



les cellules sensorielles des souris doubles-mutantes ? Dans de très nombreux cas de surdité congénitale touchant des gènes exprimés dans les cellules sensorielles, les structures ciliées apicales sont endomag es. Dans le cas des souris *Tmc1/2* doubles-mutantes, la structure apicale reste relativement bien conservée durant la 1^{re} semaine postnatale. Nous nous sommes donc demandé si la réintroduction des gènes manquants pourrait permettre de rétablir la m canosensibilit  des cellules ciliées. Nous avons ainsi crée des vecteurs adénoviraux nous permettant de réintroduire les gènes *Tmc1* et/ou *Tmc2* dans les cellules ciliées de cochlées prélevées durant la 1^{re} semaine postnatale chez les souris doubles-mutantes (*Tmc1^{Δ/Δ}* ; *Tmc2^{Δ/Δ}*). La réintroduction des gènes *Tmc1* ou *Tmc2* restitue la m canosensibilit  dans les cellules ciliées cochléaires (Figure 1C), ce qui n'est pas le cas pour la forme mutante *dn* de *Tmc1* [8]. Ces résultats sont très encourageants car ils suggèrent qu'ajouter le maillon manquant durant la période critique du développement permettrait de rétablir le fonctionnement des récepteurs sensoriels de l'oreille. Il est envisageable que l'application de cette technique *in vivo* chez la souris double-mutante puisse ainsi restituer, au moins en partie, une réceptivité auditive et vestibulaire.

Les protéines transmembrane channel-like (TMC) : une famille au rôle inconnu

Tandis que huit gènes appartenant à la famille des TMC ont été identifiés chez les vertébrés, leur fonction reste inconnue. Dans l'oreille interne, TMC1 et TMC2 sont nécessaires au bon fonctionnement des cellules ciliées durant le développement. Ils contribuent à l'initiation et au bon fonctionnement du complexe moléculaire m canosensible présent à l'extrémité des stéréocils. Forment-ils le canal de mécanotransduction dont l'identité reste un mystère ? Bien que cela soit possible, il reste à démontrer que ces molécules sont capables de former un canal transmembranaire dont les propriétés biophysiques (en particulier perméabilité et pharmacologie) reflètent celles des canaux m canosensibles des cellules ciliées. Les gènes *Tmc* sont exprimés dans de nombreux tissus [9] et ils codent pour des protéines possédant 6 à 8 domaines transmembranaires relativement bien conservés entre l'homme et la souris (75 à 96 % d'homologie). De tels chiffres suggèrent que ces protéines jouent un rôle essentiel, non seulement dans les cellules ciliées, mais aussi dans de nombreux autres types cellulaires – peut-être m canosensibles. ♦

TMC1 and TMC2: key partners in hearing and vestibular function

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

REMERCIEMENTS

L'auteur remercie Deborah Scheffer, Véronique Pingault et Alban Latrioni re pour leurs commentaires sur le manuscrit. Ce travail a été soutenu par le National Institutes of Health (NIH).

RÉFÉRENCES

1. Hardelin JP, Denoyelle F, Levilliers J, et al. Les surdités héréditaires : génétique moléculaire. *Med Sci (Paris)* 2004 ; 20 : 311-6.
2. Grillet N. Harmonine est un composant de la machinerie de mécanotransduction auditive. *Med Sci (Paris)* 2009 ; 25 : 903-6.
3. Deol MS, Kocher W. A new gene for deafness in the mouse. *Heredity* 1958 ; 12 : 463-6.
4. Steel KP, Bock GR. The nature of inherited deafness in deafness mice. *Nature* 1980 ; 288 : 159-61.
5. Kurima K, Peters LM, Yang Y, et al. Dominant and recessive deafness caused by mutations of a novel gene, *TMC1*, required for cochlear hair-cell function. *Nat Genet* 2002 ; 30 : 277-84.
6. Vreugde S, Erven A, Kros CJ, et al. Beethoven, a mouse model for dominant, progressive hearing loss DFNA36. *Nat Genet* 2002 ; 30 : 257-8.
7. Marcotti W, Erven A, Johnson SL, et al. *Tmc1* is necessary for normal functional maturation and survival of inner and outer hair cells in the mouse cochlea. *J Physiol* 2006 ; 574 : 677-98.
8. Kawashima Y, G l oc GS, Kurima K, et al. Mechanotransduction in mouse inner ear hair cells requires transmembrane channel-like genes. *J Clin Invest* 2011 ; 121 : 4796-809.
9. Keresztes G, Mutai H, Heller S. TMC and EVER genes belong to a larger novel family, the TMC gene family encoding transmembrane proteins. *BMC Genomics* 2003 ; 4 : 24.

NOUVELLE

KLHL3 et CULLIN-3

Deux nouveaux gènes responsables d'une forme m d lienne d'hypertension artérielle

Hélène Louis-Dit-Picard^{1,2}, Juliette Hadchouel^{1,2},
Xavier Jeunemaitre^{1,2,3}

Rôle des gènes *WNK1*, *WNK4* et *KLHL3* dans l'hypertension hyperkaliémique familiale

L'étude des formes m d liennes d'hypertension artérielle, a permis des avancées remarquables dans la compréhension des

mécanismes de régulation de la pression artérielle, en dépit de la rareté de ces formes. L'hypertension hyperkaliémique familiale (HHF), aussi connue sous le terme de syndrome de Gordon ou de pseudo-hypoadost ronisme de type 2, est une de

ces formes rares d'hypertension artérielle, transmise essentiellement selon un mode autosomique dominant [1]. Les sujets atteints présentent des anomalies métaboliques associant hyperkaliémie, acide métabolique et hyperchlorémie en

¹ Inserm, UMRS 970, Centre de recherche PARCC (Paris centre de recherche cardiovasculaire), Paris, France ;

² Université Paris Descartes, Paris-Sorbonne-Cité, Faculté de Médecine, Paris, France ;

³ Assistance publique-hôpitaux de Paris (AP-HP), département de génétique, Hôpital Européen Georges Pompidou (HEGP), 56, rue Leblanc, 75015 Paris, France. xavier.jeunemaitre@inserm.fr

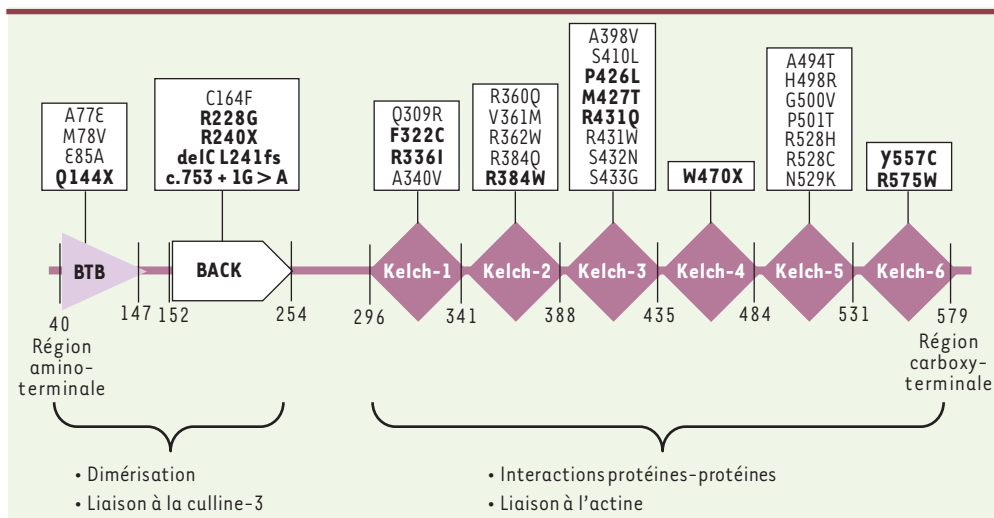


Figure 1. Schéma de la protéine KLHL3 et localisation de l'ensemble des mutations retrouvées dans l'hypertension hyperkaliémique familiale. La protéine KLHL3 est composée de 3 domaines différents : un domaine BTB (Bric-à-brac, *Tramtrack*, *Broad complex*), responsable de la dimérisation de la protéine ; un domaine BACK (*BTB and carboxy-terminal Kelch*) et un domaine KELCH, composé de 6 motifs Kelch formant une hélice à 6 pales de feuillets β . Les 37 mutations différentes (22 hétérozygotes et 15 homozygotes représentées en gras) sont essentiellement des mutations faux-sens situées dans le domaine KELCH [5, 6].

l'absence de toute insuffisance rénale. Ces désordres métaboliques, associés à la grande efficacité des diurétiques thiazidiques révèlent une anomalie primaire de réabsorption ionique au niveau du rein. En 2001, nous avons identifié, en collaboration avec l'équipe de R.P. Lifton (Université de Yale, New Haven, États-Unis), les deux premiers gènes responsables de cette pathologie [2]. Ces deux gènes, *WNK1* et *WNK4* (*With no K [lysine]*), codent pour deux sérine thréonine kinases de structure et d'expression particulièrement complexes [3]. Par la suite, des études *in vitro* puis *in vivo* ont montré les fonctions activatrices et inhibitrices de *WNK1* et *WNK4* sur plusieurs transporteurs ioniques, en particulier le cotransporteur Na^+-Cl^- , *NCC* [4]. Cependant, les mutations trouvées dans les gènes *WNK1* et *WNK4* n'expliquent qu'une partie minoritaire des cas décrits. Un ou plusieurs autres gène(s) devrai(en)t donc être également responsable(s) de cette pathologie. Deux publications récentes viennent de combler cette lacune en identifiant le rôle essentiel d'un mécanisme moléculaire de dégradation protéique par ubiquitination dans la régulation du trans-

port ionique et de la pression artérielle [5, 6]. Les deux équipes - dont la nôtre - ont utilisé les outils modernes de la génétique humaine, en particulier des études d'exome entier, pour la recherche de mutations codantes dans une pathologie rare. Notre étude a associé deux stratégies : une étude de liaison classique par *Lod score*¹ et la recherche de variants codants par analyse d'exome entier [6]. La recherche d'un intervalle de liaison a été effectuée à partir de deux familles qui ne présentaient pas de mutations dans les gènes *WNK1* et *WNK4*. L'une d'entre elles a été recrutée dans le département de génétique de l'hôpital européen Georges Pompidou (HEGP) à Paris (Dr X. Jeunemaitre), l'autre à l'institut du thorax à Nantes (Inserm UMR 915, Dr J.J. Schott). Une seule région était commune aux deux familles (5q31.2) avec un *Lod score* cumulé très significatif (9,0). Cette étude de liaison a été complétée par un séquençage d'exome entier chez trois cas atteints et un sujet non atteint

¹ Le *Lod score* est défini comme le logarithme décimal du rapport de la probabilité d'observation d'une famille sous l'hypothèse d'une liaison d'une distance θ entre deux locus à la probabilité d'observation de cette même famille sous l'hypothèse d'indépendance.

de chaque famille. Un seul gène, *KLHL3* (*Kelch-like 3*), présentait, chez les cas atteints des deux familles, des mutations faux-sens considérées comme pathogènes par plusieurs logiciels de prédiction bioinformatique. L'implication du gène *KLHL3* a pu être rapidement vérifiée par la coségrégation mutation-pathologie dans les deux familles initiales et par l'identification de 14 autres mutations faux-sens supplémentaires chez 17 autres sujets atteints non apparentés. Dans 13 cas, la mutation était présente à l'état hétérozygote, en accord avec la transmission dominante atten-

due. Dans quatre cas issus de familles consanguines, la mutation était présente à l'état homozygote, correspondant à une forme apparemment récessive [6]. L'expression forte de *KLHL3* dans le néphron et sa colocalisation avec le cotransporteur *NCC* dans le tubule contourné distal renforçaient les arguments de causalité de ce gène dans la pathologie.

Les mutations de *KLHL3* et *Cullin-3* modifient l'expression d'un transporteur rénal ionique

À la même période, une équipe américaine identifiait indépendamment par analyse d'exome entier le même gène, *KLHL3*, comme responsable de la pathologie [5]. Elle répertoria 24 mutations différentes, la plupart faux-sens, mais également non-sens, petites délétions et mutations d'épissage. Seize mutations étaient présentes à l'état hétérozygote, huit à l'état homozygote ou hétérozygote composite, expliquant ainsi la présentation parfois dominante ou récessive de la pathologie. L'ensemble des mutations *KLHL3* retrouvées par les deux équipes sont indiquées dans la

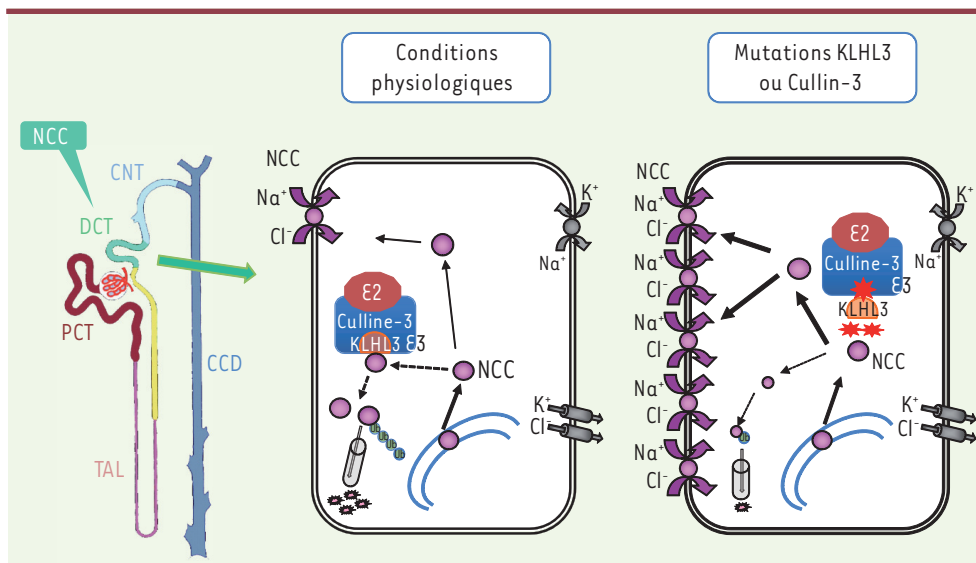


Figure 2. Modèle proposé pour expliquer les modifications d'expression du cotransporteur NCC en présence de mutations des gènes KLHL3 et Cullin-3. Un schéma d'un tubule rénal est représenté à gauche. Le cotransporteur $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ (NCC) est exprimé dans le tube contourné distal (DCT). Au niveau cellulaire, KLHL3 et culline-3 participent à la régulation de son activité via un processus d'ubiquitination. Culline-3 est une protéine appartenant au complexe E3 ubiquitine ligase dégradant les protéines via le protéasome

après ubiquitination. KLHL3 est un partenaire d'interaction de la culline-3, essentiel pour la reconnaissance des substrats, dont NCC. Dans le cas de l'hypertension hyperkaliémique familiale, les mutations de KLHL3 ou culline-3 empêchent l'interaction de NCC avec le complexe E3 ligase, diminuant ainsi sa dégradation, ce qui a pour conséquence une augmentation de son expression et de son activité à la membrane, et donc une absorption accrue de NaCl. CCD : cortical collecting duct ; DCT : distal convoluted tubule ; PCT : proximal convoluted tube ; TAL : thick ascending limb of the loop of Henle.

Figure 1. De plus, l'équipe de R.P. Lifton montrait la présence de mutations hétérozygotes du gène *Cullin-3* chez 17 autres sujets atteints. Ces mutations, survenant pour la plupart *de novo*, étaient détectées dans des formes plus sévères de la pathologie. Toutes correspondaient à des mutations d'épissage de l'exon 9 du gène *Cullin-3*. Nous avons confirmé par la suite ce même type de mutations chez sept sujets atteints, ayant aussi une forme précoce et sévère de la pathologie.

KLHL3 et culline-3 : partenaires d'un complexe d'ubiquitination de protéines impliquées dans le transport rénal

Que sont donc les protéines Kelch-like 3 et culline-3 ? La protéine Kelch-like 3 appartient à la famille des protéines à domaine BTB-BACK (*broad-complex, tramtrack and bric a brac* - BTB and C-terminal Kelch) liant l'actine par leur domaine KELCH [7]. Ce domaine est composé de six motifs Kelch (57 acides aminés chacun), séquences permettant de lier des substrats pour la liaison à la culline-3. Les cullines sont des protéines essentielles du complexe E3 ubiquitine ligase dirigeant les protéines cibles vers

la dégradation par le protéasome après ubiquitination [8]. La spécificité d'ubiquitination de multiples substrats est obtenue essentiellement par la possibilité d'interaction avec de très nombreuses protéines BTB, dont les protéines Kelch. Ces éléments orientaient donc vers la présence de mutations « perte de fonction » pour Kelch-like 3 et culline-3, ces deux partenaires participant à un complexe d'ubiquitination de protéines impliquées dans le transport rénal. Le cotransporteur NCC devenait un candidat idéal tant par son rôle connu dans la pathologie que par sa coexpression dans le néphron distal avec Kelch-like 3 [6]. Le niveau d'expression membranaire de NCC est soumis à une régulation complexe, impliquant des mécanismes contrôlant son adressage à la membrane, mais aussi sa dégradation. Une étude récente a mis en évidence que NCC pouvait être soumis à une dégradation dans le réticulum endoplasmique, l'ubiquitination participant à cette dégradation [9]. Un deuxième niveau de régulation, post-traductionnel, de NCC concerne son expression membranaire et fait vraisemblablement intervenir plusieurs mécanismes dont l'endocytose de ce cotransporteur [10].

Kelch-like 3 et culline-3 pourraient participer à ce processus en modulant l'ubiquitination de NCC. Nous avons d'abord testé la régulation conjointe de Kelch-like 3 et NCC dans des conditions hypotoniques, conditions connues comme entraînant une redistribution de NCC des vésicules subapicales cytoplasmiques vers la membrane apicale dans le rein [11]. Sous l'influence d'un milieu hypotonique, l'expression membranaire de NCC dans des cellules HEK293T transfectées augmente de 50 %, alors que celle de Kelch-like 3 est diminuée de 30 %. De plus, l'inhibition de l'expression de Kelch-like 3 par ARN interférence dans un milieu classique augmente l'expression membranaire de NCC, suggérant que KLHL3 est un facteur de régulation négatif de l'expression membranaire de NCC [6].

Modèle d'interaction entre KLHL3-culline-3 et NCC

Un modèle schématique d'interaction entre Kelch-like 3-culline-3 et NCC est résumé dans la Figure 2. Kelch-like 3 et culline-3 participent à la structure d'un complexe E3 ligase ayant pour cible le cotransporteur NCC dans le néphron distal. En l'absence de mutation, ce

complexe permet la dégradation par le protéasome d'une partie des protéines NCC produites dans le réticulum endoplasmique. En présence de mutations des gènes *KLHL3* ou *Cullin-3*, l'interaction des protéines avec leur substrat NCC est altérée et la dégradation du cotransporteur *via* le protéasome est réduite. En conséquence, un plus grand nombre de molécules NCC seraient présentes à la membrane, entraînant l'augmentation de l'activité de réabsorption rénale d'ions Na^+ et Cl^- . Cette activité accrue de NCC rend compte de la grande sensibilité des patients aux diurétiques thiazidiques, NCC étant la cible privilégiée de ces agents pharmacologiques.

Une nouvelle voie de recherche

De nombreux points restent à élucider, parmi lesquels : existe-t-il d'autres transporteurs cibles de ce système d'ubiquitination ? Existe-t-il d'autres protéines Kelch (famille de 38 membres) capables de lier la culline-3 au niveau rénal et de jouer un rôle dans la régulation du transport ionique et de la pression

artérielle ? Quelles sont les interactions directes et indirectes entre les différents partenaires ? Quelles sont les relations avec *WNK1* et *WNK4* dont les mutations sont responsables de la même pathologie ? Comment expliquer que des mutations dans des protéines aussi ubiquitaires entraînent un phénotype essentiellement rénal ?

En conclusion, deux études parallèles ont identifié deux gènes inattendus responsables d'une forme mendélienne d'hypertension artérielle. Les protéines correspondantes appartiennent à un mécanisme de dégradation de molécules impliquées dans le transport ionique. Comme cela fut le cas pour les gènes *WNK1* et *WNK4* dix ans auparavant, la découverte de mutations dans des gènes codant pour des acteurs insoupçonnés pose de nombreuses questions physiopathologiques et ouvre une nouvelle voie de recherche. ♦

KLHL3 and CULLIN-3: new genes involved in familial hypertension

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

- Gordon RD. Syndrome of hypertension and hyperkalemia with normal glomerular filtration rate. *Hypertension* 1986 ; 8 : 93-102.
- Wilson FH, Disse-Nicodeme S, Choate KA, et al. Human hypertension caused by mutations in *WNK* kinase. *Science* 2001 ; 293 : 1107-12.
- Hadchouel J, Delalay C, Jeunemaitre X. *WNK1* et *WNK4*, nouveaux acteurs de l'homéostasie hydrosodée. *Med Sci (Paris)* 2005 ; 21 : 55-60.
- Hadchouel J, Jeunemaitre X. Life and death of the distal nephron: *WNK4* and *NCC* as major players. *Cell Metab* 2006 ; 4 : 335-7.
- Boyden LM, Choi M, Choate KA, et al. Mutations in kelch-like 3 and cullin 3 cause hypertension and electrolyte abnormalities. *Nature* 2012 ; 482 : 98-102.
- Louis-Dit-Picard H, Barc J, Trujillano D, et al. *KLHL3* mutations cause familial hyperkalemic hypertension by impairing ion transport in the distal nephron. *Nat Genet* 2012 ; 44 : 456-60.
- Wilhelm K. BTB protein as henchmen of Cul3-based ubiquitin ligases. *Nat Cell Biol* 2003 ; 5 : 950-1.
- Pintard L, Willems A, Peter M. Cullin-based ubiquitin ligases: Cul3-BTB complexes join the family. *EMBO J* 2004 ; 23 : 1681-7.
- Needham PG, Mikoluk K, Dhakarwal P, et al. The thiazide-sensitive NaCl cotransporter is targeted for chaperone-dependent endoplasmic reticulum-associated degradation. *J Biol Chem* 2011 ; 286 : 43611-21.
- Mount DB. Regulated endocytosis of *NCC*. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010 ; 299 : F297-9.
- Frindt G, Palmer LG. Surface expression of sodium channels and transporters in rat kidney: effects of dietary sodium. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009 ; 297 : F1249-55.

NOUVELLE

Impact des nouveaux antirétroviraux chez les patients infectés par le VIH en échec virologique

Dominique Costagliola

> Les antirétroviraux, qui permettent de contrôler la charge virale du VIH (virus de l'immunodéficience humaine), sont apparus sur le marché en 1987. Il s'agissait d'inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse. Jusqu'en 1996, ils ont été principalement utilisés en mono- ou bithérapie. À partir de 1996, une deuxième famille est apparue, les inhibiteurs de protéase ; puis, en 1998, une troisième famille, les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase

inverse. L'association de ces molécules en trithérapies a conduit à une spectaculaire amélioration du pronostic des patients infectés par le VIH. Néanmoins, dès la fin des années 1990, certains patients étaient porteurs de virus résistants aux médicaments de ces trois familles, et peu d'options thérapeutiques alternatives existaient. Dans la plupart des publications décrivant cette situation d'impasse thérapeutique, les antirétroviraux avaient été prescrits

Université Pierre et Marie Curie (UPMC) Paris 6, Inserm UMR S943, Assistance publique-hôpitaux de Paris (AP-HP), service des maladies infectieuses et tropicales, hôpital Pitié-Salpêtrière, 56, boulevard Vincent Auriol, 75013 Paris, France.
dominique.costagliola@ccde.chups.jussieu.fr

initialement sous la forme de mono- ou bithérapies à la majorité des patients [1-3].

Le projet PLATO II (*Pursuing later treatment option II*), qui regroupe des populations de patients atteints du VIH dans le cadre du programme européen COHERE (*Collaboration of observational HIV epidemiological research europe*), s'est fixé pour objectif de caractériser les patients résistants aux trois premières familles d'antirétroviraux en Europe de