



UNIL | Université de Lausanne

Faculté de biologie
et de médecine

Les WNK kinases et les effets de WNK3 sur l'activité du canal ENaC

MAITRISE UNIVERSITAIRE EN MEDECINE HUMAINE

Présenté à la faculté de Biologie et de Médecine de l'Université de
Lausanne par

Florence Bättig

Tuteur : Olivier Staub

Expert : Laurent Schild

Lausanne 2013

Table des matières

Table des matières	1
Table des illustrations.....	3
1. Introduction.....	4
2. Physiologie du rein	5
3. La régulation du bilan sodique	7
3.1 Le système Rénine-angiotensine-aldostérone	8
3.2 Le tonus sympathique des nerfs rénaux.	9
3.3 ANP.....	10
4. Mécanismes moléculaires de la régulation du transport sodique dans l'ASDN.....	10
4.1 L'aldostérone.....	10
4.1.1 « Aldostérone Paradox » et régulation du bilan sodique et potassique.....	11
4.2 Nedd 4-2.....	13
5. Canaux et transporteurs sodiques : ENaC et NCC	14
5.1 ENaC	14
5.1.1 Structure.....	14
5.1.2 Régulation.....	15
5.2 NCC	16
5.2.1 Régulation.....	16
6. Troubles génétiques rénaux dans la balance sodique.....	17
6.1 Bartter	17
6.2 Gitelman	17
6.3 Liddle	18
6.4 Pseudohypoaldostéronisme type2.....	18
7. Les kinases WNK	18
7.1 WNK1.....	19
7.2 WNK4.....	20

Table des matières

7.3	Wnk3.....	20
7.3.1	Fonction de Wnk3 in vivo	22
7.3.2	Fonctions Carboxy vs Amino terminus	22
7.4	Hiérarchie entre Wnk1 et Wnk4, nouvelle théorie.....	23
8.	Objectifs du travail.....	25
9.	Résultats	25
10.	Discussion	28

Table des illustrations

Figure 1: Architecture des reins et organisation des néphrons.	5
Figure 2: Transport du sodium dans le tubule proximal via de nombreux cotransporteurs apicaux et pompes Na/K-ATPase basolatérales.	6
Figure 3: Réabsorption de sodium dans la branche ascendant épaisse par le cotransporteur Na-K-Cl.	6
Figure 4: Transport du sodium par le cotransporteur NCC dans le tubule distal contourné.	7
Figure 5: Réabsorption du sodium par les canaux ENaC dans les cellules principales du canal collecteur.	7
Figure 6: L'appareil juxtaglomérulaire	8
Figure 7: Système Rénine-Angiotensine-Aldostérone.	9
Figure 8: Expression de NCC, ENaC et Na-K-ATPase ainsi que des récepteurs à minéralocorticoïdes et enzyme 11 β -HSD2 dans l'ASDN.	12
Figure 9: Régulation de NCC et ENaC par Nedd4-2 et WNK4.	13
Figure 10: La régulation du canal ENaC par l'aldostérone qui se lit à des récepteurs minéralocorticoïdes modulant l'expression du canal.	14
Figure 11: Structure du canal ENaC composé les sous-unités α , β et γ possédant chacune deux domaines transmembranaires.	15
Figure 12: Maladies géniques du rein.	17
Figure 13: Structure des WNKs.	19
Figure 14: Famille SCL12.	21
Figure 15: Chimères WNK3 et WNK4.	23
Figure 16: Régulation du transporteur NCC.	24
Figure 17: WNK3 n'a pas d'effet sur l'activité du canal ENaC	26
Figure 18: WNK3 ne rétablit pas les effets inhibiteurs de Nedd4-2 sur l'activité du canal ENaC	27

1. Introduction

Les WNK kinases sont une famille de sérine/thréonine protéines kinases, des enzymes capables de phosphoryler le résidu OH de sérine ou thréonine. Quatre membres (WNK 1-4) ont été identifiés, largement distribués dans les cellules et tissus des mammifères et dont les fonctions sont de réguler des canaux ioniques et cotransporteurs. Leur particularité se situe au niveau de leur structure puisque une lysine a été substituée par une cystéine dans le domaine catalytique, d'où leur nom « with-no-lysine kinase » (McCormick and Ellison, 2011).

Leur rôle dans le bon fonctionnement du rein et plus particulièrement dans le contrôle et maintien du bilan hydro-sodé n'est plus à vérifier puisque des mutations dans WNK 1 et WNK 4 sont connues pour causer la maladie de l'hypertension familiale ou syndrome de pseudohypoaldostéronisme de type 2, aussi appelé syndrome de Gordon (ou Fhht = Familial hyperkalaemic hypertension) (Furgeson and Linas, 2010). Le syndrome de Gordon est une maladie génétique autosomale dominante caractérisée par une hypertension, une hyperkaliémie et une acidose métabolique.

Les WNKs contrôlent de nombreux canaux et transporteurs dans le rein, devenant des acteurs importants dans la régulation du bilan sodique et potassique. Leurs effets sont nombreux et variables et les canaux jouant un rôle clé dans cette régulation sont ENaC, NCC et ROMK (Kahle et al., 2008).

Dans ce travail, nous commencerons par une partie théorique faisant le point sur l'organisation des néphrons et la régulation du bilan sodique et les différents mécanismes entrant en jeu. Nous intégrerons des informations générales concernant les WNKs ainsi qu'une revue plus détaillée de leurs effets respectifs dans le néphron. Pour terminer, nous aborderons les résultats d'une expérience qui a été réalisée en laboratoire sur des oocytes de *Xenopus laevis*. L'implication de WNK1 et WNK4 dans le contrôle du sodium ayant déjà été prouvée à de nombreuses reprises, nous sommes intéressés ici aux effets de WNK3 sur le canal ENaC ainsi que l'implication de Nedd4-2 dans ce procédé.

2. Physiologie du rein

Les reins exercent de multiples fonctions: Régulation des volumes liquidiens et leur composition électrolytiques, excrétion de produit du métabolisme, régulation de l'équilibre acido-basique, régulation de la pression artérielle, fonction endocrinienne (EPO pour la stimulation de la production d'érythrocytes, production de rénine et régulation de la production de vitamine D active.), etc. (Lang and Thews, 2005; Silbernagl and Despopoulos, 2008).

L'unité fonctionnelle du rein est le néphron. Chaque rein humain en contient environ 1,3 million. Un néphron est composé d'un tubule et de son glomérule. Le glomérule est une structure de 200µm de diamètre formé d'un peloton de capillaires dont la fonction est la filtration du sang et la formation de l'urine primitive. Les capillaires sont formés par les artérioles afférentes et drainés par les artérioles efférentes. La membrane glomérulaire filtre le sang et laisse passer les substances selon leur taille et leur charge. Tout au long des tubules, les différentes substances filtrées seront réabsorbées ou excrétées pour former les urines et d'autres seront sécrétées.

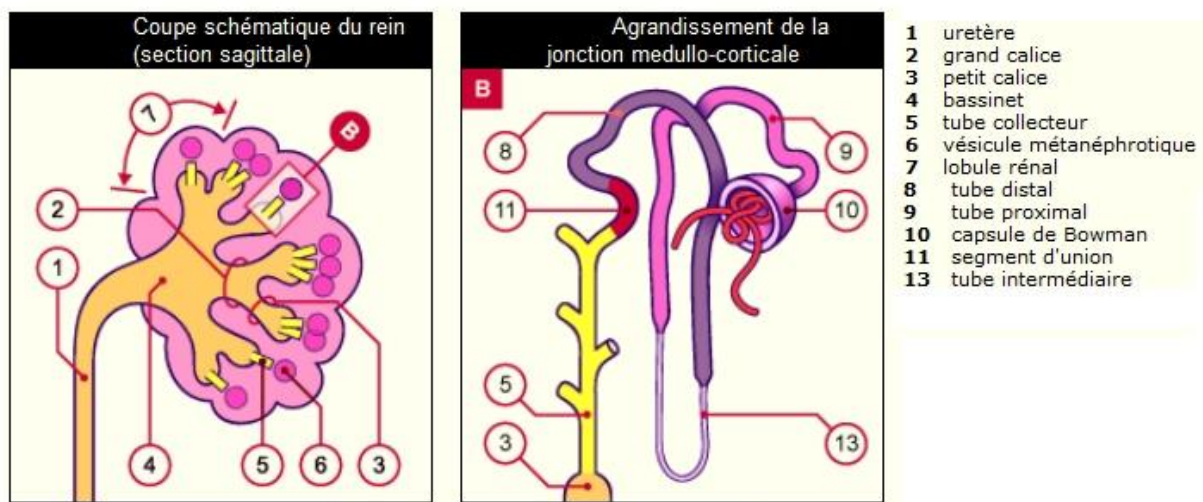


Figure 1: Architecture des reins et organisation des néphrons.

Les tubules se divisent en différents segments ayant chacun des propriétés et fonctions différentes.

-Tubule proximal: 2/3 de l'eau et du Na^+ filtrés sont réabsorbés à cet endroit, ainsi que 85% des bicarbonates et 100% du glucose et des acides aminés filtrés. Le sodium est réabsorbé en grande partie grâce à des cotransporteurs apicaux couplant le sodium à différentes substances comme le glucose, les acides aminés, le phosphate, le sulfate et autres ou encore grâce à l'échangeur Na^+/H^+ . La plupart de ces transporteurs utilisent comme énergie la pompe basolatérale $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ qui maintient le taux de sodium intracellulaire bas permettant l'entrée de sodium par les cotransporteurs apicaux.

2 Physiologie du rein

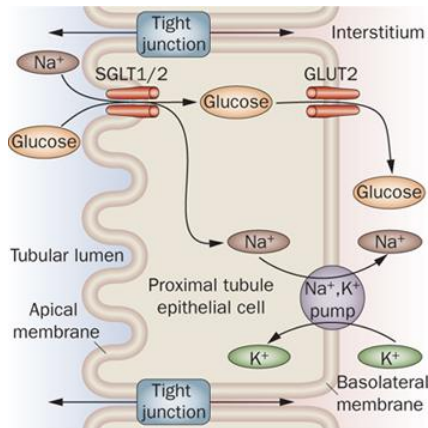


Figure 2: Transport du sodium dans le tubule proximal via de nombreux cotransporteurs apicaux et pompes Na/K-ATPase basolatérales.

-**Anse de Henle**: cette partie du tubule est séparée en fonction des ses différentes propriétés entre branche descendante fine DTL, branche ascendante fine ATL et branche ascendante épaisse TAL. Cette dernière est métaboliquement très active. La pompe basolatérale Na⁺/K⁺ATPase crée un gradient qui permet la fonction du cotransporteur Na-K-2Cl (K⁺ rediffuse ensuite du côté apical par des canaux ROMK (renal outer medullary K⁺ channel) et Cl⁻ diffuse par des canaux à Cl⁻ basolatéraux). Le cotransporteur Na-K-2Cl peut être inhibé par les diurétiques de l'anse comme le furosémide induisant une diurèse osmotique avec natriurèse et kaliurèse. Des mutations des canaux et transporteurs de ce segment sont responsables du syndrome de Bartter (voir description plus détaillée au chapitre 6).

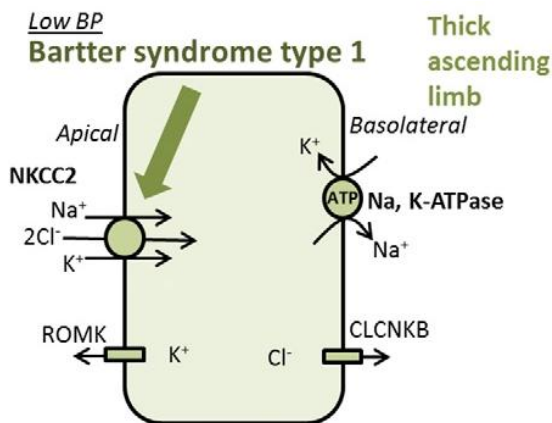


Figure 3: Réabsorption de sodium dans la branche ascendant épaisse par le cotransporteur Na-K-2Cl.

-**Tubule distal contourné DCT** : La membrane apicale contient un cotransporteur Na-Cl (NCC). Celui-ci est inhibé par le diurétique thiazide. Des mutations avec perte de fonction du transporteur induisent le syndrome de Gitelman. Ce segment est séparé en DCT 1 et 2 avec une baisse de l'expression de NCC et une augmentation de l'expression d'ENaC le long du DCT 2. L'aldostérone n'a aucun effet dans le DCT1 (voir chapitre 4.1.1 aldostérone-paradox).

3 La régulation du bilan sodique

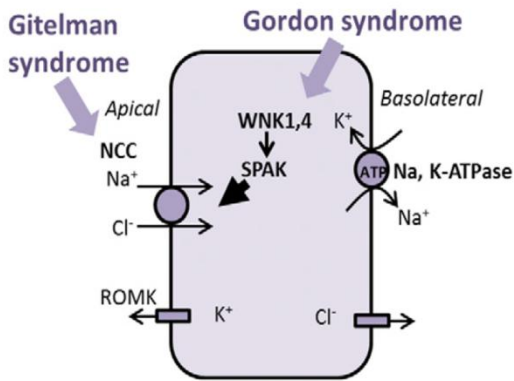


Figure 4: Transport du sodium par le cotransporteur NCC dans le tubule distal contourné.

-**Tubule distal tardif CNT** (connecting tubule) et **tube collecteur CD** (connecting duct) formé par la confluence de plusieurs tubules distaux. Cette portion du tube contient deux types de cellules, les cellules principales et les cellules intercalaires. Les premières comportent des canaux à sodium ENaC et des canaux à potassium ROMK. La pompe Na⁺/K⁺-ATPase basolatérale induit un gradient qui amène à la réabsorption de sodium par ENaC et à la sécrétion de potassium par ROMK. Le canal ENaC peut être inhibé par le diurétique amiloride (ce qui induit également une baisse de la sécrétion de K⁺ par la baisse du potentiel transepithelial), à l'inverse de l'aldostérone qui stimule le canal et ainsi augmente la sécrétion de K⁺ par ROMK. Le canal est également inhibé par l'ANP (atrial natriuretic peptide). Des mutations dans les sous-unités d'ENaC sont responsables du syndrome de Liddle en provoquant une activation constitutive du canal qui induit une réabsorption excessive de sodium et donc une hypertension. Les cellules intercalaires quant à elles sont séparées en type A et type B. Les premières sont responsables de la sécrétion de H⁺ par une pompe H⁺-ATPase et les cellules types B sécrètent du HCO₃⁻ et participent donc à la régulation de l'équilibre acide-base.

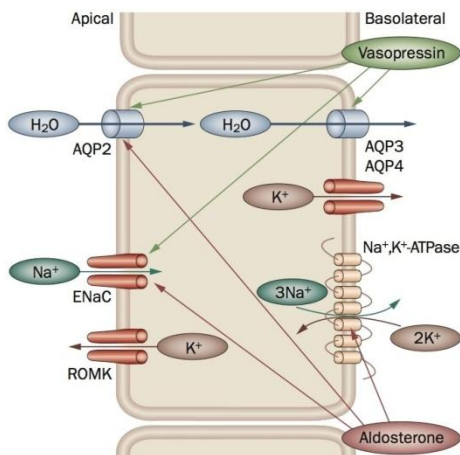


Figure 5: Réabsorption du sodium par les canaux ENaC dans les cellules principales du canal collecteur.

3. La régulation du bilan sodique

Pour que le capital sodique de l'organisme reste en équilibre, il faut que le rein soit capable de moduler le volume de sodium éliminé (par les urines essentiellement) en fonction de la quantité de

3 La régulation du bilan sodique

sodium ingéré par la nourriture. Le sodium est filtré en grande quantité mais entre 96 et 99% est réabsorbé tout au long des tubules. 65% dans le tubule proximal, 20-25% dans l'anse de Henle, 5-8% dans le tubule distal contourné et le reste dans le tube collecteur. Le sodium est le cation le plus abondant du liquide extracellulaire (il constitue avec ses anions associés près de 90% des solutés.) Ainsi, des variations du sodium corporel total induisent des modifications dans le même sens du volume extracellulaire et la régulation de ce dernier implique donc la régulation du capital sodique en ajustant l'excrétion de NaCl. Une perte de sodium et d'eau, par des diarrhées par exemple, entraîne une diminution du volume plasmatique et donc de la pression artérielle. Ceci aura comme effet direct une baisse de la pression nette de filtration et donc du GFR (glomerular filtration rate = débit de filtration glomérulaire). La conséquence sera une baisse de l'excrétion de sodium et d'eau grâce à différents mécanismes décrits ci-après (\uparrow rénine, \uparrow aldostérone, \downarrow ANP). En parallèle, la baisse de pression artérielle va stimuler les nerfs sympathiques rénaux qui vont à leur tour vasoconstricter les artéioles afférentes rénales ce qui va également baisser la pression nette de filtration glomérulaire.

3.1 Le système Rénine-angiotensine-aldostérone

Dans son trajet dans le néphron, la branche ascendante épaisse passe tout près du glomérule qui lui a donné naissance. A cet endroit se situe l'appareil juxtaglomérulaire responsable de la régulation du flux sanguin rénal et du taux de filtration glomérulaire. Il est composé notamment de la macula densa dont les cellules sont chargées de mesurer le taux de sodium qui arrive par la branche ascendante épaisse.

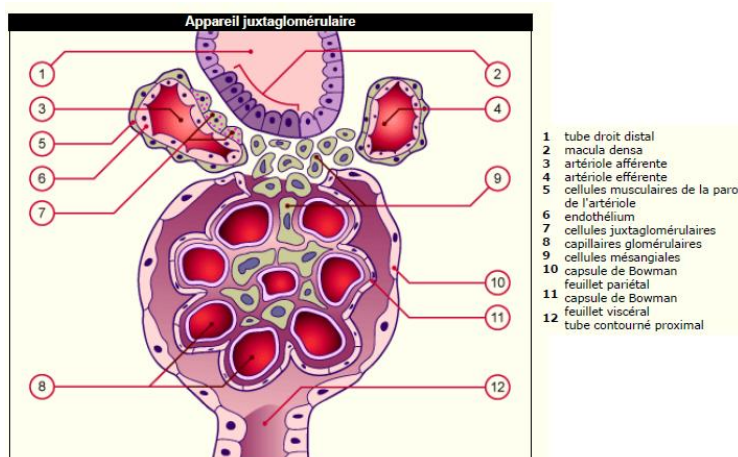


Figure 6: L'appareil juxtaglomérulaire

La régulation de la fonction glomérulaire à cet endroit implique la sécrétion de rénine par les cellules juxtaglomérulaires en réponse à une stimulation des récepteurs β 1-adrénergiques, une baisse de la pression dans l'artère rénale et une baisse de la délivrance à la macula densa. Ainsi, une déplétion volumique entraîne une augmentation de l'activité des nerfs sympathiques rénaux, une baisse de la

3 La régulation du bilan sodique

pression artérielle et une baisse du GFR qui engendre une baisse de débit et de délivrance de NaCl à la macula densa. La variation de ces trois paramètres va stimuler la sécrétion de rénine par les cellules juxtaglomérulaires ce qui aura pour effet d'augmenter le taux d'angiotensine II. La production d'angiotensine II se passe en plusieurs temps et implique plusieurs organes. En effet, suite au stimulus par la rénine, le foie va augmenter sa production et sécrétion d'angiotensinogène (453 acides aminés), celui-ci va être clivé dans le rein par la rénine en angiotensine I (10 acides aminés). Finalement c'est dans les poumons que l'angiotensine I va être transformé en angiotensine II (8 acides aminés) par l'enzyme de conversion ACE (Angiotensin converting enzyme). L'angiotensine II va ensuite se lier au récepteur AT1 (Angiotensin II receptor type 1). Le récepteur AT1 exerce une action au niveau du cerveau, des reins, des vaisseaux, du cœur, des poumons, des glandes surrénales et bien d'autres encore. Dans le contexte d'une hypovolémie et suite à une stimulation par l'angiotensine II, il va provoquer une vasoconstriction générale, stimuler la production et sécrétion d'aldostérone (voir description plus détaillée de l'aldostérone au chapitre 4.1), stimuler la sécrétion de vasopressine, diminuer le débit sanguin rénal, augmenter la réabsorption tubulaire de sodium, etc. L'effet global escompté sera donc une augmentation de la pression artérielle (Gasparo et al., 2000).

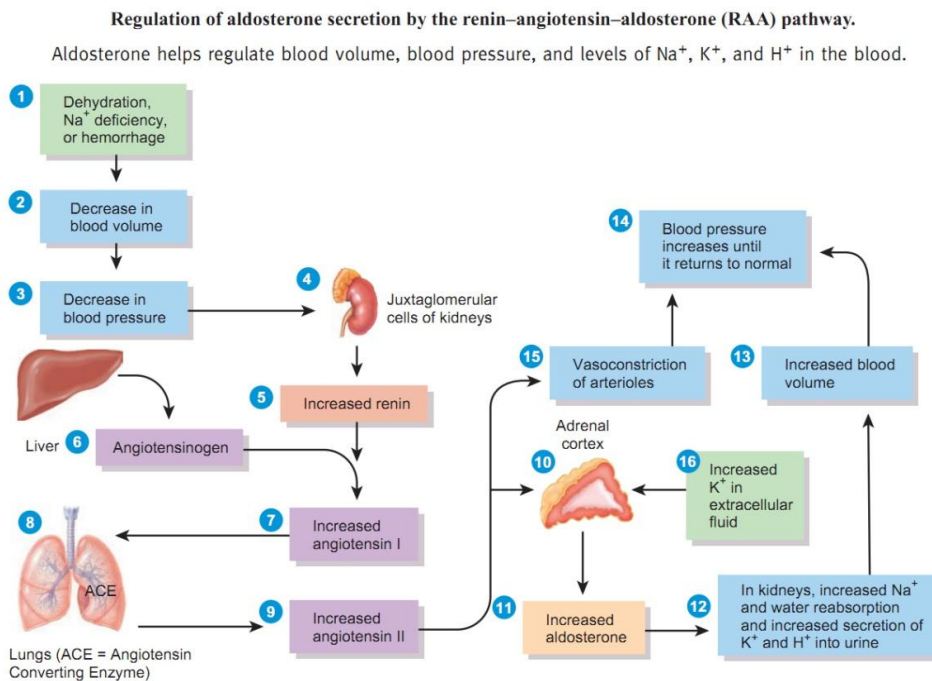


Figure 7: Système Rénine-Angiotensine-Aldostérone.

3.2 Le tonus sympathique des nerfs rénaux.

Les nerfs rénaux sont stimulés par une baisse de la pression artérielle. Ils exercent plusieurs effets comprenant une vasoconstriction rénale qui provoque une augmentation de la résistance des artérioles afférentes qui va baisser le taux de filtration glomérulaire et baisser la pression des

4 Mécanismes moléculaires de la régulation du transport sodique dans l'ASDN

capillaires péri-tubulaires. Ils vont également augmenter la libération de rénine via une stimulation des récepteurs β 1-adrénergiques. Pour finir, ils ont un effet direct sur le tubule proximal et l'anse de Henle où ils induisent une réabsorption de Na^+ .

3.3 ANP

L'Atrial Natriuretic Peptide est une hormone sécrétée par l'oreillette droite du cœur suite à une dilatation de celle-ci due à une augmentation de la pression artérielle. Les effets de l'ANP sont multiples. Elle va notamment diminuer la réabsorption de sodium dans le canal collecteur en inhibant le canal ENaC. Elle inhibe également la libération de rénine, de vasopressine et d'aldostérone et va augmenter le taux de filtration glomérulaire en abaissant la résistance de l'artériole afférente.

4. Mécanismes moléculaires de la régulation du transport sodique dans l'ASDN

4.1 L'aldostérone

L'aldostérone est une hormone sécrétée par les cellules du cortex surrénalien en réponse à une hypotension, une hyperkaliémie et une hyponatrémie. Il agit principalement sur le néphron distal, dans un segment spécifique appelé l'ASDN (aldosterone-sensitive-distal-nephron) et qui comprend le DCT2, le CNT et le CD. La réabsorption du sodium dans cette région du néphron se fait en deux étapes. Le sodium diffuse d'abord dans la cellule du côté apical par un canal/transporteur sodique en suivant un gradient électrochimique puis il est excrété de la cellule via une pompe Na^+/K^+ ATPase basolatérale. L'aldostérone procède en augmentant le nombre de canaux à sodium ou NCC apicaux et de pompes Na^+/K^+ ATPase basolatérales. Dans les cellules exprimant les canaux/transporteurs sodiques, ceci va favoriser la réabsorption de sodium en association à une sécrétion de K^+ par ROMK et d'ions H^+ . En effet, la réabsorption de sodium (chargé positivement) crée un lumen voltage négatif qui va favoriser la sécrétion de K^+ ou H^+ .

L'action de l'aldostérone est possible dans l'ASDN grâce à la co-expression d'un récepteur à l'aldostérone MR (récepteur minéralocorticoïdes) et la présence d'une enzyme (11 β -HSD2) qui empêche l'occupation des MR par des glucocorticoïdes. L'absence de cette enzyme dans le DCT1 rend le segment insensible à l'aldostérone. Après liaison au récepteur minéralocorticoïdes, le complexe va atteindre le nucléus où il va moduler l'expression des gènes (Alvarez de la Rosa et al., 2013). On distingue deux phases d'action qui débutent après une première période de 20-60 min sans effet. La phase précoce correspond à l'augmentation de la réabsorption de sodium par des canaux/transporteurs préexistants et la phase tardive (2h30-3h) implique une synthèse de nouveaux

4 Mécanismes moléculaires de la régulation du transport sodique dans l'ASDN

canaux, transporteurs et pompes (Hou et al., 2002; Loffing et al., 2001). Un gène clé impliqué dans la régulation du bilan sodique est le gène *SGK1* qui code pour la sérine/thréonine kinase SGK1 (serum and glucocorticoid regulated kinase 1) responsable de l'activation de nombreux canaux et transporteurs dans le rein ainsi que d'autres actions dans de nombreux autres tissus (Loffing et al., 2001). SGK1 est induit par l'aldostérone et est un acteur de la phase précoce de ce dernier. SGK1 agit en augmentant l'expression de canaux ENaC à la surface de la membrane plasmique, mais est également un antagoniste de Nedd4-2 et empêche la dégradation des canaux par l'ubiquitine-ligase (Bhalla and Hallows, 2008; Büsst, 2013) (voir chapitres 4.2 Nedd4-2 et 5.1.2 Régulation d'ENaC).

4.1.1 « Aldosterone Paradox » et régulation du bilan sodique et potassique

On appelle « aldosterone paradox » le phénomène par lequel l'aldostérone produit différents effets selon la stimulation à laquelle il répond, en l'occurrence, l'hypovolémie et l'hyperkaliémie (Arroyo et al., 2011a). En effet, les deux effets principaux de l'aldostérone sur le néphron sont la stimulation de la réabsorption de sodium et la sécrétion de potassium. Une déplétion volumique va stimuler le système rénine-angiotensine-aldostérone et provoquer une augmentation de la réabsorption de sodium dans le néphron distal sans entraîner de sécrétion de potassium. A l'opposé, une hyperkaliémie va stimuler la sécrétion d'aldostérone et induire une sécrétion de potassium dans le néphron distal sans influencer la réabsorption de sel. Ainsi il est possible d'induire une rétention de sel sans provoquer une sécrétion de potassium et inversement. Ces deux mécanismes étant sous l'influence de l'aldostérone, on a appelé ce phénomène « aldosterone paradox » (Arroyo et al., 2011a).

La régulation du bilan sodique et potassique est étroitement liée. En effet, le taux d'arrivée de sodium au néphron distal, dépendant du taux de réabsorption de sodium proximale par le transporteur NCC, va moduler la réabsorption par ENaC et modifier dans le même sens la sécrétion de K^+ . On explique ainsi pourquoi dans le syndrome de Gitelman ou de Bartter type 1 (voir chapitre 6 troubles rénaux de la balance sodique), une mutation avec perte de fonction de NCC ou NKCC2 mène à une hypotension associée à une hypokaliémie et alcalose métabolique (moins de Na^+ est réabsorbé proximale, donc plus de Na^+ arrive aux tubules distaux et est réabsorbé par ENaC, et plus de K^+/H^+ est sécrété)(Arroyo et al., 2011a). Ou encore un gain de fonction de NCC dans le syndrome de pseudohypoaldostéronisme de type 2 qui engendre à une hypertension, hyperkaliémie et acidose métabolique (Arroyo et al., 2011a; Xu et al., 2005a).

La différence de réponses du néphron aux différentes situations de stress réside donc dans la grande palette de processus impliqués dans la régulation du bilan sodique et potassique mais surtout dans la différence de sensibilité aux hormones entre le DCT1 et l'ASDN, le premier étant insensible à

4 Mécanismes moléculaires de la régulation du transport sodique dans l'ASDN

l'aldostérone. Intéressons-nous de manière plus détaillée aux différents mécanismes de réponse à l'hypovolémie et l'hyperkaliémie.

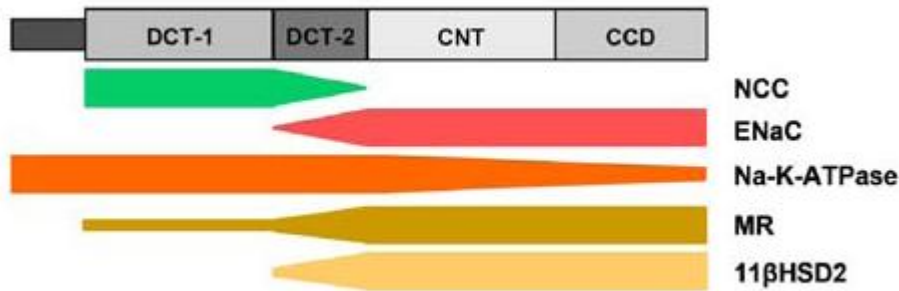


Figure 8: Expression de NCC, ENaC et Na-K-ATPase ainsi que des récepteurs à minéralocorticoïdes et enzyme 11β-HSD2 dans l'ASDN

Comme décrit plus tôt, l'angiotensine II est stimulé par une déplétion volumique et entraîne la sécrétion d'aldostérone qui va agir sur le néphron distal. Mais l'angiotensine II peut également agir en activant directement NCC par le biais de WNK4 (en lui donnant un effet stimulateur) et de SPAK mais sans influencer ROMK. L'aldostérone peut également moduler NCC mais uniquement dans le DCT2. Ainsi un régime pauvre en sodium va avoir un effet stimulant sur NCC par l'intermédiaire de l'angiotensine II principalement et sur ENaC par l'aldostérone (Arroyo et al., 2011a).

L'hyperkaliémie stimule la production et sécrétion de l'aldostérone mais n'influence pas l'angiotensine. L'aldostérone va répondre à l'hyperkaliémie en augmentant l'arrivée de sodium distalement pour stimuler la sécrétion de K^+ dans le CNT. Il agit via SGK1 en provoquant la phosphorylation de WNK4 ce qui va lever l'inhibition de WNK4 sur ENaC et ROMK tout en gardant NCC inhibé celui-ci étant principalement situé dans une région insensible à l'aldostérone.

WNK3 pourrait également jouer un important rôle dans ce domaine puisqu'il est connu pour induire une stimulation de NCC mais par contre également une inhibition de ROMK.

Concernant WNK1, on verra plus tard qu'il existe deux types principaux : L-WNK1 et KS-WNK1. Le premier est un inhibiteur de WNK4 et augmente de cette manière l'activité de NCC mais il est également connu pour inhiber ROMK. Ces effets sont renversés par KS-WNK1 qui agit comme inhibiteur direct de L-WNK1. KS-WNK1 est donc stimulé par l'aldostérone en cas d'hyperkaliémie puisqu'il induit la réponse idéale attendue, c'est-à-dire une stimulation de ROMK et maintient d'inhibition de NCC.

4.2 Nedd 4-2

Nedd4-2 (Neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 4) est une ubiquitine-protéine ligase, puissant inhibiteur de différents transporteurs dans le rein. Il régule ENaC et NCC en induisant leur ubiquitination puis endocytose et dégradation dans les lysosomes (Rotin and Staub, 2012).

Au niveau du canal ENaC, Nedd4-2 agit en interagissant avec les motifs PY localisés dans le domaine carboxy-terminus des sous-unités bêta et gamma du canal. Il induit l'ubiquitination du canal ce qui provoque son internalisation et sa dégradation. Dans le syndrome de Liddle, les motifs PY du canal ENaC sont mutés, empêchant l'inhibition par Nedd4-2, ce qui entraîne une surexpression du canal et donc une hypertension. La régulation d'ENaC par l'aldostérone implique en partie l'activation de SGK1. Cette kinase agit, comme déjà mentionné, en augmentant le nombre de canaux ENaC à la membrane plasmatique mais également en induisant la phosphorylation de Nedd4-2 (résidus sérine 222 et sérine 328). Ceci empêche l'interaction entre ENaC et Nedd4-2 et résulte en l'impossibilité de ce dernier à dégrader le canal ENaC (Debonneville et al., 2001). De la même manière, SGK1 empêche l'inhibition de NCC en phosphorylant Nedd4-2, à la seule différence que NCC ne contient pas de motif PY et n'interagit pas directement avec Nedd4-2 (Rotin and Staub, 2012).

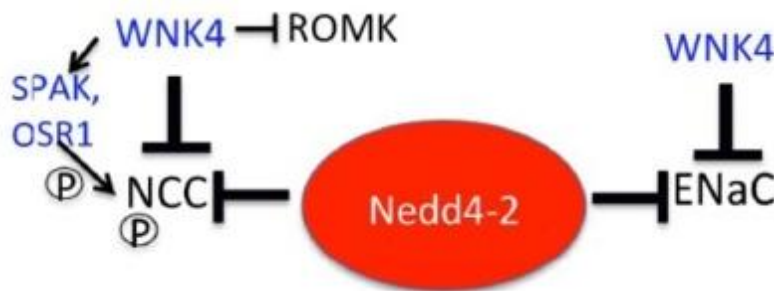


Figure 9: Régulation de NCC et d'ENaC par Nedd4-2 et WNK4.

Pour comprendre le rôle de Nedd4-2 concrètement, une expérience a été réalisée dans laquelle on analyse des souris dont le gène codant pour Nedd4-2 est inactivé ((Ronzaud et al., 2013). L'absence de Nedd4-2 engendre une augmentation de NCC ainsi que β et γ ENaC mais une balance sodique et potassique conservée. En effet, on observe une baisse compensatoire d'aldostérone qui, pour maintenir la balance sodique, va abaisser α ENaC. (Ceci démontre un rôle de α ENaC qui serait de réguler la présentation des sous-unités β et γ à la surface apicale de la cellule.) L'hyperkaliémie est prévenue par l'augmentation de ROMK qui n'est plus inhibé par Nedd4-2. En cas de régime riche en sel, on note par contre une hypertension et hypercalciurie, prévenues en partie par le thiazide, mais pas d'hyperkaliémie ce qui est la principale différence vis-à-vis du PHaII (Ronzaud et al., 2013).

5. Canaux et transporteurs sodiques : ENaC et NCC

5.1 ENaC

Le canal ENaC (Epithelial sodium channel) est un canal situé dans les cellules épithéliales apicales du rein mais également dans les poumons ou le côlon. Il joue un rôle important dans le maintien de la balance hydro-sodée et l'homéostasie du potassium et autres électrolytes. Il est inhibé par l'amiloride. Dans le rein, il se situe plus précisément dans le néphron distal, dans le DCT, CNT et CCD. Il permet la réabsorption du sodium dans le canal qui suit un gradient électrochimique créé par la pompe basolatérale Na/K ATPase qui pompe le sodium hors de la cellule. Ce flux de sodium chargé positivement crée une différence de voltage entre le lumen du tubule et l'interstice et va permettre la sécrétion de potassium et ion H⁺ et la réabsorption de chlore paracellulairement (Alvarez de la Rosa et al. 2013). Un gradient osmotique est ainsi créé et permet la réabsorption d'eau.

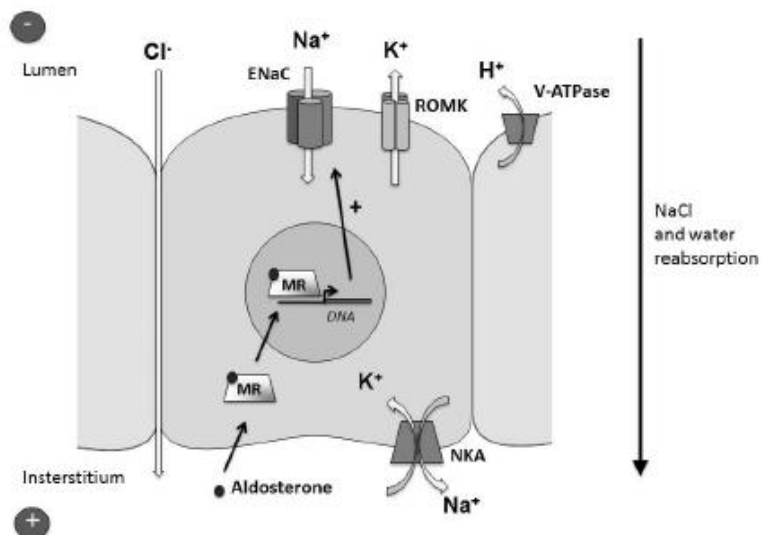


Figure 10: La régulation du canal ENaC par l'aldostérone qui se lie à des récepteurs minéralocorticoïdes modulant l'expression du canal.

5.1.1 Structure

Le canal est formé de trois sous-unités homologues α , β et γ . Chaque sous-unité contient deux régions transmembranaires (M1 et M2) ainsi qu'une boucle extracellulaire (60% de la protéine totale) comprenant des sites de glycosylation et des domaines N- et C-terminaux intracellulaire (Büsst, 2013)(Bhalla and Hallows, 2008). Les sous-unités β et γ contiennent chacune un domaine PY (2 prolines – 1 acides aminés X - 1 tyrosine) au niveau du COOH-terminus qui sert de site de liaison à l'ubiquitine-ligase Nedd4-2 dont le rôle est la dégradation du canal. La mutation de ces domaines cause le syndrome de Liddle.

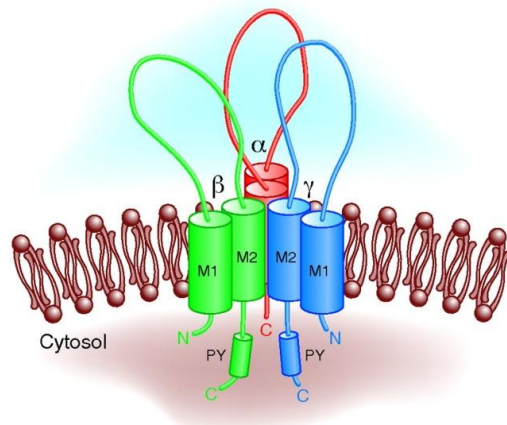


Figure 11: Structure du canal ENaC composé des sous-unités α , β et γ possédant chacune deux domaines transmembranaires, une grande boucle extracellulaire et des domaines N- et C-terminaux intracellulaire. Les sous-unités β et γ contiennent chacune un domaine PY.

5.1.2 Régulation

Un des principaux régulateurs du canal ENaC est l'aldostérone. Comme déjà expliqué, il est sécrété en réponse à une hypovolémie ou une hyperkaliémie. Ses effets sur ENaC sont multiples. Premièrement, différentes études ont démontré une augmentation de l'ARNm de α ENaC dans l'ASDN suite à l'administration d'aldostérone (Masilamani et al., 1999), mais pas de β ENaC ni γ ENaC qui sont constitutivement exprimées (Loffing and Korbmacher, 2009). On observe également une redistribution des canaux ENaC vers la membrane plasmique (Loffing et al., 2001). Une cible importante de l'aldostérone dans les cellules principales du canal collecteur est SGK1 (serum and glucocorticoid-induced kinase 1) (Alvarez de la Rosa et al., 2013). SGK1 est une protéine sérique qui répond aux stimulations par les minéralocorticoïdes et glucocorticoïdes. Elle agit en augmentant la transcription ainsi que l'expression de ENaC via la phosphorylation et donc inhibition de Nedd4-2 (Debonneville et al., 2001; Heise et al., 2010)(phosphorylation des résidus Sérine 328 et 222)(Arroyo et al., 2011b). SGK1 peut également phosphoryler directement le résidu COOH de α ENaC ce qui va augmenter la probabilité d'ouverture du canal (Büsst, 2013). Nedd4-2 est un puissant inhibiteur d'ENaC. Il agit en interagissant avec les motifs PY localisés dans les sous-unités β et γ d'ENaC (Rotin and Staub, 2012). Nedd4-2 induit l'ubiquitination du canal ce qui provoque son internalisation et sa dégradation. La régulation d'ENaC par l'aldostérone implique en partie une phosphorylation de Nedd4-2 par SGK1 ce qui prévient l'interaction entre Nedd4-2 et ENaC et empêche la dégradation du canal. Dans le syndrome de Liddle, les motifs PY du canal ENaC sont mutés, empêchant l'inhibition par Nedd4-2, ce qui induit une surexpression du canal et donc une élévation de la réabsorption de sodium, suivie par une hausse de la sécrétion de potassium. Le tout va provoquer une hypertension et hypokaliémie qui vont inhiber le système rénine-angiotensine-aldostérone, aboutissant à un syndrome de pseudohyperaldostéronisme (Bhalla et al., 2005).

5.2 NCC

NCC est un cotransporteur sodium-chlore situé dans le tubule contourné distale (DCT) du néphron. Il fait parti de la famille des SLC12 cotransporteurs et est inhibé par le diurétique thiazide. L'hyperactivité de NCC est responsable du syndrome de Gordon, d'où le traitement efficace de cette maladie par le thiazide (Glover and O'Shaughnessy, 2013; Kahle et al., 2008; Richardson et al., 2008). Une mutation avec perte de fonction du transporteur engendre quant à elle le syndrome de Gitelman caractérisé par une alcalose métabolique hypokaliémiant associée à une hypocalciurie et hypomagnésémie (Schultheis et al., 1998).

5.2.1 Régulation

L'activité de NCC est modulée par la phosphorylation de résidus sérine/thréonine de la protéine. L'expression et la phosphorylation du transporteur varient selon la tension artérielle et la natrémie ainsi que la kaliémie. De ce fait, un régime riche en sel ou pauvre en potassium induit une inhibition de NCC (Vallon et al., 2009).

Un système de régulation important de NCC implique la famille des WNKs qui phosphoryle et donc active les protéines SPAK et OSR1 qui elles-mêmes vont phosphoryler des résidus thréonine (Thr46, Thr55 et Thr60) du transporteur et ainsi le stimuler (Glover and O'Shaughnessy, 2013; Richardson and Alessi, 2008; Richardson et al., 2008). Une hypothèse serait que cette phosphorylation induit une translocation des transporteurs vers la membrane plasmatique. WNK1 est connu pour être un activateur de NCC, tout comme WNK3 alors que WNK4 est un inhibiteur. Ces derniers agissent par l'intermédiaire de SPAK. WNK4 devient un activateur s'il porte des mutations du syndrome PHAll.

Un autre système de régulation est composé du système Aldostérone-SGK1, comme pour ENaC. Les mécanismes d'action de l'aldostérone sur NCC restent inconnus mais on note en présence d'aldostérone une augmentation de la protéine NCC sans modification de la quantité d'ARNm supposant des mécanismes post-translacionnels. Il a par contre été prouvé qu'un des effets de l'aldostérone passe par la régulation de la protéine Nedd4-2. Cette protéine, rappelons-le, agit en ubiquitinant et donc dégradant le transporteur. Ses effets peuvent être prévenus par SGK1, lui-même activé par l'aldostérone qui va phosphoryler et donc inhiber Nedd4-2. On note une différence par rapport à ENaC qui est que l'interaction entre Nedd4-2 et NCC ne nécessite pas les motifs PY (Arroyo et al., 2011b).

D'autres acteurs connus pour réguler NCC sont Kelch-like3 et Cullin3. KHLH3 est hautement exprimé dans le DCT et a une grande influence sur NCC. Il agit en abaissant l'expression du canal à la surface de la membrane plasmatique (Glover and O'Shaughnessy, 2013) de deux manières différentes. Premièrement en interférant directement avec les composants de la translocation du transporteur vers la surface cellulaire et deuxièmement en se liant à Cullin3, partie d'un complexe d'ubiquitine-

6 Troubles génétiques rénaux dans la balance sodique

ligase (Louis-Dit-Picard et al., 2012; Vidal-Petiot et al., 2013). Le complexe KLHL3 et CUL3 agit par ubiquitination de WNK1 et WNK4. Des mutations de ce complexe rendraient l'ubiquitination de WNK1 et WNK4 impossible, ce qui serait à l'origine PHAI (Shibata et al., 2013).

6. Troubles génétiques rénaux dans la balance sodique

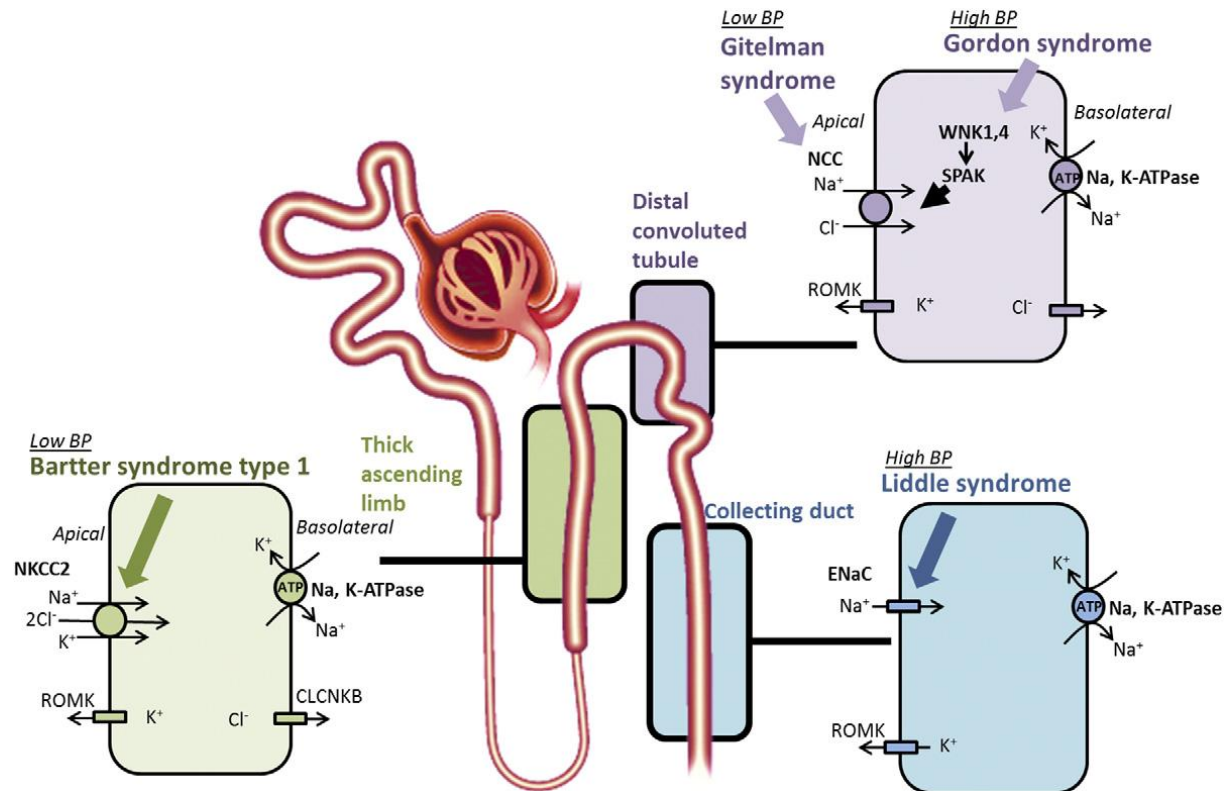


Figure 12: Maladies génétiques du rein.

6.1 Bartter

Le syndrome de Bartter est provoqué par des mutations dans la branche ascendante épaisse de l'un des trois gènes NKCC-2 (cotransport Na-K-Cl: Bartter type I), CLCKb (canaux à Cl⁻: Bartter type II) ou ROMK (canaux à K⁺: Bartter type III). Les caractéristiques de ce syndrome sont une natriurèse augmentée suivie d'une hypovolémie, une polyurie-polydipsie, une hypokaliémie, une augmentation de la calciurie, une alcalose et une résistance au furosémide (Glover and O'Shaughnessy, 2013).

6.2 Gitelman

Le syndrome de Gitelman est causé par des mutations dans le tubule distal de gène *SLC* codant pour le cotransporteur Na-Cl, le rendant inactif. Ceci induit une augmentation de la natriurèse et donc une hypotension ainsi qu'une augmentation de la kaliurèse et donc une hypokaliémie. On note également une hypocalciurie, une hypomagnésémie et une résistance au thiazide (Schultheis et al., 1998).

6.3 Liddle

Le syndrome de Liddle est caractérisé par une mutation des motifs PY situés sur la sous-unité bêta ou gamma du canal ENaC empêchant l'interaction avec Nedd4-2 et donc la dégradation du canal. Il s'ensuit une hyperfonction du canal avec rétention de sodium et hypertension (Lu et al., 2007; Rotin and Staub, 2012).

6.4 Pseudohypoaldostérisme type 2

Synonymes: Hypertension familiale, FHHT (familial hyperkalemic hypertension), syndrome de Gordon, PHAII.

Les caractéristiques de ce syndrome sont une hypertension, une hyperkaliémie et une acidose métabolique alors que la filtration glomérulaire est normale.

Les mutations responsables de ce syndrome se situent au niveau des WNKs dans la régulation du cotransporteur NCC, d'où la très bonne sensibilité de ce syndrome au diurétique thiazide. La transmission est autosomale dominante. On note des mutations de WNK4 qui rendent la kinase inapte à inhiber NCC et une délétion intronique de WNK1 causant sa surexpression. On a découvert récemment que des mutations dans les gènes de CUL3 et KLHL3 pourraient également provoquer cette maladie (Vidal-Petiot et al., 2013). A noter qu'elles causent un syndrome PHAII plus sévère que celui causé par les mutations des WNKs (Glover and O'Shaughnessy, 2013; Shibata et al., 2013).

On observe donc une hyperactivité de NCC. Une grande quantité de sodium est alors réabsorbée au niveau du DCT et donc moins de sodium arrive au canal collecteur situé en aval, où se trouve le canal ENaC et le canal ROMK. Comme moins de Na⁺ arrive et est réabsorbé, moins de K⁺ est sécrété par ROMK, le résultat est une hyperkaliémie. A cela s'ajoute l'inhibition augmentée de ROMK par WNK4 portant la mutation PHAII. L'acidose est due à l'inhibition de la production d'ammonium causée par l'hyperkaliémie (Xu et al., 2005a).

Différentes études supposent qu'ENaC stimulé par WNK1 participerait également au développement de l'hypertension dans le syndrome de PHAII (Hadchouel et al., 2010; Xu et al., 2005a).

7. Les kinases WNK

Comme mentionné plus tôt, l'intérêt des kinases WNK a été mis à jour par la découverte de leur implication dans PHAII. La physiopathologie de ce syndrome passerait par une hyperactivation du cotransporteur NCC situé dans le DCT, régulé par de nombreux mécanismes impliquant les WNKs (Vidal-Petiot et al., 2013). On découvre plus tard que les mutations à l'origine du syndrome se situeraient sur WNK1 et WNK4.

7 Les kinases WNK

Les kinases WNK sont une famille de sérine/thréonine kinases dont on connaît quatre types (WNK 1-4). Ils tiennent leur nom du fait de leur structure où une lysine est substituée par une cystéine dans le sous-domaine II du domaine catalytique, d'où la dénomination « with-no lysine (K) ». Les WNKs sont exprimés dans de nombreux organes mais en ce qui nous concerne, c'est leur fonction dans le rein qui nous intéresse et plus particulièrement leur rôle dans la régulation de la balance hydro-sodée et potassique, entre autres. A noter que WNK2 est absent du néphron, nous nous concentrerons donc sur les trois autres.

Concernant leur structure, les WNKs contiennent un domaine kinase, partageant plus de 84% d'homologie, du côté N-terminal et un long C-terminus contenant des domaines « coiled-coil » et des séquences riches en prolines (rôle dans les interactions entre protéines). On note également la présence de domaines auto-inhibiteurs (rôle dans la régulation de l'activité kinase) (Kahle et al., 2008; McCormick and Ellison, 2011; Xu et al., 2005b).

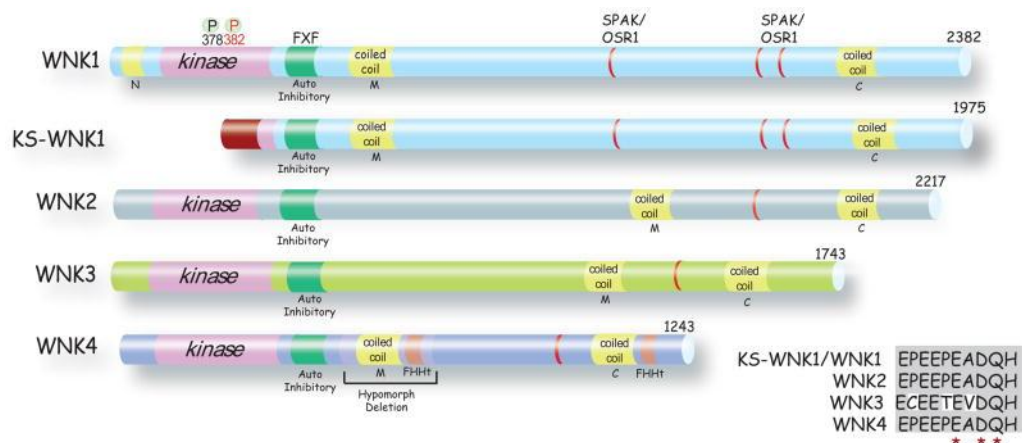


Figure 13: Structure des WNKs.

7.1 WNK1

La protéine kinase WNK1, encodée par le gène *WNK1* est exprimée dans le néphron distal. Son rôle est d'activer NCC et ENaC et d'inhiber ROMK.

Il existe une WNK1 spécifique au rein, KS-WNK1 (« kidney specific ») dont la structure diffère de celles des autres WNKs par le fait que la protéine est beaucoup plus courte puisqu'elle ne possède pas de domaine catalytique (McCormick and Ellison, 2011). KS-WNK1 est présent surtout dans le DCT (Arroyo et al., 2011a). Son action est d'inhiber L-WNK1 et WNK3. Elle agit donc comme inhibiteur de NCC et activateur de ROMK (Hadchouel et al., 2010).

WNK1 agit sur ENaC et NCC en activant SGK1 qui va augmenter la présence des canaux/transporteurs à la surface de la membrane plasmique mais également inhiber Nedd4-2 qui ne pourra plus exercer son action inhibitrice sur NCC et ENaC (Arroyo et al., 2011b; Heise et al., 2010; Xu et al., 2005a). SGK1 activé par WNK1 est également capable d'inhiber WNK4 et l'empêcher d'avoir un effet négatif sur NCC (Kahle et al., 2008; McCormick and Ellison, 2011; Rozansky et al., 2009). Le mécanisme de

régulation de NCC soulève deux théories. La première propose que WNK1 agisse en activant SPAK/OSR1 qui va phosphoryler et activer NCC. La seconde soutient que WNK1 empêche WNK4 d'exercer ses effets inhibiteurs sur NCC (discuté au chapitre 7.4 *Hiérarchie entre WNK1 et WNK4, nouvelle théorie*)(McCormick and Ellison, 2011; Vidal-Petiot et al., 2013).

Une délétion intronique dans le gène codant pour WNK1 cause le syndrome de Gordon causant une surexpression de L-WNK1 (Kahle et al., 2008; Vidal-Petiot et al., 2013). On note alors une augmentation de l'expression et phosphorylation de NCC causant le phénotype de la maladie.

7.2 WNK4

WNK4 est présent dans le néphron distal de DCT1 à CD (Arroyo et al., 2011a). Sa fonction est d'inhiber NCC (en réduisant le nombre de cotransporteurs à la membrane cellulaire), ENaC et ROMK (Kahle et al., 2008). Des mutations de WNK4 sont responsables du syndrome de PHAII. Suite à cette mutation, il devient un activateur de NCC et ENaC et l'inhibition de ROMK est augmentée, provoquant le phénotype connu de la maladie qui est une hypertension associée à une hyperkaliémie, hypercalciurie et acidose.

Concernant la régulation de WNK4, on note un important rôle de l'angiotensine II. Premièrement, l'Angiotensine II agit dans le DCT indépendamment de l'aldostérone en inhibant la fonction inhibitrice de WNK4 sur NCC et sur ENaC mais conservant l'inhibition de ROMK (Furgeson and Linas, 2010). Deuxièmement, dans l'ASDN, l'AII passe par l'aldostérone qui va induire la phosphorylation et inhibition de WNK4 via SGK1 (McCormick and Ellison, 2011). Ce mécanisme aura son importance en cas d'hyperkaliémie. En effet, WNK4 phosphorylé sera incapable d'inhiber ENaC et ROMK, alors que NCC, vu sa localisation dans le DCT1 insensible à l'aldostérone, restera inhibé. Ceci permettra une grande arrivée de sodium distalement avec réabsorption par ENaC et sécrétion de potassium par ROMK (Arroyo et al., 2011a; Castañeda-Bueno et al., 2012; Kahle et al., 2008).

7.3 WNK3

WNK3 est exprimé tout au long du néphron (Rinehart et al., 2005). On note une prédominance dans le tubule contourné proximal, où se situe le cotransporteur NKCC2 et dans la branche ascendante épaisse de l'anse de Henle, TAL, où est exprimé NCC. Sa fonction est de moduler l'expression des membres de la famille SCL12, « electroneutral cation chloride cotransporteurs » (Pacheco-Alvarez and Gamba, 2011), ce qui lui confère un rôle de senseur du taux de chlore et potassium. La famille SCL12 est divisée en deux groupes, les cotransporteurs Na/Cl composés de NKCC1, NKCC2 et NCC et les cotransporteurs K-Cl comprenant KCC 1-4. Ils sont modulés par phosphorylation/déphosphorylation (la phosphorylation des cotransporteurs à sodium provoque leur

7 Les kinases WNK

activation, alors que celle des cotransporteurs à potassium cause leur inhibition) en réponse à des variations du taux de chlore intracellulaire et la tonicité du milieu extracellulaire ou volume cellulaire.

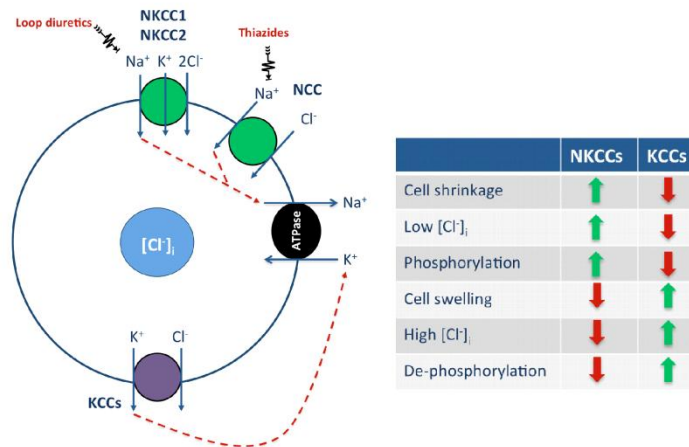


Figure 14: Famille SCL12.

WNK3 agit comme activateur des cotransporteurs NKCC1, NKCC2 et NCC et inhibiteur de KCC 1-4 par phosphorylation via SPAK/OSR1 (Pacheco-Alvarez and Gamba, 2011; Pacheco-Alvarez et al., 2012) ce qui modifie leur expression à la surface de la membrane plasmique (Rinehart et al., 2005). Une étude suggère que WNK3 est un senseur du volume cellulaire et du taux de chlore intracellulaire. Une baisse de ces deux paramètres provoquerait l'autophosphorylation de WNK3, qui activé induirait la phosphorylation des cotransporteurs (Pacheco-Alvarez and Gamba, 2011).

Concernant NCC, WNK3 agit non seulement en activant le cotransporteur via la phosphorylation de SPAK mais également en interférant avec Nedd4-2 ce qui empêche l'inhibition du cotransporteur, mais par un mécanisme différent de celui de SGK1 décrit précédemment (Arroyo et al., 2011b).

Les effets de WNK3 sur les cotransporteurs de la famille SCL12 sont dépendants du domaine catalytique de WNK3. Lorsque sa fonction kinase est inactivée, WNK3 se comporte à l'exact opposé de la version Wild-Type (Leng et al., 2006; Pacheco-Alvarez and Gamba, 2011). Le mutant « kinase-dead » est non seulement incapable d'activer NCC/NKCC1,2 mais va également les inhiber, effets que l'on pourrait attribuer à une phosphatase dont l'inhibition par WNK3 serait levée par l'absence de fonction catalytique de cette dernière (Pacheco-Alvarez and Gamba, 2011; Rinehart et al., 2005).

Aucun effet de WNK3 n'a à ce jour été démontré concernant le canal ENaC (Leng et al., 2006; Rinehart et al., 2005) (démonstré dans notre expérience au chapitre **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**: Résultats).

7 Les kinases WNK

Une autre fonction régulatrice de WNK3 est exercée dans les cellules du canal collecteur sur les canaux ROMK1. WNK3 a un effet inhibiteur sur ROMK1, ceci en abaissant l'expression du canal à la surface de la membrane plasmique (Leng et al., 2006). Au contraire de la régulation des cotransporteurs de chlore, cet effet ne nécessite pas la fonction catalytique de WNK3 (les mêmes observations ont été faites pour WNK4).

7.3.1 Fonction de WNK3 in vivo

Comme décrit précédemment, il a été démontré que WNK3 est un activateur de NCC et NKCC2 et qu'il participe donc à la régulation du bilan sodique et de la tension artérielle, ceci dans les oocytes de *Xenopus*. La fonction de WNK3 in vivo a quant à elle été testée par l'élaboration de souris Knock-Out de WNK3. Les résultats de deux études sont décrits ici.

Les souris KO sont viables et ne présentent pas de grosses anomalies. La fonction rénale est préservée. Il n'y a pas de différence notable entre les souris WT et KO concernant la pression artérielle, le volume plasmatique, le volume et osmolarité urinaire ou encore la concentration plasmatique de rénine et d'aldostérone, etc. (Mederle et al., 2013; Oi et al., 2012).

Après un régime pauvre en sel, on note une nette augmentation de la phosphorylation de SPAK/OSR1, NKCC2 et NCC, qui est très fortement marquée chez les souris KO (Mederle et al., 2013). On mesure également dans les souris KO WNK3 une augmentation de WNK1 (Mederle et al., 2013; Oi et al., 2012) et de WNK4 (Oi et al., 2012), accentuée par un régime pauvre en sel. Pour finir, le volume urinaire mesuré après administration de thiazide ou furosémide est nettement supérieur chez les souris KO en comparaison des WT mais uniquement sous régime pauvre en sel, indiquant une plus grande sensibilité aux diurétiques.

Ainsi, de nombreux paramètres restant inchangés dans les souris KO, on peut penser que WNK3 ne joue qu'un rôle limité dans le rein ou que sa concentration dans les souris in vivo est trop faible pour mesurer un quelconque effet, à l'inverse de ce qu'on observe dans les oocytes. Par contre le fait que pSPAK ne soit pas abaissé et que WNK1 et 4 soient augmentés indique qu'il existe probablement un effet compensatoire par les autres WNKs. Ces mécanismes ne deviennent importants et mesurables qu'en condition de régime pauvre en sel et donc de stimulation de la fonction de réabsorption rénale.

7.3.2 Fonctions Carboxy vs Amino terminus

Les cotransporteurs membres de la famille SCL12 sont régulés par WNK3 et par WNK4. WNK3 est un activateur des co-transporteurs Na-Cl et inhibiteur des cotransporteurs K-Cl. Alors que WNK4 inhibe les deux. Le fait qu'il y ait des différences et des similitudes entre les deux suggère que les WNKs peuvent être recrutés indépendamment ou conjointement selon l'effet escompté (Leng et al., 2006). Concernant la structure des protéines de la famille WNK, il a été montré que les WNKs partagent plus

7 Les kinases WNK

de 80% d'homologie dans leur domaine kinase mais que 15% dans les domaines amino et carboxyl terminus. Le fait que leurs actions diffèrent sur certains cotransporteurs mais sont semblables sur d'autres amène à se poser la question du domaine impliqué dans la définition de l'effet sur le cotransporteur. Sachant que chaque WNK est composé de trois parties: un court domaine amino-terminal, un domaine kinase et une région carboxyl-terminus, plusieurs études ont développé des chimères en mélangeant les résidus carboxyl- et amino-terminus de WNK3 et WNK4 afin de tester la région responsable de leurs effets respectifs.

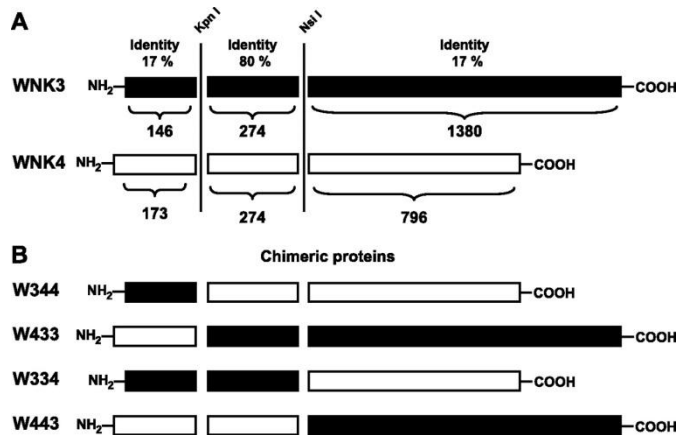


Figure 15: Fonctions des sous-domaines de WNK3 et WNK4

A: On observe une grande homologie entre les WNKs dans le domaine catalytique et des variations dans les domaines carboxy- et amino-terminus. **B:** Création de chimères de WNK3 et WNK4 en intervertissant les domaines C- et N-terminus afin de tester les fonctions de chacun de ces domaines.

Une première étude (San-Cristobal et al., 2008) affirme que les propriétés de WNK3 et WNK4 concernant NCC se situent dans leur domaine amino-terminal. En effet, une chimère contenant le domaine carboxyl de WNK3 et le domaine amino de WNK4 conduit à une inhibition de NCC, comparable à WNK4. N'oublions pas que les effets de WNK3 et WNK4 sur NCC requièrent leur activité catalytique, ce qui modifie quelque peu les effets des différentes chimères. Une précédente étude (Yang et al., 2007) propose quant à elle une hypothèse selon laquelle les informations se situeraient dans le domaine carboxy-terminal. Ceci même en absence d'activité catalytique. Un résidu carboxyl-WNK3 seul aurait les mêmes propriétés que la protéine WNK3 totale.

7.4 Hiérarchie entre WNK1 et WNK4, nouvelle théorie

Il a été prouvé il y a quelques années que le phénotype de la maladie de pseudoaldostérisme de type 2 est dû à une surexpression du cotransporteur NCC par des WNKs mutés (la maladie est traitée par le thiazide et l'image miroir de cette maladie est le syndrome de Gitelman dans lequel le gène codant pour NCC est inactivé) (Chávez-Canales et al.; Furgeson and Linas, 2010)

Dans de précédentes études, il avait été démontré que WNK4 est un inhibiteur du cotransporteur mais que WNK1 seul n'a aucun effet sur NCC dans les oocytes de *Xenopus laevis*. Par contre si WNK1

7 Les kinases WNK

est co-injecté avec WNK4, il lève l'inhibition causé par ce dernier. Donc WNK1 serait situé en amont de WNK4 et n'exercerait aucun effet seul. Sa surexpression dans la maladie de FHHT causerait le phénotype en inhibant l'effet négatif de WNK4 sur NCC (McCormick and Ellison, 2011; Vidal-Petiot et al., 2013).

Dans une étude en révision (Chávez-Canales et al.), une nouvelle hypothèse est formulée selon laquelle WNK1 aurait un effet direct sur NCC par le biais de SPAK et que WNK4 serait cette fois-ci située en amont de WNK1.

Ceci est prouvé de plusieurs manières dans cette étude. Tout d'abord en croisant une souris WNK1 +/FHHT avec une souris WNK4 -/-. Le résultat donne une souris dont le phénotype est toujours FHHT indiquant que WNK1 agit sur NCC indépendamment de WNK4. La raison de la discordance des résultats des précédentes études réside dans le fait que ces dernières auraient utilisé un mauvais modèle de WNK1 (isoforme utilisé n'est pas le plus présent dans le néphron et présence d'une mutation dans le modèle) faussant les résultats.

Dans la nouvelle étude, il est donc démontré que WNK1 agit directement sur NCC indépendamment de WNK4 et donc qu'une surexpression de WNK1 peut induire à elle seule le phénotype de FHHT.

WNK1 agirait par le biais de SPAK qui est responsable de la phosphorylation du cotransporteur. Concernant WNK4, si co-exprimé avec WNK1, il exerce un effet inhibiteur sur ce dernier. Si injecté seul, il maintient son effet inhibiteur sur NCC, montrant une potentielle interaction avec les WNK1 endogènes. Un dernier point a été soulevé évoquant une régulation par l'angiotensine II. Elle agirait en empêchant l'inhibition de WNK4 sur WNK1, causant au finale une activation de NCC. L'angiotensine II n'a donc un effet sur NCC qu'en présence de WNK4.

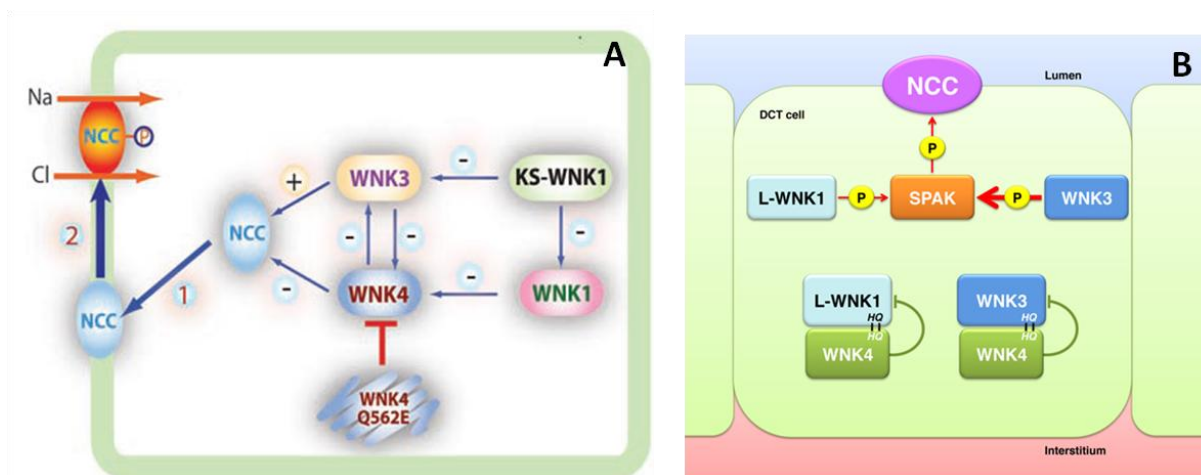


Figure 16: Régulation du transporteur NCC.

A : WNK4 agit directement sur NCC et est modulé par WNK1 et WNK3. WNK1 produit un effet positif sur NCC par blocage des effets inhibiteurs de WNK4. B: Nouvelle théorie. WNK4 se situe en amont de WNK1 et agit par inhibition de ce dernier ainsi que de WNK3.

8. Objectifs du travail

Lors de mon projet de master, l'objectif était de tester in vitro l'implication de la kinase WNK3 dans la régulation de l'activité du canal ENaC par Nedd4-2. Nous avons mesuré des courants ENaC (sensibles à l'amiloride) dans des oocytes de *Xenopus laevis* en présence de WNK3 seul ainsi que co-exprimé avec Nedd4-2.

9. Résultats

Pour commencer, on quantifie l'ARN de WNK3 et ENaC par électrophorèse sur gel avant de l'injecter dans les oocytes et de les incubent pendant 18-24 heures. On mesure alors le courant de sodium sensible à l'amiloride dans les oocytes en présence du canal seul afin de normaliser nos valeurs par rapport à ces résultats. Puis on mesure le courant avec le canal ENaC co-injecté avec WNK3. On observe une légère différence d'intensité de courant entre ces deux conditions mais qui n'est pas significative, comme le montre la figure 17. Notre expérience propose donc que WNK3 n'a pas d'effet sur ENaC. Des mesures ont été également effectuées sur des oocytes non-injectés et injectés avec WNK3 seul et ceux-ci n'induisent pas de variations de courant sensible à l'amiloride. La présence des protéines exprimées dans les oocytes est vérifiée sur Western Blot.

Dans un deuxième set d'expériences (cf. Figure 18), on recommence par mesurer les courants en présence d'ENaC seul. La co-injection d'ENaC et WNK3 mènent à la même conclusion que la première expérience, puisqu'aucune différence significative de courant n'est mesurée. On mesure ensuite ENaC et Nedd4-2 et on observe une forte baisse du courant de sodium indiquant une probable inhibition du canal par Nedd4-2. Dans un troisième temps, on mesure ENaC co-exprimé avec WNK3 et Nedd4-2. On observe à nouveau une activité du canal basse. Ceci n'indique donc pas de modification de l'effet de Nedd4-2 par WNK3. Pour cette expérience, on mesure également des oocytes non-injectés ainsi qu'injectés avec WNK3 seul et Nedd4-2 seul et aucune variation de courant n'est mesurée. On ajoute dans les Western Nedd4-2 phosphorylé sur les sérines 222 et 328, sites, rappelons-le, clés de la phosphorylation de Nedd4-2 par SGK1. On n'observe pas de différence d'expression des protéines entre les différentes versions de Nedd4-2.

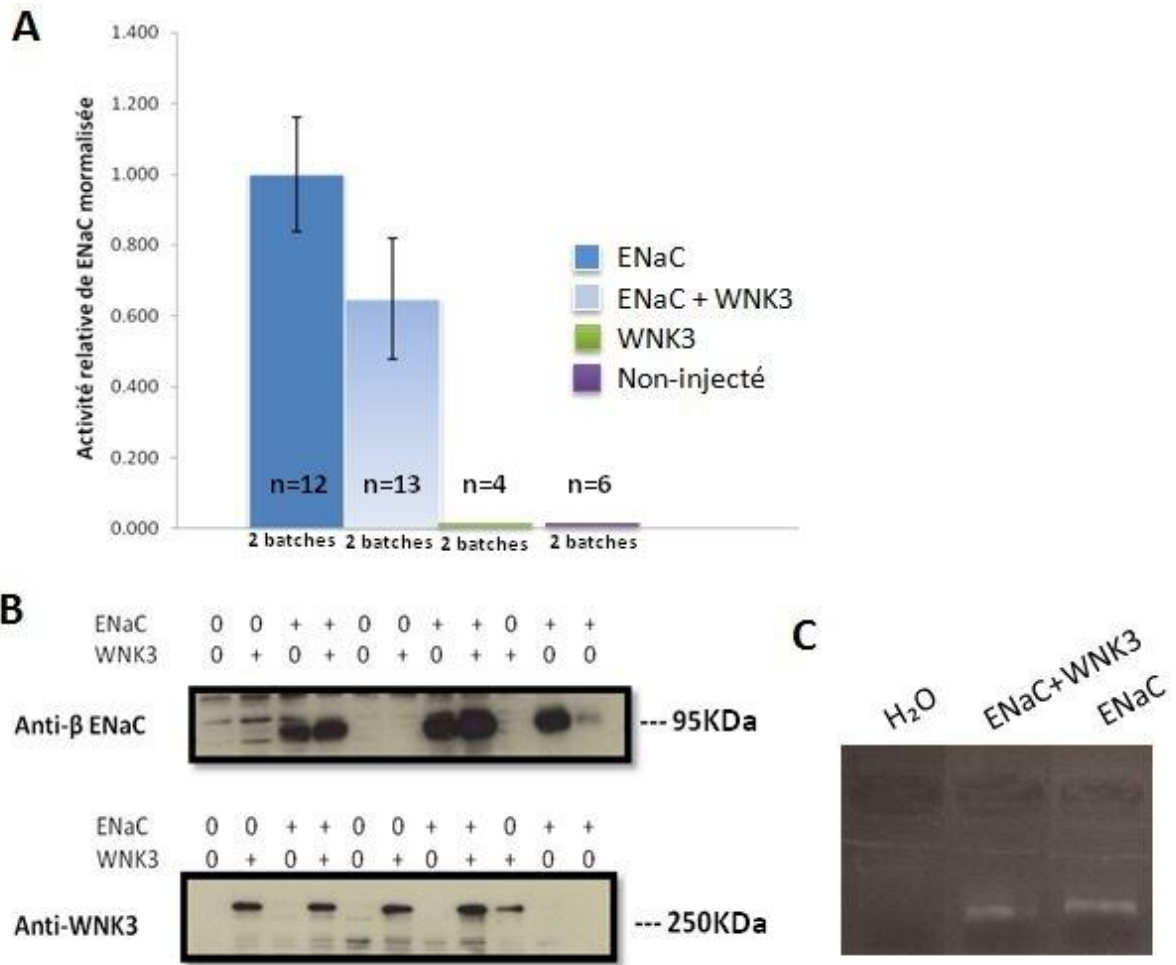


Figure 17: WNK3 n'a pas d'effet sur l'activité du canal ENaC

A: Des courants de sodium sensible à l'amiloride sont mesurés par électrophysiologie dans des oocytes. On mesure des oocytes co-exprimant WNK3 et ENaC et on normalise les valeurs avec les mesures de courants en présence d'ENaC seul. B: Westerns Blot des lysats protéiques des oocytes mesurés, incubés avec des anticorps anti-WNK3 et anti-βENaC. C Chaque oocyte reçoit la même concentration d'ARN, ceci vérifié par électrophorèse sur gels d'agarose.

10. Discussion

Le but de cette étude était de mesurer les effets de WNK3 sur l'activité du canal ENaC.

WNK3 est déjà connu pour participer à la régulation des cotransporteurs de la famille SCL12. Il active les cotransporteurs de chlore et de sodium comprenant NCC, NKCC1 et NKCC2 et inhibe les cotransporteurs de potassium et chlore: KCC 1 à 4. Par contre, plusieurs études ont démontré que WNK3 n'a pas d'effet sur l'activité d'ENaC (Leng et al., 2006; Rinehart et al., 2005). C'est également ce que suggère notre expérience puisqu'on ne mesure pas de variation significative de courant amiloride-sensitif entre ENaC exprimé seul et co-injecté avec WNK3.

WNK3 agit par phosphorylation de SPAK/OSR1, des kinases qui vont à leur tour phosphoryler des résidus sérine ou thréonine sur les cotransporteurs ce qui modifiera leur expression à la surface de la membrane plasmique.

Un autre mécanisme implique Nedd4-2. Cette ubiquitine-ligase est responsable de l'ubiquitination de nombreux canaux et cotransporteurs, ce qui provoque leur endocytose et dégradation (Rotin and Staub, 2012). L'aldostérone dans la régulation du canal ENaC, peut interférer avec cette voie en activant SGK1 qui phosphoryle Nedd4-2 sur des résidus S222 et S328 ce qui empêche son action sur ENaC. WNK3 peut également interférer avec Nedd4-2 et empêcher l'inhibition du transporteur NCC (Lagnaz et al., soumis). WNK3 n'agit pas par phosphorylation des mêmes résidus sérine que SGK1 mais le mécanisme exact reste inconnu (Arroyo et al., 2011a, 2011b). Dans notre expérience, on teste les effets de WNK3 sur Nedd4-2 concernant ENaC. En co-injectant WNK3, Nedd4-2 et ENaC, on observe la même activité qu'en présence de Nedd4-2 seul. WNK3 ne serait donc pas capable de prévenir les effets inhibiteurs de Nedd4-2 sur ENaC. A noter que sur les Western, nous n'observons également pas de différences d'expression de protéines sur les Western de Nedd4-2, Nedd4-2 pS222 et pS328, WNK3 n'influence donc pas l'état de phosphorylation de Nedd4-2.

WNK3 possède également un effet sur les canaux ROMK. Il agit en abaissant l'expression du canal à la surface de la membrane plasmique (Leng et al., 2006).

De par son action sur différents transporteurs à sodium et à chlore, on suppose que WNK3 agit comme un senseur du chlore intracellulaire et du volume cellulaire (Pacheco-Alvarez and Gamba, 2011). Une hypothèse suggère l'implication des domaines auto-inhibiteurs de WNK3. Ainsi, une déplétion volumique ou baisse de $[Cl^-]_i$ entraîne l'autophosphorylation de WNK3, ce qui correspond à l'inactivation des domaines auto-inhibiteurs. WNK3 peut ensuite répondre à la stimulation en phosphorylant des cotransporteurs SCL12, c'est-à-dire une activation des cotransporteurs Na-Cl et inhibition des cotransporteurs K-Cl rétablissant l'équilibre.

10 Discussion

La fonction de WNK3 *in vivo* reste à prouver puisqu'une étude a démontré que la perte de WNK3 peut largement être compensée par WNK1 et WNK4 ou alors que WNK3 ne joue qu'un rôle limité *in vivo* dans le rein (Mederle et al., 2013; Oi et al., 2012). En effet, les souris dont le gène codant pour WNK3 est inactivé sont viables et ne présentent pas de grosses anomalies dans leur fonction rénale et bilan sodique et arborent une tension normale. La réponse du rein à des variations de régime de sel est conservée. On note effectivement, après un régime pauvre en sel, une augmentation de la phosphorylation de NCC et NKCC2 ainsi que SPAK/OSR1. La fonction de WNK3 est donc bien contrebalancée. On peut supposer que cela est dû à une compensation par les autres WNKs puisqu'on mesure dans les souris WNK3 KO une augmentation de WNK1 et WNK4.

En revanche, dans une expérience où le gène *WNK4* est réprimé (Castañeda-Bueno et al., 2012), on observe chez les souris un léger syndrome de Gitelman. En effet, en absence de WNK4 et dans des conditions de régime pauvre en sel, l'angiotensine II n'est plus en mesure d'activer la voie WNK4-SPAK/OSR1-NCC. Ceci démontre un manque de compensation par les autres WNKs alors que la pression artérielle est maintenue grâce à une stimulation importante d'ENaC en réponse à l'augmentation de rénine. Donc si WNK3 peut être compensé par WNK1 et WNK4 alors que WNK4 pas, c'est que son rôle n'est pas essentiel ou alors qu'il se trouve en concentration trop faible dans le rein *in vivo*.

La fonction de WNK3, de la même manière que WNK4, sur les cotransporteurs de la famille SCL12 est dépendante de son domaine catalytique alors que ce n'est pas le cas pour son action sur ROMK (San-Cristobal et al., 2008). Si l'on inhibe la fonction kinase de WNK3, ses effets inhibiteurs sur ROMK sont préservés (Leng et al., 2006). Alors qu'en ce qui concerne les cotransporteurs Na-Cl et K-Cl, ses effets sont non seulement prévenus mais également inversés (activation des cotransporteurs K-Cl et inhibition des cotransporteurs Na-Cl). Sachant que WNK3 et WNK4 ont des effets similaires sur KCC mais opposés sur les cotransporteurs NCC et NKCC1 et 2, on recherche un domaine clé définissant leurs effets respectifs en plus de la fonction catalytique nécessaire dans tous les cas. Les résultats de différentes études divergent proposant tantôt d'attribuer cette fonction au domaine amino-terminus, tantôt au domaine carboxyl.

En conclusion, WNK3 est connu pour participer à la régulation du bilan sodique de par ses effets régulateurs sur les cotransporteurs Na-Cl et K-Cl membres de la famille SCL12, concernant ENaC, on tend à affirmer que WNK3 n'exerce aucun effet sur ce canal cela ayant été expérimenté et visualisé dans de précédentes études ainsi que la nôtre.

De plus, bien qu'il ait été démontré que WNK3 exerce une fonction dans le néphron des oocytes de *Xenopus laevis*, son indispensabilité *in vivo* reste à prouver.