. Matsushima Y, Kawamura M, Akabane S, Imanishi M, Kuramochi M, Ito K, Omae T. Increases in renal angiotensin II content and tubular angiotensin II receptors in prehypertensive spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 1988;6:791-6.
492. Pratt RE, Zou WM, Naftilan AJ, Ingelfinger JR, Dzau VJ. Altered sodium regulation of renal angiotensinogen mRNA in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol*. 1989;256:F469-74.
493. Correa FM, Viswanathan M, Ciuffo GM, Tsutsumi K, Saavedra JM. Kidney angiotensin II receptors and converting enzyme in neonatal and adult Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *Peptides*. 1995;16:19-24.
494. Garcia de la Torre N, Wass JA, Turner HE. Parathyroid adenomas and cardiovascular risk. *Endocr Relat Cancer*. 2003;10:309-22.
495. Lumachi F, Ermani M, Luisetto G, Nardi A, Basso SM, Camozzi V, Favia G. Relationship between serum parathyroid hormone, serum calcium and arterial blood pressure in patients with primary hyperparathyroidism: results of a multivariate analysis. *Eur J Endocrinol*. 2002;146:643-7.
496. Gennari C, Nami R, Gonnelli S. Hypertension and primary hyperparathyroidism: the role of adrenergic and renin-angiotensin-aldosterone systems. *Miner Electrolyte Metab*. 1995;21:77-81.
497. Kosch M, Hausberg M, Vormbrock K, Kisters K, Gabriels G, Rahn KH, Barenbrock M. Impaired flow-mediated vasodilation of the brachial artery in patients with primary hyperparathyroidism improves after parathyroidectomy. *Cardiovasc Res*. 2000;47:813-8.
498. Kosch M, Hausberg M, Vormbrock K, Kisters K, Rahn KH, Barenbrock M. Studies on flow-mediated vasodilation and intima-media thickness of the brachial artery in patients with primary hyperparathyroidism. *Am J Hypertens*. 2000;13:759-64.
499. Grobbee DE, Hackeng WH, Birkenhager JC, Hofman A. Raised plasma intact parathyroid hormone concentrations in young people with mildly raised blood pressure. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1988;296:814-6.

500. Jespersen B, Randlov A, Abrahamsen J, Fogh-Andersen N, Kanstrup IL. Effects of PTH(1-34) on blood pressure, renal function, and hormones in essential hypertension: the altered pattern of reactivity may counteract raised blood pressure. *Am J Hypertens*. 1997;10:1356-67.
501. Pang PK, Lewanczuk RZ. Parathyroid origin of a new circulating hypertensive factor in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens*. 1989;2:898-902.
502. Sutherland SK, Benishin CG. Regulation of parathyroid hypertensive factor secretion by Ca²⁺ in spontaneously hypertensive rat parathyroid cells. *Am J Hypertens*. 2004;17:266-72.
503. Noda M, Katoh T, Kurokawa K, Takuwa Y. Increased expression of parathyroid hormone-related peptide gene in blood vessels of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1997;30:1284-8.
504. Takahashi K, Inoue D, Ando K, Matsumoto T, Ikeda K, Fujita T. Parathyroid hormone-related peptide as a locally produced vasorelaxant: regulation of its mRNA by hypertension in rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;208:447-55.
505. Garcia SI, Clemens TL, Fagin JA, Finkielman S, Pirola CJ. Parathyroid hormone-related protein expression in vascular smooth muscle of spontaneously hypertensive rats: evidence for lack of response to angiotensin II. *J Hypertens*. 1998;16:1467-74.
506. Schmidt M, Imbs JL. [The isolated perfused rat kidney]. *J Pharmacol*. 1981;12:103-9.
507. McGregor DD. The Effect of Sympathetic Nerve Stimulation of Vasoconstrictor Responses in Perfused Mesenteric Blood Vessels of the Rat. *J Physiol*. 1965;177:21-30.
508. Namiranian K, Samini M, Mehr SE, Gaskari SA, Rastegar H, Homayoun H, Dehpour AR. Mesenteric vascular bed responsiveness in bile duct-ligated rats: roles of opioid and nitric oxide systems. *Eur J Pharmacol*. 2001;423:185-93.
509. Parekh N. A novel method for infusing drugs continuously into the renal artery of rats. *Am J Physiol*. 1995;268:F967-71.
510. Rizzoni D, Porteri E, Bettoni G, Piccoli A, Castellano M, Muiesan ML, Pasini G, Guelfi D, Rosei EA. Effects of candesartan cilexetil and enalapril on structural alterations and endothelial function in small resistance arteries of spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1998;32:798-806.
511. Rahmouni K, Barthelmebs M, Grima M, Imbs JL, De Jong W. Cardiovascular and renal effects of central administration of a mineralocorticoid receptor antagonist in conscious female rats. *Eur J Pharmacol*. 1999;385:199-202.
512. Endlich N, Endlich K, Taesch N, Helwig JJ. Culture of vascular smooth muscle cells from small arteries of the rat kidney. *Kidney Int*. 2000;57:2468-75.
513. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193:265-75.
514. DiPette DJ, Christenson W, Nickols MA, Nickols GA. Cardiovascular responsiveness to parathyroid hormone (PTH) and PTH-related protein in genetic hypertension. *Endocrinology*. 1992;130:2045-51.
515. Kurtz TW, Morris RC, Jr. Biological variability in Wistar-Kyoto rats. Implications for research with the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*. 1987;10:127-31.
516. Clark CJ, Milligan G, McLellan AR, Connell JM. Guanine nucleotide regulatory protein levels and function in spontaneously hypertensive rat vascular smooth-muscle cells. *Biochim Biophys Acta*. 1992;1136:290-6.
517. Asano M, Masuzawa K, Matsuda T, Asano T. Reduced function of the stimulatory GTP-binding protein in beta adrenoceptor-adenylate cyclase system of femoral arteries isolated from spontaneously hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 1988;246:709-18.
518. Schiffrin EL. Role of endothelin-1 in hypertension and vascular disease. *Am J Hypertens*. 2001;14:83S-89S.
519. Schordan E, Welsch S, Rothhut S, Lambert A, Barthelmebs M, Helwig JJ, Massfelder T. Role of parathyroid hormone-related protein in the regulation of stretch-induced renal vascular smooth muscle cell proliferation. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15:3016-25.
520. Massfelder T, Helwig JJ. The parathyroid hormone-related protein system: more data but more unsolved questions. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2003;12:35-42.
521. Rahmouni K, Sibug RM, De Kloet ER, Barthelmebs M, Grima M, Imbs JL, De Jong W. Effects of brain mineralocorticoid receptor blockade on blood pressure and renal functions in DOCA-salt hypertension. *Eur J Pharmacol*. 2002;436:207-16.
522. Loichot C, Cazaubon C, De Jong W, Helwig JJ, Nisato D, Imbs JL, Barthelmebs M. Nitric oxide, but not vasopressin V2 receptor-mediated vasodilation, modulates vasopressin-induced renal vasoconstriction in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2000;361:319-26.
523. Rodriguez-Iturbe B, Quiroz Y, Ferrebuz A, Parra G, Vaziri ND. Evolution of renal interstitial inflammation and NF-kappaB activation in spontaneously hypertensive rats. *Am J Nephrol*. 2004;24:587-94.
524. Touyz RM, Berry C. Recent advances in angiotensin II signaling. *Braz J Med Biol Res*. 2002;35:1001-15.
525. Nutt RF, Caulfield MP, Levy JJ, Gibbons SW, Rosenblatt M, McKee RL. Removal of partial agonism from parathyroid hormone (PTH)-related protein-(7-34)NH₂ by substitution of PTH amino acids at positions 10 and 11. *Endocrinology*. 1990;127:491-3.
526. Dodson RE, Shapiro DJ. Regulation of pathways of mRNA destabilization and stabilization. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 2002;72:129-64.
527. Leri A, Claudio PP, Li Q, Wang X, Reiss K, Wang S, Malhotra A, Kajstura J, Anversa P. Stretch-mediated release of angiotensin II induces myocyte apoptosis by activating p53 that enhances the local renin-angiotensin system and decreases the Bcl-2-to-Bax protein ratio in the cell. *J Clin Invest*. 1998;101:1326-42.

528. Li Q, Muragaki Y, Hatamura I, Ueno H, Ooshima A. Stretch-induced collagen synthesis in cultured smooth muscle cells from rabbit aortic media and a possible involvement of angiotensin II and transforming growth factor-beta. *J Vasc Res.* 1998;35:93-103.
529. Stanley AG, Patel H, Knight AL, Williams B. Mechanical strain-induced human vascular matrix synthesis: the role of angiotensin II. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2000;1:32-5.
530. Li Q, Muragaki Y, Ueno H, Ooshima A. Stretch-induced proliferation of cultured vascular smooth muscle cells and a possible involvement of local renin-angiotensin system and platelet-derived growth factor (PDGF). *Hypertens Res.* 1997;20:217-23.
531. Fukuda N, Satoh C, Hu WY, Soma M, Kubo A, Kishioka H, Watanabe Y, Izumi Y, Kanmatsuse K. Production of angiotensin II by homogeneous cultures of vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:1210-7.
532. Satoh C, Fukuda N, Hu WY, Nakayama M, Kishioka H, Kanmatsuse K. Role of endogenous angiotensin II in the increased expression of growth factors in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2001;37:108-18.
533. Johnson HM, Subramaniam PS, Olsnes S, Jans DA. Trafficking and signaling pathways of nuclear localizing protein ligands and their receptors. *Bioessays.* 2004;26:993-1004.
534. Aarts MM, Levy D, He B, Stregger S, Chen T, Richard S, Henderson JE. Parathyroid hormone-related protein interacts with RNA. *J Biol Chem.* 1999;274:4832-8.
535. Williams B. Angiotensin II and the pathophysiology of cardiovascular remodeling. *Am J Cardiol.* 2001;87:10C-17C.
536. Collins T, Cybulsky MI. NF-kappaB: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? *J Clin Invest.* 2001;107:255-64.
537. Richard DE, Berra E, Pouyssegur J. Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1alpha in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 2000;275:26765-71.
538. Page EL, Robitaille GA, Pouyssegur J, Richard DE. Induction of hypoxia-inducible factor-1alpha by transcriptional and translational mechanisms. *J Biol Chem.* 2002;277:48403-9.
539. Jesmin S, Hattori Y, Sakuma I, Mowa CN, Kitabatake A. Role of ANG II in coronary capillary angiogenesis at the insulin-resistant stage of a NIDDM rat model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;283:H1387-97.
540. Guillen C, Martinez P, de Gortazar AR, Martinez ME, Esbrit P. Both N- and C-terminal domains of parathyroid hormone-related protein increase interleukin-6 by nuclear factor-kappa B activation in osteoblastic cells. *J Biol Chem.* 2002;277:28109-17.
541. Jans DA, Thomas RJ, Gillespie MT. Parathyroid hormone-related protein (PTHrP): a nucleocytoplasmic shuttling protein with distinct paracrine and intracrine roles. *Vitam Horm.* 2003;66:345-84.
542. Karaplis AC, Kronenberg HM. Physiological roles for parathyroid hormone-related protein: lessons from gene knockout mice. *Vitam Horm.* 1996;52:177-93.
543. Touyz RM. The role of angiotensin II in regulating vascular structural and functional changes in hypertension. *Curr Hypertens Rep.* 2003;5:155-64.
544. McCuaig KA, Lee HS, Clarke JC, Assar H, Horsford J, White JH. Parathyroid hormone/parathyroid hormone related peptide receptor gene transcripts are expressed from tissue-specific and ubiquitous promoters. *Nucleic Acids Res.* 1995;23:1948-55.