



HAL
open science

Régulation du co-transporteur rénal NKCC2 par les interactions protéine-protéine : rôle de la protéine α -1,2 Mannosidase IA, ManIA

Sylvie Demaretz

► **To cite this version:**

Sylvie Demaretz. Régulation du co-transporteur rénal NKCC2 par les interactions protéine-protéine : rôle de la protéine α -1,2 Mannosidase IA, ManIA. Sciences du Vivant [q-bio]. 2021. hal-04861847

HAL Id: hal-04861847

<https://ephe.hal.science/hal-04861847v1>

Submitted on 2 Jan 2025

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NoDerivatives 4.0 International License



École Pratique
des Hautes Études



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES

Sciences de la Vie et de la Terre

Régulation du co-transporteur rénal NKCC2 par les interactions protéine-protéine : rôle de la protéine α -1,2 Mannosidase IA, ManIA

Mémoire présenté par Sylvie Demaretz

pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études - PSL

Soutenu le 17 décembre 2021

devant le jury suivant :

Dr. Gad-Lapiteau Sophie – Présidente

Dr. Laghmani Kamel – Tuteur scientifique

Dr. Thenet Sophie – Tutrice pédagogique

Dr. Gallazzini Morgan – Rapporteur

Dr. Foufelle Fabienne – Examinatrice

Mémoire préparé sous la direction de : Dr. Laghmani Kamel

structure d'accueil : Centre de Recherche les Cordeliers, INSERM U1138
Physiologie Rénale et Tubulopathies CNRS ERL8228, Paris

et

sous la direction de : Dr. Thenet Sophie

structure d'accueil EPHE - PSL : Centre de Recherche Saint-Antoine, Equipe Microbiote Intestin Inflammation. EPHE/PSL, GRET Les cellules et leur environnement: dynamique des interactions (CEDI), Paris

TABLE DES MATIERES

LISTES DES FIGURES	1
LISTES DES ABREVIATIONS	3
INTRODUCTION	6
Le néphron	7
La rétroaction tubuloglomérulaire, ou inhibition du retour tubuloglomérulaire	8
LA BRANCHE ASCENDANTE LARGE DE HENLE	11
Mécanisme de réabsorption du sodium dans la TAL médullaire	12
LE SYNDROME DE BARTTER	12
LE TRANSPORTEUR NKCC2.....	19
Structure-fonction de NKCC2	20
Épissage alternatif de NKCC2.....	22
N-glycosylation et maturation de NKCC2	25
Régulation hormonale de NKCC2 dans la TAL.....	26
Mécanismes moléculaires de la régulation de NKCC2	27
Turn-over au niveau de la membrane plasmique (trafficking)	27
Endocytose de NKCC2	29
Phosphorylation de NKCC2	29
Phosphorylation par SPAK et OSR1	30
Phosphorylation par la PhosphoKinase A (PKA).....	32
Phosphorylation par l'AMP-activated protein kinase (AMPK).....	33
La régulation de NKCC2 par les interactions protéine-protéine	34
Aldolase B	34
The tetraspan protein myelin and lymphocytes-associated protein (MAL/VIP17) ..	35
Secretory carrier-associated membrane protein (protéine de structuration des vésicules 2 -Scamp2)	35
Mosein	36
Dynamine2, Clathrine et radeaux lipidiques	36
Annexine (AnxA2).....	37
Protéine membranaire associée aux vésicules 2 (VAMP2)	37
Calcineurin (PP2B) and Sorting-Related Receptor with A-Type (SORLA).....	38
the Alström syndrome 1 (ALMS1) gene locus	38
Osteosarcomas 9 (OS9).....	39
protéine chaperon de stress 70 (STCH) et la protéine de choc thermique 70 (Hsp70)	39
Le contrôle qualité et le système de Dégradation des protéines Associé au Réticulum Endoplasmique (ERAD)	42
Généralités sur l'ERAD et le contrôle qualité des protéines	42
L'ERAD des protéines membranaires, cytosoliques et lumenales	43

CONTEXTE DE L'ETUDE.....	46
LA PROTEINE MANNOSYL-OLIGOSACCHARIDE 1,2-ALPHA-MANNOSIDASE IA ManIA).....	48
OBJECTIFS	53
METHODES	54
RESULTATS	66
La ManIA interagit avec NKCC2 dans des cellules rénales de mammifères d'opossum in vitro	64
Le transporteur NKCC2 colocalise avec la ManIA au niveau cis-Golgien dans les cellules OKP	65
La ManIA diminue la maturation de NKCC2 et la quantité du corps glycosylé dans les cellules OKP	69
La ManIA accélère la dégradation de NKCC2 immature et stabilise sa maturation dans les cellules OKP.....	69
La ManIA interagit avec NKCC2 dans des cellules rénales humaines en culture	70
Le transporteur NKCC2 colocalise avec la ManIA au niveau cis-Golgien dans les cellules HEK293.....	72
La ManIA diminue la maturation de NKCC2 et la quantité du corps glycosylé dans les cellules HEK293.....	75
La ManIA accélère la dégradation de NKCC2 immature et stabilise sa maturation dans les cellules HEK293.....	77
L'effet de la ManIA sur NKCC2 est aboli par l'inhibiteur du protéasome MG132	78
L'inhibition des alpha 1,2 mannosidases n'abolit pas totalement l'effet de ManIA sur NKCC2 dans les cellules HEK293 et OKP	79
L'effet de la ManIA sur NKCC2 passe par sa partie cytosolique et par sa partie catalytique ...	81
L'effet de la ManIA et de ses mutants est stable dans le temps dans les cellules HEK293	82
L'Immunoprécipitation de Cytox ne prévient pas l'interaction avec NKCC2.....	75
La délétion du domaine cytoplasmique dans le mutant Cytox n'abolit pas l'interaction de la ManIA avec NKCC2	86
L'interaction avec NKCC2 diminue en présence du Cytox par rapport à l'interaction avec la ManIA	87
Le mutant NKCC2 A508T de Bartter est plus sensible à la dégradation régulée par la ManIA	89
La ManIA interagit davantage avec le mutant A508X	91
L'activité catalytique de la ManIA est dispensable dans l'ERAD de NKCC2	92
DISCUSSION	93
CONCLUSION	102
PERSPECTIVES.....	103
BIBLIOGRAPHIE	104
ANNEXES	112

LISTES DES FIGURES

Figure 1 : Illustration générale de l'appareil Urinaire

Figure 2 : Représentation schématique d'une coupe d'une pyramide de Malpighi et du corpuscule rénal

Figure 3 : Schéma d'un néphron, image de Servier Médical Art

Figure 4 : L'appareil juxtaglomérulaire et les cellules de la macula densa

Figure 5 : Le débit de Filtration glomérulaire (DFG) et ses mécanismes de régulation

Figure 6 : Contribution des différents segments du néphron à la réabsorption de la charge filtrée de sodium (Na)

Figure 7 : Schéma d'une cellule de la branche ascendante large de de Henle

Figure 8 : Schéma d'une cellule de la branche ascendante large de de Henle, types de Bartter

Figure 9 : Représentation de la famille des cotransporteurs chlorure à couplage cationique électroneutre (CCC).

Figure 10 : Structure schématique du cotransporteur Na⁻/K⁻/2Cl⁻ (NKCC2)

Figure 11 : Distribution des variants d'épissage du co-transporteur Na⁺-K⁺-Cl⁻ (NKCC2) dans le rein adulte souris (ms) par hybridation in situ

Figure 12 : Schéma de la localisation des trois isoformes de NKCC2 dans la TAL

Figure 13 : Schéma du cotransporteur NKCC2 humain

Figure 14 : Mise en évidence des voies de régulation hormonales de NKCC2 dans la branche ascendante large de Henle

Figure 15 : Un modèle du Trafic, ou trafficking en Anglais, de NKCC2 dans la TAL

Figure 16 : les sites de phosphorylations de NKCC2 et la conservation inter-espèces

Figure 17 : Proposition de régulation de la phosphorylation des transporteurs NCC (tubule contourné distal) et NKCC2 (branche ascendante large de Henle) par SPAK/OSR1

Figure 18 : Représentation de l'AMPc comme un " pivot " dans la régulation de NKCC2

Figure 19 : Récapitulation des découvertes sur la régulation de NKCC2 par les interactions protéine-protéine

Figure 20 : les différentes Classes de substrat de l'ERAD des protéines membranaires, cytosoliques ou luminales

Figure 21 : Les étapes de la dégradation associée au réticulum endoplasmique (ERAD)

Figure 22 : schéma de la réaction catalysée par la mannosidase α 1-2 A1

Figure 23 : Présentation des trois sous familles de la famille GH47 49

Figure 24 : Schéma de la N-glycosylation par étapes

Figure 25 : Les différents type de protéines transmembranaires

Figure 26 : Le principe du double hybride

Figure 27 : phénotype des levures AH 109 et Y187

Figure 28 : les différents gènes rapporteurs des souches de levure AH109 et Y187

Figure 29 : Etapes générales résumées du double hybride

Figure 30 : les trois appâts C1, C2, C3 de la partie C-terminal cytosolique de NKCC2 utilisés pour le double hybride

Figure 31: La ManIA interagit avec le core glycosylé du cotransporteur NKCC2 dans les OKP

Figure 32 : Mise en évidence par microscopie confocale de la distribution de la ManIA et de la colocalisation de la ManIA avec NKCC2 dans les cellules OKP. Triple marquage NKCC2, ManIA, Calnexine (réticulum endoplasmique)

Figure 33 : Mise en évidence par microscopie confocale de la distribution de la ManIA et de la colocalisation de la ManIA avec NKCC2 dans les cellules OKP. Triple marquage NKCC2, ManIA, GM130 (cis Golgi)

Figure 34 : La Mania diminue le complexe et le core glycosylé de NKCC2 dans les cellules OKP d'une manière dose dépendante

Figure 35 : La ManIA limite la maturation de NKCC2 et accélère la diminution de son core glycosylé

Figure 36 : La ManIA interagit avec le core glycosylé du cotransporteur NKCC2 dans les cellules HEK293

Figure 37 : La ManIA colocalise avec NKCC2 dans le cis Golgi des cellules HEK293

Figure 38 : l'augmentation des taux de la ManIA diminue le taux de NKCC2 et son invalidation augmente le taux de NKCC2 dans les HEK293

Figure 39 : La ManIA limite la maturation de NKCC2 et accélère légèrement la dégradation de son core glycosylé dans les cellules HEK293

Figure 40 : l'effet de la ManIA sur NKCC2 est inhibé par MG132 mais pas par la chloroquine

Figure 41 : Effet de l'inhibiteur des mannosidase alpha1,2, sur la maturation de NKCC2 et la stabilité de son core glycosylé dans les cellules HEK293

Figure 42 : Effet de l'inhibiteur des mannosidase alpha1,2, Kifunensine sur la maturation de NKCC2 et la stabilité de son core glycosylé dans les cellules OKP

Figure 43: Les délétions Cytos ou Catax n'abolissent pas complètement l'effet de la ManIA sur le taux du cotransporteur NKCC2

Figure 44 : Evolution du taux de NKCC2 en fonction du temps en présence de la ManIA, ou de ses mutants Cytos ou Catax

Figure 45 : Immunoprécipitation des mutants Cytos et Catax en présence de NKCC2

Figure 46 : La ManIA interagit moins avec NKCC2 lorsque sa partie cytosolique est tronquée

Figure 47 : Le mutant NKCC2 A508T est plus instable que NKCC2 sauvage lorsque le taux de la ManIA est augmenté dans les cellules HEK293

Figure 48 : La ManIA interagit davantage avec le mutant A508T et moins avec le mutant Y998X par rapport à la forme sauvage de NKCC2

Figure 49 : L'ERAD de NKCC2 ne passe pas forcément par la fonction de démannosylation de la ManIA

Figure 50 : Hypothèse de régulation de NKCC2 via l'ERAD versus l'EGAD chez l'homme

Figure 51 : Proposition de régulation de l'ERAD de NKCC2 par la ManIA

LISTES DES ABREVIATIONS

- (**20-HETE**) acide 20-hydroxyeicosatétraénoïque
- (**AD**) autosomique dominante
- (**ADNc**) acide désoxyribonucléique complémentaire
- (**AGJ**) l'appareil juxtaglomérulaire
- (**ALMS1**) syndrome d'Alström 1
- (AMP cyclique ou **AMPc**) l'adénosine monophosphate cyclique
- (**AMPK**) kinase activée par l'AMP
- (**AnxA2**) Annexine
- (**AR**) autosomique récessive
- (**ARNm**) acide ribonucléique messenger
- (**AVP**) vasopressine
- (**BAL**),(**BALH**) branche ascendante large de l'anse de Henle
- (**BS**) Syndrome de Bartter
- (**BSC-1**) bumétanide-sensible-cotransporteur 1
- (**BSND**) barttine
- (**Ca**) calcium
- (**CASR**) récepteur calcium sensor
- (**CCC**) chlorure à couplage cationique électroneutre
- (**CD**) tubule collecteur
- (**Cl**) Chlore
- (**CLC-K**) canaux Chlorure a ou b
- (**DCT**) tubule contourné distal
- (**DFG**) débit de filtration glomérulaire
- (**EDTA**) acide éthylène diamine tétra-acétique
- (**EGAD**) Endosome and Golgi-associated degradation
- (**EGTA**) Acide éthylène-di-(oxy-éthylènenitrilo) tétra acétique
- (**ENaC**) canal sodium de la membrane apicale des cellules épithéliales
- (**EPO**) l'érythropoïétine
- (**ERAD**) voie de la dégradation associée au réticulum endoplasmique
- (**ERLAD**) voies de dégradation associées au RE vers le lysosome
- (**ERMan1**) RE mannosidase I, *MAN1B1*
- (**ERQC**) contrôle de la qualité du réticulum endoplasmique
- (**GCK**) famille des kinases germinale)
- (**GFR**) taux de filtration glomérulaire
- (**GH**) hormone de croissance, Growth Hormone
- (GMP cyclique ou **GMPc**) la guanosine monophosphate cyclique
- (**GTPase**) Guanosine triphosphate hydrolase
- (**HEK293**) lignées de cellules rénales embryonnaires humaines, Human Embryon Kidney
- (**HSP**) protéines de choc thermique

- (Hsp70)** protéine de choc thermique 70
(ICL1) liaison intracellulaire 1
(IRT) l'insuffisance rénale terminale
(JGA) l'appareil juxtaglomérulaire
(K) potassium
(KCC) cotransporteur potassium/chlorure basolatéral
(KCC) cotransporteurs K^+ - Cl^-
(kDa) kilo dalton
(Km) constante de Michaëlis Menten
(MAGE-D2) antigène D2 associé au mélanome
(MAL/VIP17) The tetraspan protein myelin and lymphocytes-associated protein
(ManIA) Mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase 1A1
(MD) macula densa
(MMD1) lignée cellulaire de la macula densa
(MRC) maladie rénale chronique
(MS) spectrométrie de masse
(Na) Sodium
(NCC) cotransporteur sodium-chlore
(NCC) thiazide-sensitive sodium chloride co-transporteur
(NH₄⁺) ammonium
(NHE3) échangeur sodium-hydrogène 3, l'échangeur Na/H de type 3
(NKCC2) cotransporteur sodium-potassium-chlore 2
(NO) l'oxyde nitrique
(NSAIDs) anti-inflammatoires non stéroïdiens,
(OKP) cellules de rein d'opossum : Opossum Kidney, PTH
(OS9) lectine OstéoSarcomas 9
(OSR1) oxidative stress-responsive kinase
(PA) pression artérielle
(PDE2) phosphodiesterase 2
(PGE2) Prostaglandine2
(PI3P) kinase la phosphatidylinositol 3P kinase
(PKA) protéine kinase A
(PKC) protéine kinase C
(PKG) protéine kinase dépendante du GMPc
(PNA) peptides natriurétiques auriculaires
(PP2B) Calcineurin
(PROX) tubule proximal
(PTH) La parathormone
(RE) réticulum endoplasmique
(ROMK) canaux potassiques apicaux

- (Scamp2)** Secretory carrier-associated membrane protein (protéine de structuration des vésicules 2)
- (SDS-PAGE)** Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium
- (si RNA)** ARN interférant
- (SLC12)** famille 12 des *solute carriers*
- (SNARE)** N-ethyl-maleimide-sensitive factor attachment protein
- (snGFR)** taux de filtration glomérulaire d'un seul néphron
- (SNX9)** nexine de tri 9
- (SORLA)** sorting protein-related receptor with A-type repeats
- (SPAK)** proline et alanine reach kinase liée à Ste20 et SPS 1
- (STCH)** chaperon de stress 70
- (TA)** Température Ambiante
- (TAL),(TAHL)** branche ascendante large de l'anse de Henle
- (tBS)** forme transitoire de syndrome de Bartter
- (TGF)** rétroaction tubuloglomérulaire, ou inhibition du retour tubuloglomérulaire
- (TM)** domaines transmembranaires
- (UPS)** système ubiquitine-protéasome
- (VAMP)** Protéine membranaire associée aux vésicules
- (WNKs)** with-no-lysine kinases
- (YM-01)** Hsp70 inhibiteur
- (β2AR)** récepteurs adrénergiques béta2

INTRODUCTION

Le rein joue un rôle clé dans la régulation du volume d'eau corporelle totale et sa composition ionique, en maintenant l'équilibre hydrique, ionique et acido-basique du sang. Il régule également les niveaux de métabolites circulants, non seulement en excréant les déchets du métabolisme, mais aussi en libérant du glucose, via la gluconéogenèse, et des acides aminés. Il est le siège de la production d'hormones comme la rénine, indispensable à la régulation de la pression artérielle (PA), et de l'érythropoïétine (EPO), une cytokine, un facteur de croissance pour les érythrocytes dans la moëlle osseuse. Il produit aussi des enzymes et des vitamines comme le calcitriol, la forme active de la vitamine D. Il est le siège de la production d'urine. Les Figures 1 et 2 représentent anatomiquement le profil d'un rein, et de son unité fonctionnelle, le néphron.

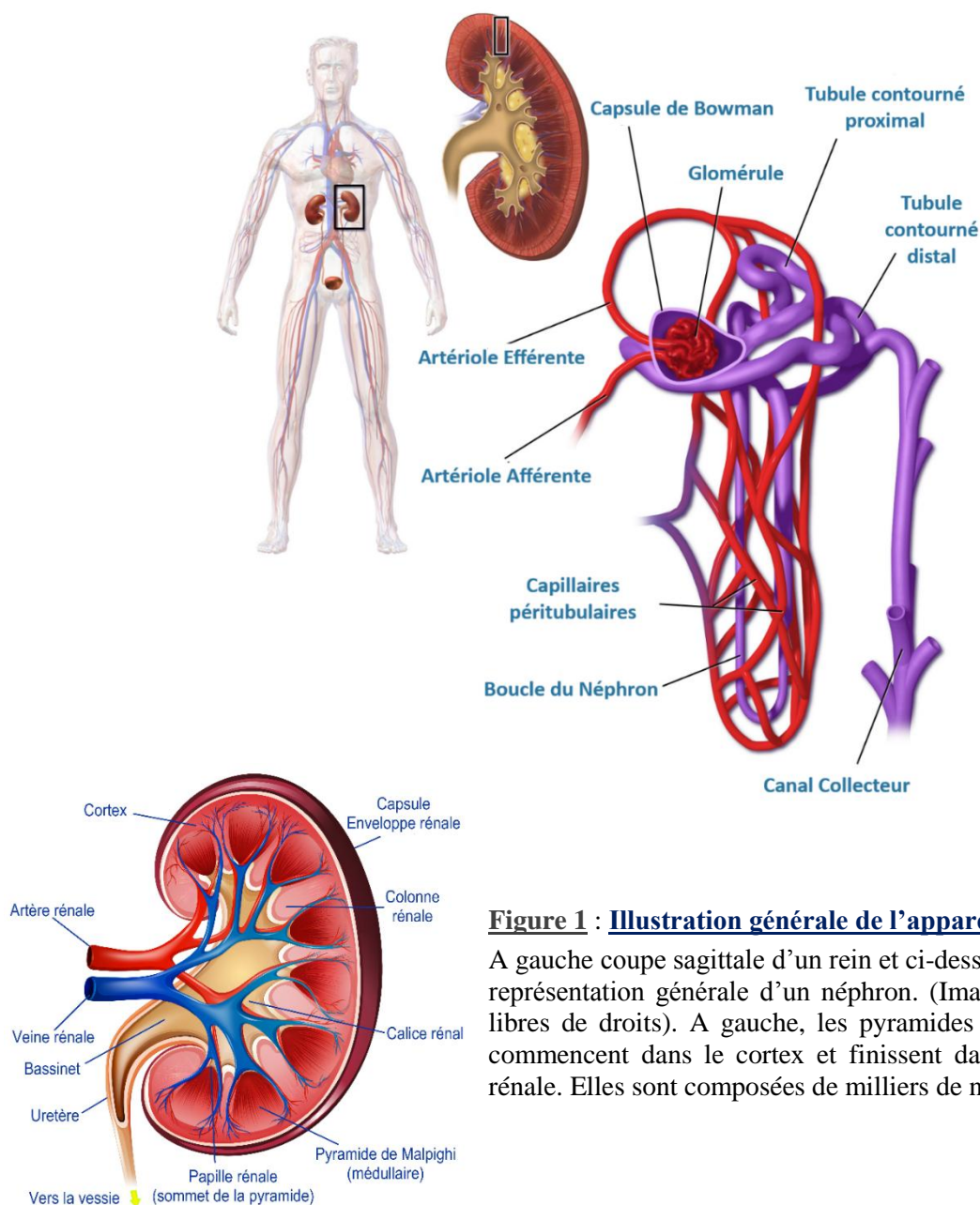
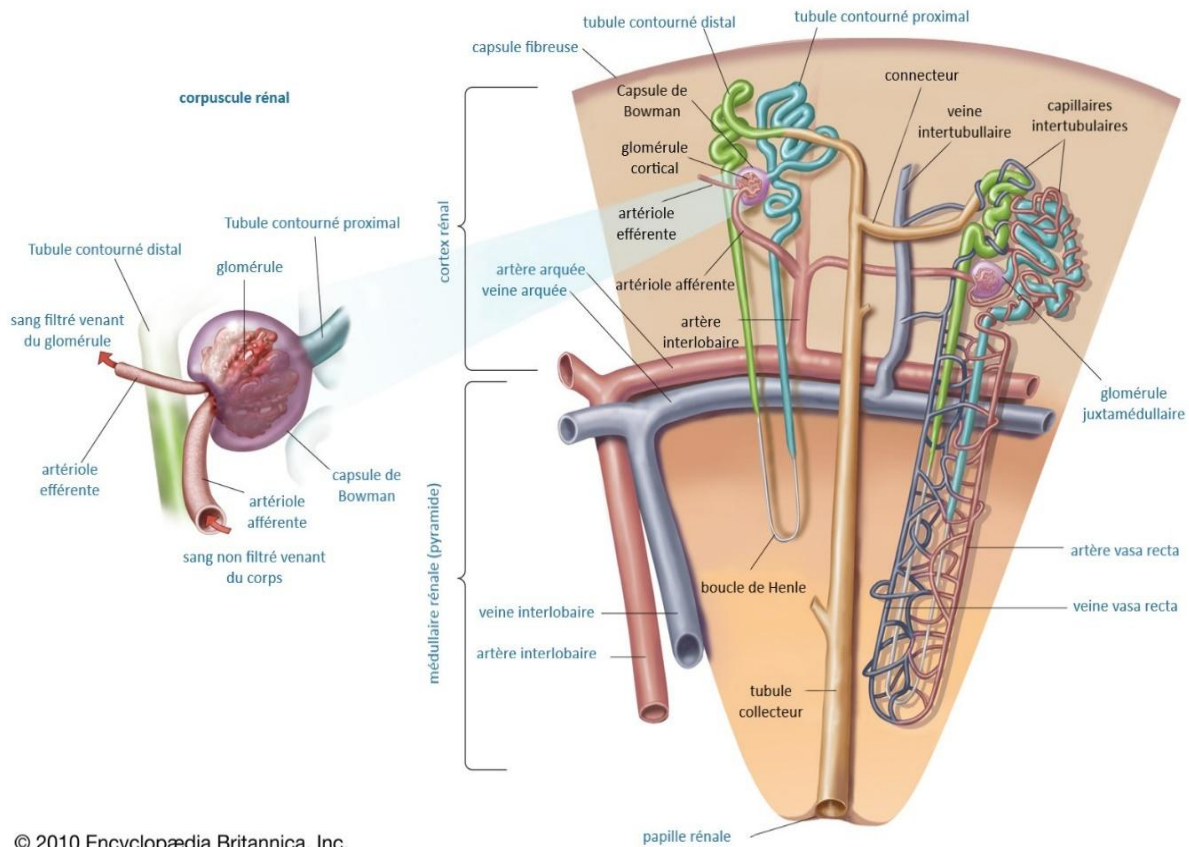


Figure 1 : Illustration générale de l'appareil urinaire

A gauche coupe sagittale d'un rein et ci-dessus représentation générale d'un néphron. (Images adaptées libres de droits). A gauche, les pyramides de Malpighi commencent dans le cortex et finissent dans la papille rénale. Elles sont composées de milliers de néphrons.



© 2010 Encyclopædia Britannica, Inc.

Figure 2 : Représentation schématique d'une coupe d'une pyramide de Malpighi et du corpuscule rénal

A gauche, le **corpuscule** de Malpighi ou corpuscule rénal. Il comporte le **glomérule** (la partie vasculaire) et la **capsule de Bowman** (feuilletés pariétal et viscéral) limitant la chambre de filtration contenant l'urine primitive. L'urine primitive est alors dirigée vers le tube contourné distal du néphron. A droite, la représentation d'une pyramide de Malpighi contenant les néphrons avec deux positionnements possibles du glomérule. D'après Encyclopædia Britannica 2010.

Le néphron

Le néphron est l'unité structurale et fonctionnelle du rein, ([Figure 3](#)). Le corps humain en dénombre près de deux millions, soit 1 million de néphrons par rein. Il est constitué du corpuscule rénal, ou corpuscule de Malpighi, contenant la partie vasculaire, du glomérule entouré de la capsule de Bowman et d'un long tubule multi-segmenté qui réabsorbe ou sécrète de petites molécules, en majeure partie des ions entrant dans la composition de l'interstitium et du sang. Les reins humains filtrent approximativement 1,5 kg de chlorure de sodium sous forme de Na^+ et 180 litres d'eau par jour. La majeure partie de la charge filtrée est réabsorbée le long du système tubulaire et des canaux collecteurs, ce qui entraîne la formation d'environ de 1,5 litre d'urine par jour, pour un rein humain adulte. Il existe deux types de néphrons, des néphrons à anse de Henle courte situés dans la zone corticale et des néphrons juxtamédullaires

dont l'anse ascendante de Henle longue est composée de deux segments, le segment mince et le segment large, (Figures 1, 2 et 3).

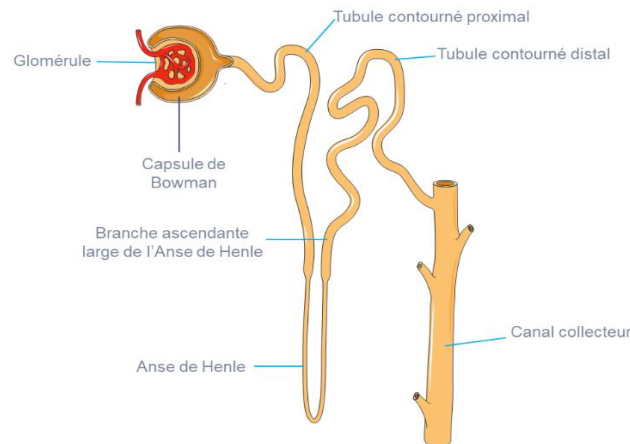


Figure 3 : Schéma d'un néphron, image de Servier Médical Art

La filtration du sang se fait au niveau à l'interface du glomérule et de la capsule de Bowman. L'ultrafiltrat qui en résulte est acheminé au niveau du tube contourné proximal où les acides aminés et le glucose sont réabsorbés. Les protéines ne passent pas la barrière glomérulaire. Les ions sont ensuite réabsorbés d'une manière sélective en quantité et qualité tout le long du néphron pour déboucher sur le canal collecteur où l'urine définitive est finalisée par, entre autres, la réabsorption d'eau en partenariat avec la branche ascendante large de Henle, avant de se retrouver dans le bassinnet puis la vessie.

La rétroaction tubuloglomérulaire, ou inhibition du retour tubuloglomérulaire

Le débit de filtration glomérulaire (DFG) est un paramètre qui permet de définir la capacité de filtration du rein. Il correspond au volume de sang filtré par le rein par unité de temps. Le DFG est régulé par l'appareil juxtaglomérulaire (AGJ), (Figure 4). L'appareil juxtaglomérulaire (AGJ) est une structure spécialisée qui comprend la macula densa du tubule contourné distal, des cellules granulaires productrices de rénine et des cellules mésangiales extra-glomérulaires. L'AGJ régule le DFG et la pression artérielle d'un seul néphron par le biais du mécanisme de la rétroaction tubulo-glomérulaire (TFG), de la réponse myogénique et de la libération de rénine, (Figures 4 et 5).

Le transport du sel (NaCl) est l'étape initiale qui relie la concentration tubulaire de chlorure au niveau de la macula densa (MD) au contrôle du tonus de l'artériole afférente et finalement au taux de filtration glomérulaire (GFR) du néphron concerné. Le TFG provoque une constriction de l'artériole afférente et, par conséquent, une diminution du DFG d'un seul néphron lorsque la concentration tubulaire de chlorure à la MD augmente. La fonction des cellules MD est donc double : Les cellules MD détectent la concentration de sel, plus particulièrement de chlorure, dans le liquide tubulaire et influencent 1) la résistance préglomérulaire et, par conséquent, du taux de filtration glomérulaire d'un seul néphron

(snGFR) et 2) la sécrétion de rénine par les cellules granuleuses juxtaglomérulaires de l'artériole afférente lorsque le taux de chlorure est bas, (Castrop et Schießl 2014).

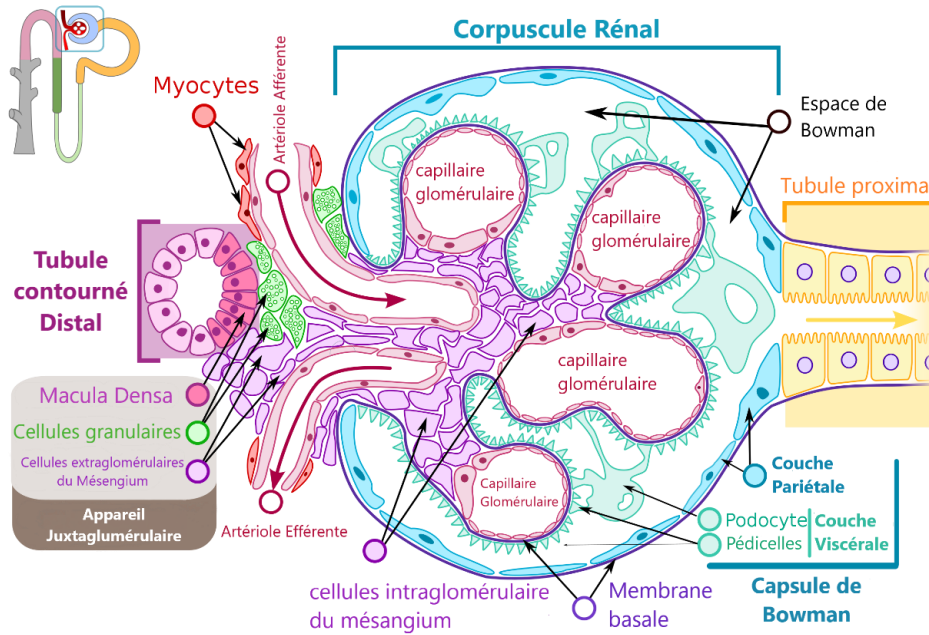
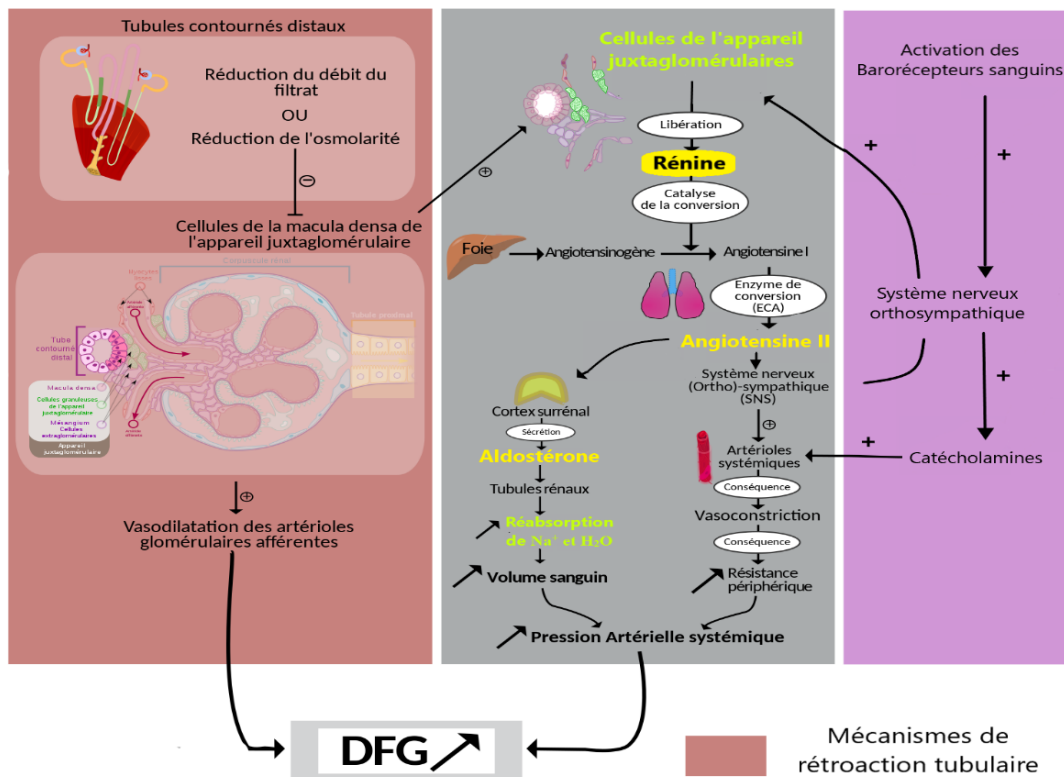


Figure 4 : L'appareil juxtaglomérulaire et les cellules de la macula densa

Schéma d'un glomérule en coupe. On situe la zone de l'appareil juxtaglomérulaire où des échanges

LA REGULATION DU DEBIT DE FILTRATION GLOMERULAIRE : DFG



ont lieu. Les cellules granuleuses en vert sont le lieu de la production de rénine.

D'après Michał Komorniczak - https://www.frwiki.org/wiki/Appareil_juxtaglomérulaire CC BY-SA 3.0

Figure 5 : Le débit de Filtration glomérulaire (DFG) et ses mécanismes de régulation

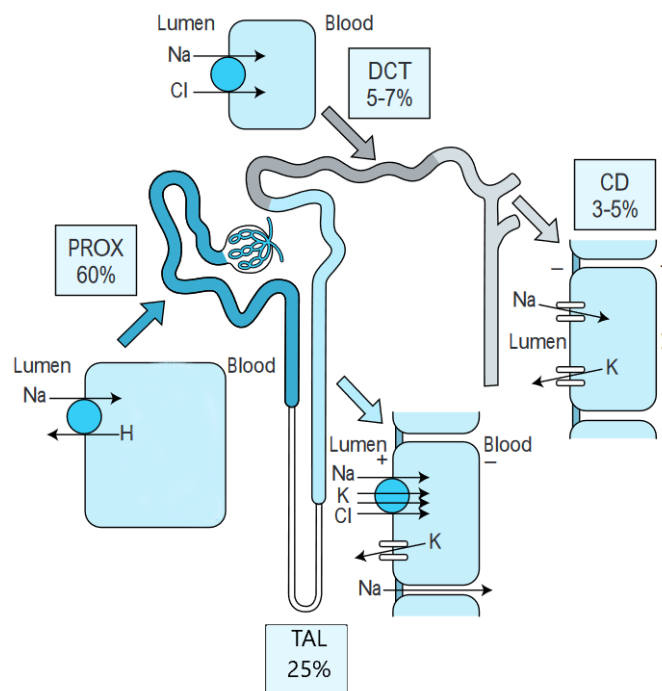
D'après Grinny Manyform CC BY-SA 4.0

<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=50983126>

Le rein exerce aussi un rôle important dans la régulation de la pression artérielle en adaptant le volume extracellulaire et la natrémie en fonction des entrées et des sorties électrolytiques de l'organisme. L'une des causes de l'augmentation de la pression artérielle est une réabsorption excessive du sodium dans celui-ci.

L'hypertension est une maladie polygénique complexe dans laquelle de multiples gènes contribuent à modifier la fonction de plusieurs organes et à élever la pression artérielle. Notre compréhension actuelle de l'origine génétique de l'hypertension repose en grande partie sur l'identification de mutations à l'origine de troubles héréditaires rares. Ces études ont permis d'identifier les régions génétiques associées à celle-ci, à ses causes et ses complications, en particulier dans le dysfonctionnement rénal, la maladie rénale chronique (MRC) ou la diminution de la réactivité vasculaire.

Dans le néphron, 60% de la réabsorption du sodium est réalisée grâce à l'échangeur sodium-hydrogène 3 (NHE3) au niveau du tubule proximal. Dans la branche ascendante large de l'anse de Henle, 29% sont réabsorbés par le cotransporteur sodium-potassium-chlore 2 (NKCC2) et dans le néphron distal, le cotransporteur sodium-chlore (NCC) assure une partie de la réabsorption. Le canal sodium de la membrane apicale des cellules épithéliales (ENaC)



réabsorbe le sodium au niveau du canal collecteur, **Figure 6**.

Figure 6 : Contribution des différents segments du néphron à la réabsorption de la charge filtrée de sodium (Na).

Cette réabsorption de Na est médiée principalement, par une activité Na/H apicale (NHE3) dans le tubule proximal (PROX), un cotransport Na/K/2Cl (NKCC2) dans la branche ascendante large de l'anse de Henle (TAL), un cotransport Na-Cl (NCC) dans le tubule contourné distal (DCT), et le canal de Na (ENaC) dans le tubule collecteur (CD). D'après **David H. Ellison** 'Disorders of Water,

Electrolytes, and Acid-Base' **Atlas of Diseases of the Kidney: Disorders of Water, Electrolytes and Acid-base Acute Renal Failure**, 1999.

LA BRANCHE ASCENDANTE LARGE DE HENLE

La branche ascendante large de Henle (TAL) occupe une position anatomique et fonctionnelle centrale, dans la physiologie rénale humaine, avec des rôles critiques dans la gestion du volume du liquide extracellulaire, le mécanisme de concentration urinaire, l'homéostasie du calcium et du magnésium, l'homéostasie du bicarbonate et de l'ammonium, et la composition des protéines urinaires.

La TAL est essentielle pour la génération et le maintien du mécanisme de multiplication à contre-courant qui permet au rein de produire une urine plus ou moins diluée ou concentrée en ions par rapport au plasma.

La fonction principale de la TAL est de réabsorber de grandes quantités de chlorure de sodium (NaCl), tout en ne réabsorbant pratiquement pas d'eau, en raison de l'absence de perméabilité à l'eau para et transcellulaire. La TAL étant très peu perméable à l'eau, l'urine primitive est donc très diluée dans la lumière du tubule. Sur toute la longueur de la TAL, la concentration luminale de NaCl diminue progressivement de 140 mM de la zone interne de la médulla externe à 30-60 mM au niveau de la macula densa (MD). Le transport de sel dépendant de NKCC2 constitue aussi l'étape initiale du contrôle de la sécrétion de rénine par les cellules granulaires de l'artéριοle afférente. En effet, les cellules de la TAL spécialisées MD entrent directement en contact avec le mésangium extraglomérulaire du glomérule correspondant.

L'acteur majeur de la réabsorption du sodium du niveau de la TAL est le cotransporteur Na-K-2Cl apical (NKCC2) chez le mammifère. La capacité importante de réabsorption du sodium et du chlore dans la branche ascendante large de l'anse de Henle par ce cotransporteur influence fortement la balance hydrosodée de l'organisme, lui conférant un rôle majeur dans la régulation de la pression artérielle et de la volémie.

Le rôle central de NKCC2 dans la réabsorption vectorielle transépithéliale du sel le long de l'anse est mis en évidence par les effets des diurétiques de l'anse, les inhibiteurs pharmacologiques de NKCC2, comme le furosémide qui sont parmi les médicaments antihypertenseurs les plus puissants disponibles à ce jour.

Chez l'homme, des mutations inactivatrices dans le gène codant pour NKCC2 (Slc12a1) provoquent, le syndrome de Bartter de type 1, caractérisé entre autres par une perte de sel et d'eau. Un phénotype similaire est observé chez les souris dépourvues de NKCC2, dont la plupart ne survivent pas, à moins que le sel et le volume soient maintenus.

Inversement, une augmentation de l'activité du transporteur débouche sur une hypertension artérielle NaCl-dépendante chez l'homme, en particulier chez les Afro-Américains, une population sensible au sel, et dans plusieurs modèles d'hypertension chez le rongeur (**Ares, Caceres, et Ortiz 2011b**). Malgré l'importance de NKCC2 dans la fonction rénale, les mécanismes moléculaires par lesquels ce cotransporteur apical est régulé dans des

circonstances physiologiques et physiopathologiques reste mal compris. (Ares, Caceres, et Ortiz 2011a)

Ainsi, l'activité de NKCC2 est essentielle à la conservation du sel et à la régulation aiguë et chronique de l'équilibre hydrique.(Ares, Caceres, et Ortiz 2011a).

L'étude de la structure/fonction de ce transporteur et de ses voies de régulations est donc essentielle pour la compréhension de ces mécanismes d'hypertension induite NaCl-dépendante. Les mutations de perte de fonction de NKCC2 entraînent la forme anténatale du syndrome de Bartter avec une perte de sel sévère chez les patients.

Mécanisme de réabsorption du sodium dans la TAL médullaire

La réabsorption de NaCl par la TAL est un processus en deux étapes : les ions Na^+ , K^+ et Cl^- entrent dans la cellule grâce au cotransporteur NKCC2 puis sont transportés en suivant le gradient électrochimique généré par les Na-K-ATPases qui assurent le passage du Na à travers la membrane basolatérale. Le Chlore (Cl^-) entre dans l'interstitium par le cotransporteur potassium/chlorure basolatéral (KCC4) ou les canaux Chlorure (CLC-Kb). Une fraction du potassium (K) réabsorbé par NKCC2 est recyclé à travers la membrane apicale vers la lumière du tubule via les canaux potassiques apicaux (ROMK).

NKCC2 joue un rôle essentiel dans la TAL et la fonction rénale. Il assure 100 % de la réabsorption du Cl^- , et 50 % du transport du Na. L'activité de NKCC2 est liée au flux paracellulaire de Na^+ , Ca^{2+} et Mg^{2+} , (Figure 7).

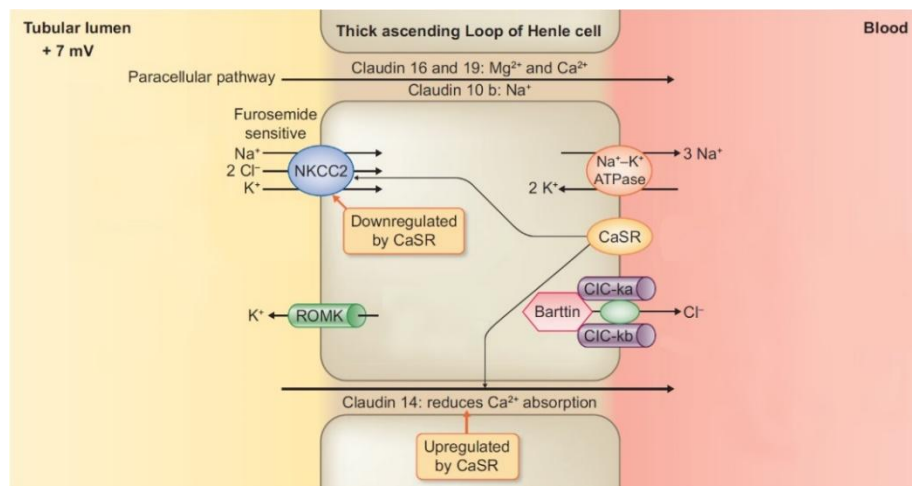


Figure 7 : Schéma d'une cellule de la branche ascendante large de de Henle (Thick ascending Loop Of Henle, TAHL ou TAL).

Les ions Na^+ , K^+ et Cl^- passent de la lumière tubulaire à l'intérieur de la cellule grâce au transporteur NKCC2. Le potassium est recyclé par le canal ROMK. Le sodium passe de la cellule à l'interstitium grâce à la Na-K-ATPase. Le chlore entre dans l'interstitium par le transporteur KCC4 et les canaux chlorure CLC-Ka et CLC-Kb. Les différents transporteurs sont représentés, excepté KCC4 situé au niveau basolatéral. Extrait et modifié d'après (Bamgbola et Ahmed 2021) Blood (sang), tubular lumen (lumière du tubule), deafness (surdité) paracellular pathway (voie paracellulaire)

Une fraction du sodium luminal (10-20%) entre dans la cellule via l'échangeur Na/H de type 3 (NHE3) et diffuse à travers les jonctions serrées (30-40%) grâce au potentiel positif luminal généré par ROMK. L'inhibition de NKCC2 diminue la sortie du potassium par ROMK, ce qui perturbe le potentiel positif de la lumière et interrompt non seulement toute réabsorption de NaCl mais aussi le transport passif paracellulaire du calcium et du magnésium.

LE SYNDROME DE BARTTER

Le syndrome de Bartter (BS), du nom de Frédéric Bartter, est un trouble tubulaire rénal héréditaire rare causé par un défaut de réabsorption du sel dans la branche ascendante large de l'anse de Henle qui touche environ 1 personne sur 1 000 000.

En 1962, Frédéric Bartter et ses collègues décrivent pour la première fois, deux cas d'une nouvelle forme de pathologie, caractérisée par une hypertrophie de l'appareil juxtaglomérulaire du rein associé à un aldostéronisme primaire, une hypokaliémie et d'une alcalose métabolique avec des taux de chlorure sérique relativement bas, accompagnée d'une pression artérielle normale (**Bartter et al. 1962**).

Les patients atteints de BS présentent un hyperaldostéronisme, une hyperréninémie avec une pression artérielle normale à faible, une résistance périphérique réduite et une hypersensibilité aux antihypertenseurs. Les caractéristiques cliniques des sujets atteints peuvent inclure une déshydratation avec une pression sanguine basse, des crises de tétanie, une faiblesse musculaire, des paresthésies et des douleurs articulaires dues à la chondrocalcinose. Les enfants gravement atteints peuvent présenter un retard de croissance et un retard mental. Ces patients présentent généralement une naissance prématurée associée à un polyhydramnios (liquide amniotique excessif) et à un faible poids à la naissance et peuvent développer une déshydratation potentiellement mortelle pendant la période néonatale.

Une mauvaise relation phénotype-génotype due à l'interaction avec d'autres cotransporteurs et différents degrés de compensation par des voies alternatives est actuellement rapportée.

Le Syndrome de Bartter est constitué d'un certain nombre de maladies tubulaires différentes dont chacune est le résultat d'une déficience dans le mécanisme de transport de l'anse ascendante large de Henle (TAL), avec pour conséquences une perte de sel et une déplétion volumique. On distingue le BS en deux formes majeures. **La forme néonatale**, la plus sévère, appelée aussi le syndrome de l'Hyper-prostaglandine E, est caractérisée essentiellement par un polyhydramnios, un accouchement prématuré, un retard de croissance intra-utérin, une polyurie post-natale associée à une déshydratation sévère et des vomissements récurrents. On retrouve quelques fois une insuffisance rénale terminale et une surdité. Quelques cas montrent un aspect physique notable comme un strabisme et de petits muscles. Une ostéopénie, de la diarrhée, de la fièvre et une susceptibilité accrue aux infections est un symptôme systématique. **La forme classique**, se manifeste par des symptômes plus légers, débutant de l'enfance à l'adolescence. Elle est généralement associée à un retard de croissance (en

l'absence de traitement précoce), une polyurie, une polydysplasie, de la constipation, une envie de sel, des vomissements, une déshydratation et, moins fréquemment, un visage caractéristique. A l'heure actuelle on distingue cinq ou six génotypes, selon les auteurs. Les **types I et II** sont des BS néonatal où une grande hétérogénéité génétique a été rapportée. Le BS de **type III**, est décrit comme classique mais une variabilité phénotypique considérable a été constatée dans ce groupe de patients, y compris la BS néonatale, la BS prénatale et le phénotype de type Gittelman. Les **type IV et V** se placent au-delà des formes néonatales ou classiques et le **type VI** est un bartter transitoire (**Fazilaty et Behnam 2014**), ([Figure 8](#)).

Type I (OMIM 601678)

Le Type I (BS-I) est une forme anté et/ou néonatale. Le **BS néonatal** est généralement une maladie autosomique récessive (AR). Les symptômes systémiques sont intenses, caractérisés par une hypotension, une natriurie augmentée, une hypovolémie, un hyperaldostéronisme, une hypokaliémie, une alcalose métabolique, une hypercalciurie, une hypermagnésurie et une néphrocalcinose. Dans la forme anténatale, dont les premiers signes sont visibles au cours de la grossesse, le liquide amniotique s'accumule d'une manière importante, ce qui conduit à un hydramnios entre la 22 et 28^{ème} semaine de grossesse, un petit poids du bébé à la naissance, et, parfois, le développement d'une déshydratation menaçant le pronostic vital durant la période prénatale (**Simon et al. 1996**). Un accouchement prématuré est souvent observé. Des concentrations en chlore élevé sont aussi relevées dans le liquide amiotique, pour des concentrations normales en sodium, potassium et Prostaglandine2 (PGE2).

Les nouveau-nés atteints de BS-I présentent une perte de sel et une hyposthénurie, ainsi qu'une hyper-prostaglandinurie, un retard de croissance et une alcalose métabolique hypokaliémique modérée. Chez les nourrissons affectés, les vomissements, la fièvre et la diarrhée ont été attribués à la stimulation de l'activité rénale et systémique de la PGE2. (**Fazilaty et Behnam 2014**)

Le gène responsable du Type BS-I est *SLC12A1* et code pour le cotransporteur rénal Na-K-2Cl, (NKCC2). Il a été démontré que des mutations génétiques du gène codant pour NKCC2 altèrent la fonction et le ciblage apical de NKCC2. (**Simon et al., 1996**).

Type II (OMIM 241200)

Le BS de type II (BS-II) est aussi une forme AR néonatale hypokaliémique causée par des altérations du gène *KCNJ1*, qui code pour le canal KCNJ, connue sous le nom de ROMK.

La protéine KCNJ1 joue un rôle crucial dans le recyclage du potassium situé dans la branche ascendante large de l'anse de Henle, et la sécrétion de potassium dans le tubule distal et le canal collecteur cortical. Les nourrissons atteints de BS-II sont transitoirement

hyperkaliémiques, ce qui résulte d'un dysfonctionnement du canal *KCNJ1* dans la sécrétion de potassium dans le tubule contourné distal et le canal collecteur cortical. Le BS-II est décrit par des symptômes comme une excrétion élevée de Ca^{2+} conduisant à une néphrocalcinose, une alcalose métabolique hypokaliémique, une natriurèse, une diurèse, des taux élevés de prostaglandines E2 et de rénine.

Le canal *ROMK* est responsable d'une partie de la réabsorption du sodium et du potassium filtré au niveau du glomérule, et représente la voie de recyclage du potassium intracellulaire vers la lumière du tubule qui est essentielle pour fonctionnement du co-transporteur *NKCC2* dans l'anse de Henle. **(Fazilaty et Behnam 2014)**

Type III (OMIM 607364)

Le BS-III classique est un trouble AR marqué par une alcalose hypokaliémique avec une perte de sel, une diminution de la pression artérielle, une hyper ou normo-calciurie et une absence de néphrocalcinose. Les patients sont porteurs de mutations dans le gène du canal chlorure rénal *CLCNKB*. Ces mutations entraînent une perte de fonction et, par conséquent, une déficience dans la réabsorption du chlorure dans la branche ascendante large de l'anse de Henle. *CLCNKB* code pour un membre de la famille des canaux chlorure voltage-dépendants. Par un épissage alternatif, trois isoformes différentes sont produites à partir de ce gène. Un membre proche de cette famille, *CLCNKA*, est également situé à proximité immédiate de *CLCNKB* et joue un rôle dans la pathogenèse de la maladie. **(Fazilaty et Behnam 2014)**

Type IV (OMIM 602522), (OMIM 613090)

Le type IV, le plus mortel parmi les différents types de BS, est un trouble AR généralement caractérisé par une déplétion volumique néonatale, une naissance prématurée imputable à un polyhydramnios, une surdité neurosensorielle, une perte sévère de sel rénal et une polyurie. Les mutations responsables se trouvent au niveau du gène *BSND*, qui code la barttine (*BSND*). La *BSND* est une sous-unité accessoire cruciale des canaux de chlorure. Elle est exprimée dans le rein et l'oreille interne. Diverses mutations de *BSND* provoquent des phénotypes de gravités différentes. Elles entraînent un dysfonctionnement de l'interaction de la barttine avec le canal *ClC-K*, ayant pour conséquence une déficience de la réabsorption du chlorure dans le néphron ainsi que la sécrétion de potassium dans la stria vascularis et le labyrinthe vestibulaire de l'oreille interne.

On retrouve aussi une alcalose métabolique hypokaliémique, un hyperaldostéronisme, une hyperréninémique et une augmentation du sodium, du potassium et du chlorure urinaire.

Une barttine dysfonctionnelle entraîne un phénotype similaire à un double knockout de *CLCNKA* et de *CLCNKB*, ce qui explique le dysfonctionnement du transport du chlore via *CLCNKA* et *CLCNKB*, (**Estévez et al. 2001**).

Le BS-IV montre aussi une hérédité digénique résultant de double mutations homozygotes dans les gènes *CLCNKA* et *CLCNKB*. Cela est probablement dû à la proximité de ces deux gènes, qui dans certains cas peuvent être la cible de grandes délétions impliquant les deux. Le BS-IV résultant d'une mutation de la Barttine est noté BS-IVa. Dans le cas de la double mutation dans les transporteurs *CLCNKA* et *CLCNKB*, le BS-IV est noté BS-IVb.

Les patients BS IVa et BS IVb présentent généralement des phénotypes sévères avec un retard de croissance, une mauvaise réponse aux anti-inflammatoires non stéroïdiens (NSAIDs), parfois l'apparition précoce de l'insuffisance rénale terminale (IRT). Chez certains patients, une baisse du débit de filtration glomérulaire commence à un jeune âge. (**Fazilaty et Behnam 2014**)

Type V (OMIM 601198)

Le type V (BS-V) fait référence à des mutations touchant au récepteur calcium sensor (CASR) présent à la membrane basolatérale des cellules de la TAL. Pour certains auteurs la pathologie liée au CASR n'est pas un Bartter pur. Le CASR a un effet inhibiteur sur le transport paracellulaire des cations divalents Ca^{2+} et de Mg^{2+} . En conditions physiologiques, l'augmentation des concentrations sériques de Ca^{2+} et de Mg^{2+} active le CaSR qui inhibe alors la réabsorption du calcium divalent.

Des mutations de type gain de fonction dans le gène du récepteur de détection du Ca^{2+} extracellulaire *CASR* conduisent à une hypocalcémie de type Autosomal Dominant (AD), caractérisée par une diminution de la réabsorption du chlorure, un équilibre négatif du chlorure de sodium, un hyperaldostérone secondaire et une hypokaliémie. Les différentes présentations cliniques des patients BS-V peuvent être déterminées par différentes mutations activatrices du *CASR*, (**Fazilaty et Behnam 2014**), (**Kinoshita et al. 2014**) (**Carmosino et al. 2015**).

Chez ces patients, le métabolisme du calcium est anormal, le niveau de l'hormone parathyroïde est faible et l'excrétion rénale de calcium est élevée. Ils sont secondaires à l'hyperactivation du CaSR à de faibles concentrations de calcium sérique qui conduit à une inhibition anormale de l'hormone parathyroïdienne.

L'activité accrue du récepteur CASR inhibe la fonction de NKCC2 en ciblant directement sa phosphorylation et sa voie d'activation.

Type VI (OMIM 300971)

Le BS de type VI (BS-VI), ou récemment classé comme type BS-V est lié à une mutation liée à l'X dans l'antigène D2 associé au mélanome (MAGE-D2). Ces mutations perte de fonction dans MAGE-D2 provoquent un polyhydramnios avec prématurité et une forme sévère mais transitoire de BS (tBS) anténatal. MAGE-D2 est exprimé dans la branche ascendante large de Henle (TAL) et les tubules rénaux distaux (DCT).

La sévérité de la maladie est illustrée par un taux de mortalité élevé par rapport aux autres types de BS. En effet, la mort périnatale est survenue dans environ un tiers des 13 grossesses affectées dans une étude décrite par notre groupe (**Laghmani et al. 2016**). Paradoxalement, les nourrissons survivants présentaient une polyurie et une alcalose hypokaliémique limitées et une disparition complète des symptômes après quelques semaines suivant la naissance.

Les mutations dans MAGE-D2 réduisent le taux membranaire et l'activité, non seulement de NKCC2 dans la TAL, mais aussi de NCC dans le DCT, expliquant ainsi la sévérité des symptômes des patients atteints du BS de type VI. MAGE-D2 est essentiel dans le développement du fœtus et le fonctionnement des reins adultes. Il est indispensable dans la réabsorption rénale fœtale du sel et dans l'homéostasie du liquide amniotique. Il est donc capital pour le maintien d'une grossesse normale

L'explication de cette nature transitoire du phénotype n'est pas encore élucidée. Une hypothèse est que MAGE-D2 serait nécessaire à l'expression correcte des cotransporteurs dans la médullaire rénale fœtale hypoxique. Après la naissance, l'augmentation des niveaux d'oxygène tissulaire dans la médulla rénale et la sensibilité croissante de l'activité de l'adénylate cyclase à la vasopressine entraîneraient une réduction de la dépendance à vis-à-vis de MAGE-D2.

MAGED-2 agirait par la voie de signalisation de l'adénylate cyclase et de l'AMP cyclique et d'une protéine de choc thermique cytoplasmique. Même si l'implication directe de MAGED-2 dans le syndrome de Bartter anténatal n'est pas établie, cette nouvelle forme ouvre un espoir pour près de 20 % des patients diagnostiqués cliniquement avec un syndrome de Bartter restant sans explications génétiques depuis sa découverte. Au total, notre équipe a identifié neuf mutations distinctes dans MAGED-2 chez 15 patients de sexe masculins qui ont présenté un aBS transitoire, (**Kömhoff et Laghmani 2017**). L'approche protéomique a révélé que le type sauvage de MAGE-D2 se lie fortement à HSP40 et à Gs-alpha, ce qui suggère que ces deux protéines pourraient être impliquées dans l'effet de MAGE-D2 sur les cotransporteurs NKCC2 et NCC. À l'appui de cette notion, nous avons identifié, par le système du double hybride HSP40 comme un partenaire de liaison possible de NKCC2 (donnés non publiés). HSP40 est un modulateur clé du repliement et de la stabilité des protéines. Gs-alpha, augmenterait l'abondance de la protéine NKCC2 dans les cellules. L'activation de Gs-alpha entraîne une augmentation de l'AMPc et améliore le taux de surface, la phosphorylation et l'activité de NKCC2 et de NCC, Gs-alpha pourrait également être impliqué dans la modulation du trafic post-Golgi de NKCC2 et NCC par MAGE-D2. (**Kömhoff et Laghmani 2018**)

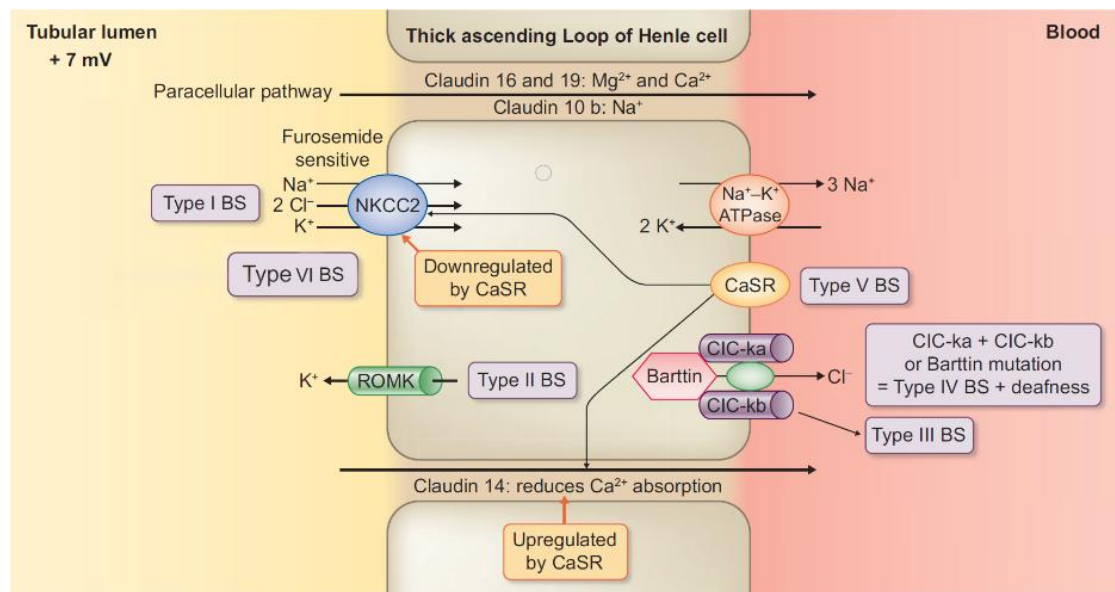


Figure 8 : Schéma d'une cellule de la branche ascendante large de Henle montrant les différents types de Bartter :

La défaillance du transport des électrolytes de la lumière tubulaire rénale à travers les cellules de la branche ascendante large de l'anse de Henle explique les types I, II, III, IV, V et VI du syndrome de Bartter vers l'interstitium. Extrait et modifié d'après (**Bamgbola et Ahmed 2021**) Blood (sang), tubular lumen (lumière du tubule), deafness (surdité) paracellular pathway (voie paracellulaire)

L'identification phénotypique reste la première étape pour guider la suspicion du syndrome de Bartter. Compte tenu de la rareté de celui-ci et de l'absence de caractérisation génétique dans la plupart des cas, on dispose de peu de preuves cliniques pour le traitement et celui-ci repose principalement sur la compréhension de la physiologie rénale et s'appuie sur l'expérience personnelle du médecin. Une meilleure compréhension des canaux et transporteurs mutés pourrait éventuellement générer des cibles thérapeutiques pour un traitement spécifique, comprenant par exemple des médicaments visant à corriger les déficiences dans le repliement ou l'expression de la membrane plasmique des protéines mutées.

LE TRANSPORTEUR NKCC2

Malgré l'importance du co-transporteur Na-K-2Cl (NKCC2) dans la fonction rénale, les mécanismes moléculaires régulant sa synthèse, ses modifications post-traductionnelles, et la régulation de sa fonction, demeurent très partiellement connus. Pourtant, dans tous les modèles animaux de type hypertension ou de type Bartter-syndrome hétérozygote, décrits jusqu'à présent, NKCC2 semble être régulée à la hausse par des mécanismes post-traductionnels, tels que la phosphorylation, conduisant à une augmentation de la stabilité de ses taux membranaires, suggérant l'importance d'étudier les facteurs agissant sur l'activité de transport ionique et le trafic intracellulaire de ce cotransporteur (**Carmosino, Procino, et Svelto 2012**). Le trafic intracellulaire constitutif et stimulé implique principalement des interactions protéine-protéine. Ainsi, les déterminants moléculaires, en particulier les partenaires protéiques, impliqués dans le trafic intracellulaire du cotransporteur et contrôlant son expression à la membrane, restent encore en grande partie méconnues.

En 2005, lors de l'initiation du projet NKCC2 par le docteur Kamel Laghmani, la majorité des études de régulation de la protéine NKCC2 déjà réalisées étaient limitées au système d'expression dans les ovocytes de Xénope (**Mount 2006**). En effet, et malgré le clonage de l'ADNc de NKCC2 depuis 1994, aucune équipe n'avait réussi à exprimer le transporteur NKCC2 dans une cellule de mammifère *in vitro*. Par conséquent, les déterminants moléculaires, en particulier les partenaires protéiques, impliqués dans le trafic intracellulaire du cotransporteur et contrôlant ainsi son expression à la membrane, restaient à déterminer.

Afin d'identifier les partenaires cytoplasmiques de NKCC2, nous avons criblé, par le biais du système double hybride, une banque d'ADNc de rein humain en utilisant comme appât l'extrémité C-terminale du cotransporteur. Plusieurs dizaines de clones positifs ont été identifiés et la spécificité des interactions trouvées, vérifiées et confirmées.

Le but du projet de recherche de notre groupe est donc d'étudier l'effet des interactions des molécules chaperons identifiées par la technique du double hybride sur la maturation de la protéine NKCC2.

En particulier, Il s'agit de comprendre les mécanismes de tri et d'adressage appropriés de NKCC2 dans la cellule. Nous cherchons à identifier et à caractériser les réseaux protéiques et les voies clés de régulation contrôlant l'expression de la protéine NKCC2. Une meilleure compréhension des voies de régulation de NKCC2 aiderait à mieux comprendre la physiopathologie de la rétention du sodium (Na) et d'eau, avec à terme les moyens de trouver une nouvelle cible possible, une approche pharmaceutique visant à détecter, prévenir et/ou à traiter les troubles rénaux liés au bilan sodique.

Nous étudions en particulier l'isoforme F de NKCC2 localisée dans les cellules de la branche ascendante médullaire large de Henle.

Le cotransporteur Na-K-2Cl (NKCC2) appartient à la famille des cotransporteurs de chlorure à couplage cationique électroneutre (CCC), une branche de la superfamille des transporteurs de solutés SLC12A, et est codé par le gène *SLC12A1*, (Figure 9).

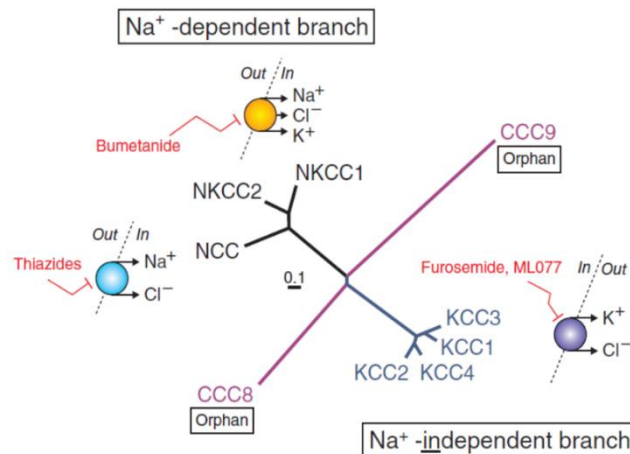


Figure 9 : Représentation de la famille des cotransporteurs chlorure à couplage cationique électroneutre (CCC)

Représentation visuelle de la relation entre les neuf cotransporteurs humains de la famille SLC12A. Le dendrogramme des groupes met en évidence deux sous-familles distinctes : la branche Na^+ -dépendante en haut à gauche et la branche Na^+ -indépendante en bas à droite. Il existe également deux membres orphelins, CCC8 et CCC9, auxquels on n'a pas encore attribué de fonctions ou de substrats spécifiques. Les deux cotransporteurs $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ (NKCC2 et NKCC1) sont inhibés par le bumétanide, un diurétique de l'anse, tandis que le cotransporteur $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ (NCC) est inhibé par les diurétiques thiazidiques, comme la métolazone et l'hydrochlorothiazide. Les quatre cotransporteurs $\text{K}^+\text{-Cl}^-$ (KCC) sont inhibés par le furosémide, un autre diurétique de l'anse, et par le ML077, un nouvel inhibiteur plus puissant. La longueur des branches du dendrogramme représente le nombre de substitutions d'acides aminés par site (barre = 0,1 substitution d'acide aminé par site). D'après (Delpire et Gagnon 2018) traduit de l'anglais. (in/out : intérieur/extérieur)

Les cotransporteurs cation-anion électro-neutres sont classés dans la famille 12 des *solute carriers* (SLC12). Ce sont des protéines transmembranaires couplant le transport de deux cations, Na^+ et K^+ , et deux anions Cl^- avec une stœchiométrie de 1 cation pour 1 anion. Il existe 9 isoformes dans la famille SLC 12 dont 7 sont bien caractérisés. Ces isoformes s'appellent cotransporteur Na-Cl sensible aux thiazides (NCC), cotransporteurs Na-K-Cl sensibles aux diurétiques de l'anse (NKCC1 et NKCC2), cotransporteurs K-Cl (KCC1 à 4) et cotransporteurs orphelins (CCC8 et 9).

Structure-fonction de NKCC2

NKCC2 joue un rôle central dans la concentration urinaire et la régulation de la pression artérielle. Compte tenu de sa forte capacité de réabsorption, des changements subtils dans l'activité de transport de NKCC2 peuvent altérer de manière significative la réabsorption rénale de NaCl, conduisant à terme à une perturbation de l'homéostasie du traitement du sel et de l'eau. NKCC2 est la cible des diurétiques de l'anse tels que le furosémide et le bumétanide, couramment utilisés pour abaisser la pression artérielle (PA). En plus de faciliter la réabsorption de NaCl dans la TAL, l'activité de transport de la NKCC2 dans les cellules de la macula densa de la branche ascendante large de l'anse de Henle (TAL) constitue l'étape initiale de la communication tubulaire-vasculaire au sein de l'appareil juxtaglomérulaire (JGA). Cette communication permet à la TAL de moduler la résistance préglomérulaire de l'artériole afférente et la sécrétion de rénine par les cellules granulaires de l'appareil juxtaglomérulaire.

Le cotransporteur bumétanide sensible 1, Na-K-2Cl (NKCC2 ou BSC1) est situé dans la membrane apicale des cellules épithéliales de la TAL plasmique et assure la médiation de la symportance électroneutre de Na, K et Cl avec une stœchiométrie de 1 :1 :2, respectivement. NKCC2 facilite 20 à 25 % de la réabsorption de la charge totale de NaCl filtrée. NKCC2 est donc l'une des protéines de transport ayant la plus grande capacité de réabsorption globale dans le rein.

Dans les cellules corticales spécialisées de la TAL, constituant la macula densa, NKCC2 transmet l'information sur la concentration luminale de NaCl pour des adaptations du taux de filtration glomérulaire d'un seul néphron et la modulation paracrine de la libération de rénine. Si la perte de fonction du gène NKCC2 provoque le syndrome de Bartter anténatal, une activité excessive de NKCC2 peut provoquer ou aggraver l'hypertension artérielle. De plus, un vaste dépistage génétique chez les participants à l'étude de Framingham Heart a révélé des mutations rares de NKCC2 associées à une réduction significative de la pression artérielle mais pas nécessairement liées à la maladie de Bartter, (**Mahmood et al. 2014**). La délétion génétique du transporteur chez la souris est létale en raison de la perte de sel et de la déplétion du volume extracellulaire, tandis que sa suractivité chez les rats sensibles au sel Dahl (SS) peut contribuer à l'hypertension, (**Takahashi et al. 2000**), (**Ares et al. 2012**).

En raison de son influence sur le mécanisme de concentration urinaire et l'homéostasie systémique du sel, des efforts importants ont été entrepris dans le passé pour élucider sa régulation. Plusieurs stimuli endocriniens et paracriniens ainsi que des modifications de l'osmolalité peuvent influencer l'expression de surface et l'activité du cotransporteur. La vasopressine (AVP) est particulièrement efficace à cet égard. Elle peut améliorer le transport du sodium du chlore et du potassium au niveau de la TAL par sa liaison au récepteur V2

couplé aux protéines G (Gs) basolatéral, la libération d'AMPc et les ajustements rapides du taux de surface et de la fonction de NKCC2 qui en résultent.

NKCC2 appartient à une famille de protéines intégrales de la membrane plasmique. NKCC2 est codée par un seul gène, mais l'épissage différentiel de son pré-ARNm donne lieu à plusieurs isoformes d'épissage, qui diffèrent sensiblement dans leurs caractéristiques de transport et dans leur localisation le long de la TAL.

NKCC2 a été clonée pour la première fois par Gamba (**G. Gamba et al. 1994**) à partir du rein de rat, et par Igarashi (**Igarashi et al. 1995**) à partir du rein murin. La protéine NKCC2 murine présente 93% d'homologie avec la séquence du lapin, 97% avec celle du rat et 93% avec la séquence humaine.

La structure de NKCC2, basée sur la séquence d'ADNc, prédit une protéine avec 12 domaines transmembranaires, une extrémité NH₂ cytoplasmique de 170 acides aminés, et une longue extrémité COOH cytoplasmique terminale de 470 acides aminés, (**Figure 10**).

Il existe plusieurs sites consensus de phosphorylation pour la protéine kinase A (PKA), la protéine kinase C (PKC) et les caséines kinases. A ce jour, seules quelques kinases ont été signalées comme phosphorylant NKCC2. Il n'existe aucune séquence consensus connue pour la protéine kinase dépendante du GMPc (PKG). La structure réelle de la NKCC2 dans une double bicouche lipidique, le repliement et la conformation des domaines intracellulaires sont encore inconnus. (**Ares, Caceres, et Ortiz 2011a**).

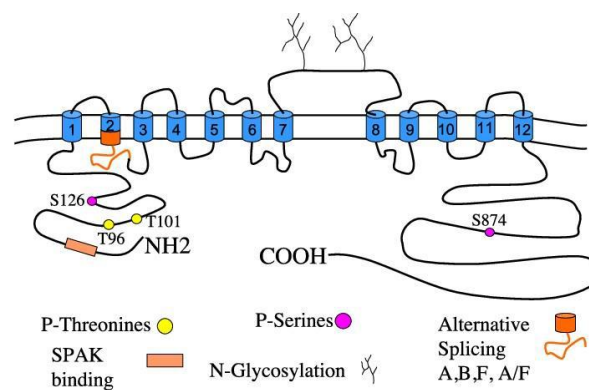


Figure 10 : Structure schématique du cotransporteur Na⁺/K⁺/2Cl⁻ (NKCC2)

Structure schématique mettant en évidence les sites de phosphorylation établis (séquence de rat) et certaines des interactions protéine-protéine identifiées à ce jour. En orange la localisation de la séquence alternative propre aux formes A B ou F. En haut les deux sites de glycosylation sur la quatrième boucle extracellulaire de la protéine. (**Ares, Caceres, et Ortiz 2011**).

Épissage alternatif de NKCC2

La combinaison de deux épissages alternatifs indépendants produit au moins six isoformes de NKCC2 dont l'expression est spécifique à l'espèce. Le premier épissage produit les isoformes A, B et F en raison de l'expression variable de l'exon 4, (Figures 11,13).

Les isoformes A, B et F de NKCC2 diffèrent dans leur localisation le long de la TAL (Figures 11,12) et dans leurs caractéristiques de transport ionique. L'isoforme NKCC2A présente une affinité intermédiaire pour le Cl (K_m : 30 mM) et est localisée dans la TAL médullaire et cortical bien qu'elle soit plus abondante dans le cortex. L'isoforme B présente l'affinité la plus élevée pour Cl (K_m : 10-15 mM) et est principalement localisée dans les cellules de la macula densa et la partie corticale. L'isoforme NKCC2F présente la plus faible affinité pour les ions transportés (K_m : 110-130 mM) et est localisée principalement dans la médullaire, (Figures 11, 12 et 13).

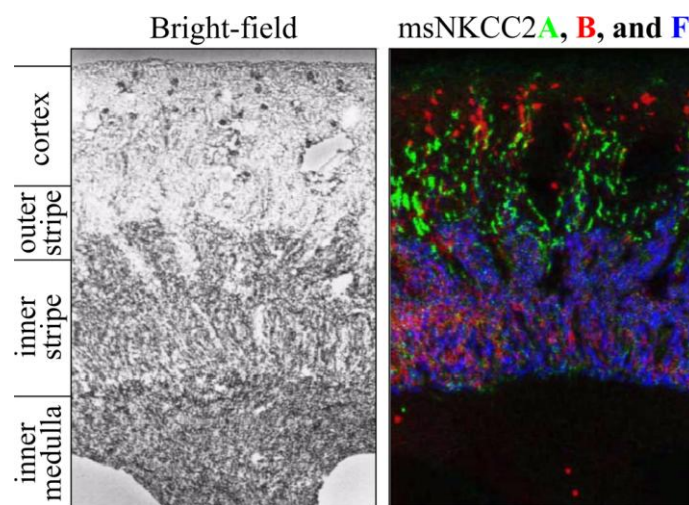


Figure 11 : Distribution des variantes d'épissage du co-transporteur $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$ (NKCC2) dans le rein adulte souris (ms) par hybridation in situ.

(Inner medulla : médulla interne, Inner stripe : zone profonde de la médullaire externe intérieure, Outer stripe : zone superficielle de la médullaire externe, Bright field : microscopie en champ clair)

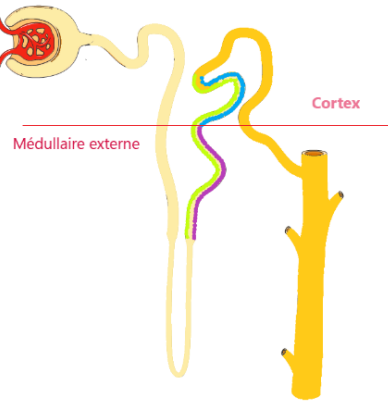
L'exon 4 a été détecté pour chaque variante à l'aide d'une ribo-sonde radioactive spécifique sur une coupe sagittale de tissu, les signaux ont été convertis en couleurs (rouge pour le variant NKCC2B, vert pour NKCC2A et bleu pour NKCC2F) et les images ont été superposées.

Adapté avec la permission de Igarashi et al. (1995). Le montage couleur a été généré par le Dr Biff Forbush (Yale University, CT) revue : (Marcoux et al. 2021).

La distribution relative de ces isoformes et leur affinité pour les ions correspondent à la concentration luminale de NaCl le long de la TAL permettant une réabsorption maximale de Cl sans saturation. Les souris dépourvues de l'isoforme NKCC2A présentent une osmolalité urinaire légèrement inférieure, une petite diminution de la réabsorption de Cl et une augmentation de l'ARNm de l'isoforme NKCC2B, ce qui indique une compensation.

Les souris knockout pour l'isoforme NKCC2B présentent une réabsorption de Cl légèrement inférieure le long de la TAL corticale et une rétroaction tubuloglomérulaire émoussée, ce qui est cohérent à la détection du Cl au niveau de la macula densa. Les souris dépourvues de

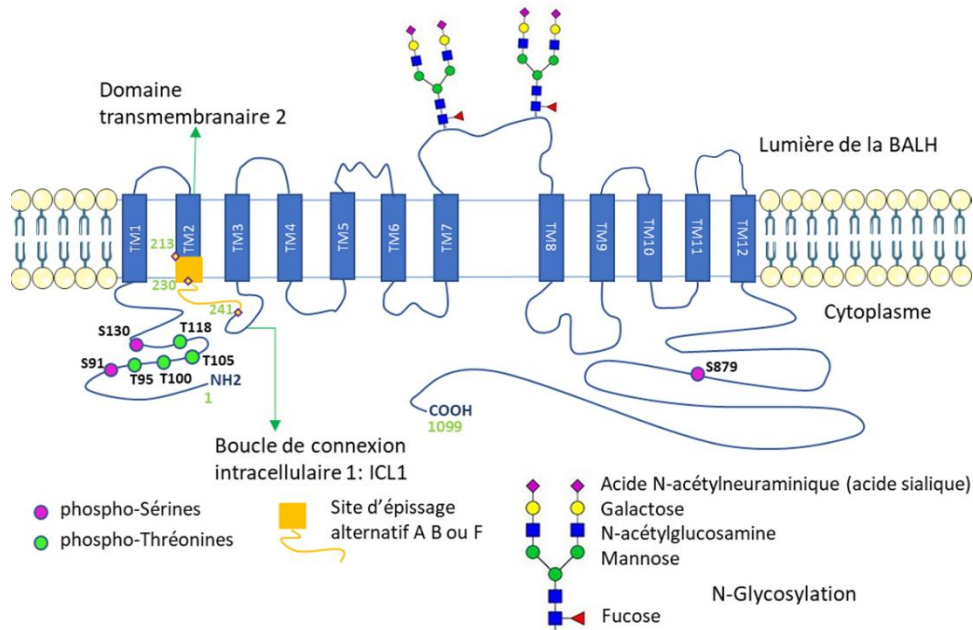
l'isoforme NKCC2A présentent une osmolalité urinaire légèrement inférieure et une petite diminution de la réabsorption de Cl et une augmentation de l'ARNm de l'isoforme NKCC2B, ce qui indique une compensation. (Ares, Caceres, et Ortiz 2011a), (Oppermann et al. 2007). La grande différence d'affinité ionique entre les isoformes B et F est principalement due à des changements d'acides aminés dans la région de liaison intracellulaire 1 (ICL1) entre les domaines transmembranaires TM2 et TM3, (Giménez et Forbush 2007). Deux groupes de trois résidus, un groupe dans TM2 et un autre dans la première boucle intracellulaire ICL1,



sont impliqués dans les changements d'affinité ionique. Le groupe de résidus dans l'ICL1 est principalement responsable des différentes affinités ioniques et semble faire partie d'une conformation -hélicoïdale qui pourrait être partiellement intégrée dans la membrane plasmique. A ce jour, les sites de liaison pour Cl⁺, K⁺, et Na⁺ et des inhibiteurs de la famille du furosévide sont inconnus, (Figure 13).

Figure 12 : Schéma de la localisation des trois isoformes de NKCC2 dans la TAL

Vert Isoforme A, Bleu isoforme B, Rose Isoforme F



NKCC2	Hu	Iso	A	211	L	G	V	L	I	I	L	S	T	M	V	T	S	I	T	G	L	S	T	S	A	I	A	T	N	G	F	V	R	G	241	
NKCC2	Hu	Iso	B	211	L	G	V	I	I	I	G	L	A	V	T	V	T	G	I	T	G	L	S	T	S	A	I	A	T	N	G	C	V	R	G	241
NKCC2	Hu	Iso	F	211	L	G	V	I	I	I	G	L	S	V	V	T	T	L	G	I	S	M	S	A	I	C	T	N	G	V	V	R	G	241		

← TM2 :
ICL1 →

Segment transmembranaire 2

Figure 13 : Schéma du cotransporteur NKCC2 humain

Schéma montrant les sites de phosphorylation potentiels, les deux sites de glycosylations et la zone d'épissage en jaune générant les trois isoformes A, B ou F (haut) et les variations d'épissage situées dans l'exon 4 entre les trois isoformes (bas).

Un second mécanisme d'épissage alternatif a été décrit. Il produit un signal d'arrêt de la transcription dans la partie C-terminale, produisant une isoforme NKCC2 courte à laquelle il manque les 327 derniers acides aminés mais contient 55 acides aminés supplémentaires. Ces acides aminés ne sont pas présents dans l'isoforme longue. Trois isoformes courtes A B et F ont été identifiées uniquement chez la souris. L'expression de l'isoforme F courte de NKCC2 dans les ovocytes de Xénopes induit une entrée de Na^+ et de Cl^- sensible au bumétamide indépendamment du K^+ extracellulaire. Le rôle de l'isoforme courte (770 acides aminés) dans la réabsorption de NaCl dans la TAL est inconnu, car une souris mutante dépourvue de l'isoforme courte n'a pas été générée, (**Ares, Caceres, et Ortiz 2011a**). Des anticorps contre l'extrémité NH₂ de NKCC2 ne détectent pas le variant d'épissage court dans les TALs de rat, et on ne sait pas si ce variant d'épissage est présent dans les reins humains.

N-glycosylation et maturation de NKCC2

La séquence de NKCC2 prédit une protéine de 1095 acides aminés chez la souris de 1099 acides aminés chez l'homme, avec une masse moléculaire calculée de 121 kDa. (**Gerardo Gamba 2005**). En réalité, NKCC2 possède deux sites N- glycosylation du coté apical, situés entre les domaines transmembranaires 7 et 8, à la position N442 et N452, (**Figure 13**), qui lui confèrent une masse moléculaire apparente de 160 kDa en immunoblot. Lors de son export vers la membrane plasmique, NKCC2 subit une maturation dans l'appareil de Golgi. Par conséquent, lorsque NKCC2 est extrait d'homogénats de reins ou de TALs isolées par dissection, l'immunoblot révèle NKCC2 sous deux formes, une forme mature glycosylée de 160 kDa prédominante et très peu de forme à 121 kDa, (**Paredes et al. 2006**), (**Benziane et al. 2007**). L'élimination des deux sites de glycosylation diminue mais n'abolit pas complètement l'activité de transport de NKCC2 ou les niveaux de NKCC2 à la membrane plasmique dans le système d'expression de l'ovocyte de xénope, ce qui suggère qu'une fraction de NKCC2 non glycosylée peut atteindre la membrane plasmique, au moins dans ce système, (**Ares, Caceres, et Ortiz 2011a**).

La séquence responsable du trafic apical de NKCC2 dans l'épithélium polarisé a été localisée à l'extrémité C-terminale cytoplasmique. (**Carmosino et al. 2008**) ont en effet découvert qu'une portion de 77 acides aminés de NKCC2 située dans la partie C-terminale (acides aminés 708-884) est suffisante pour cibler NKCC2 à la membrane apicale.

L'extrémité COOH de NKCC2 contient aussi des informations requises pour la sortie du réticulum endoplasmique (RE), la maturation de la protéine et le trafic RE-Golgi-membrane

plasmique de NKCC2. En surexprimant des mutants dans des cellules non polarisées de rein d'opossum (OKP) ou d'HEK293, nous avons identifié un motif trihydrophobe dans l'extrémité COOH distale de NKCC2 (1081LLV1083) et deux motifs hydrophobes supplémentaires, 1038LL1039 et 1048LI1049, qui sont nécessaires pour la sortie du RE du récepteur, impliqués dans la maturation de celui-ci et son adressage à la membrane plasmique, (**Zaarour et al. 2012**). La délétion du motif LLV a éliminé la glycosylation complexe de NKCC2, résultant en une protéine de 120 kDa qui n'atteint pas la membrane plasmique et qui est retenue, d'après les études de colocalisation, dans un compartiment semblable au RE (**Zaarour et al. 2009**). De même, les mutations doubles de 1038LL1039 ou 1048LI1049 en di-alanines ont perturbé la glycosylation et le taux de NKCC2 à la surface cellulaire, indépendamment du système d'expression, (**Zaarour et al. 2012**).

D'un point de vue clinique, nous avons également démontré que l'une des mutations de NKCC2 rapportées dans le syndrome de Bartter de type 1, (Y998X), est proche de ce motif COOH-terminal de sortie du RE. Ce mutant présente un comportement similaire à celui des mutants dépourvus du signal de sortie du RE, (**Zaarour et al. 2009**).

Régulation hormonale de NKCC2 dans la TAL

L'hormone vasopressine (AVP), augmente l'activité de NKCC2 principalement par une augmentation de l'adénosine monophosphate cyclique (AMP cyclique ou **AMPC**) intracellulaire, via la PKA (**Figure 14**). La parathormone (PTH), la calcitonine, le glucagon ainsi que des agonistes beta-adrénergiques comme la noradrénaline stimulent aussi la réabsorption du NaCl dans la TAL en augmentant les niveaux d'AMPC. La stimulation de NKCC2 par l'AVP n'est pas seulement liée à la phosphorylation, mais aussi à un trafic accru de la membrane apicale, comme cela a été récemment confirmé *in vivo* chez des rats transgéniques au récepteur dominant négatif V2 mutant (Ni3-Glu242stop) de la vasopressine, (**Mutig et al. 2016**). A l'opposé, l'effet inhibiteur de certaines hormones et de certains autacoïdes (hormones locales comme l'angiotensine) dans la réabsorption du NaCl est médié par la guanosine monophosphate cyclique (GMP cyclique ou **GMPc**). C'est le cas des peptides natriurétiques auriculaires (PNA), de l'endothéline, des agonistes alpha-adrénergiques, et de l'oxyde nitrique (NO). Le GMPc inhibe la réabsorption de NaCl en diminuant NKCC2 à la surface apicale dans les TALs. Cet effet est induit par la phosphodiesterase 2 (PDE2) stimulée par le GMPc. L'inhibition de la PDE2 bloque l'inhibition de la réabsorption de NaCl induite par le NO et le GMPc.

En plus des hormones génératrices d'AMPC et de GMPc, l'acide 20-hydroxyeicosatétraénoïque (20-HETE) et la prostaglandine E2 (PGE2), métabolites de l'acide arachidonique inhibent la réabsorption de NaCl par la TAL. (**Figure 14**).

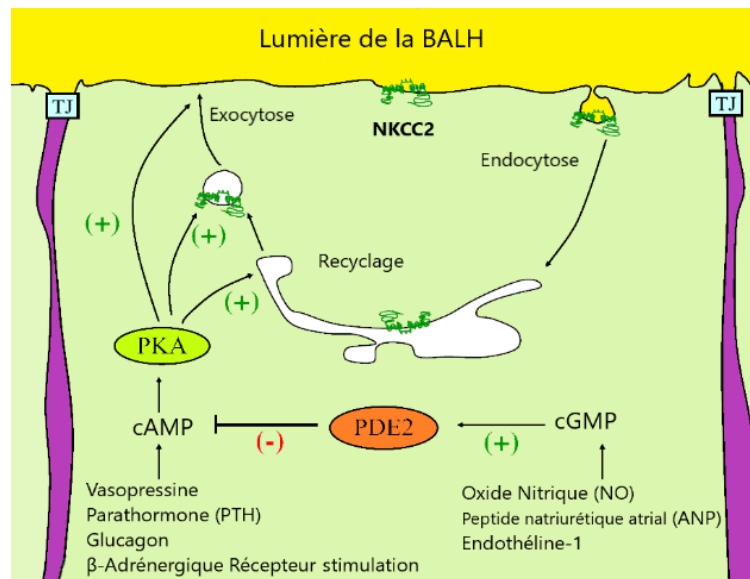


Figure 14 : Mise en évidence des voies de régulation hormonales de NKCC2 dans la branche ascendante large de Henle (TAL)

AMPC/PKA et GMPC/PDE2 sont des voies de signalisation capables de moduler l'activité et le trafic de NKCC2 dans les TALs. Modifié d'après (Ares, Caceres, et Ortiz 2011a).

Enfin, quelques hormones sont connues pour stimuler la réabsorption de NaCl via NKCC2 indépendamment de l'AMPC. C'est le cas de l'insuline, qui stimule diverses voies de signalisation dont les tyrosine kinases et la phosphatidylinositol 3P (PI3P) kinase.

Mécanismes moléculaires de la régulation de NKCC2

Trois mécanismes moléculaires majeurs sont connus pour affecter les paramètres de transport des ions par NKCC2 : le trafic des protéines au niveau de la membrane plasmique, sa phosphorylation, et les interactions protéine-protéine.

La plupart des données ont été générées dans le système d'expression de l'ovocyte de Xénope et dans des cellules non polarisées. Cependant, la régulation moléculaire de NKCC2 a aussi été étudiée dans la TAL, chez les rongeurs dont le rat et la souris, (Ares, Caceres, et Ortiz 2011a).

✧ Turn-over au niveau de la membrane plasmique (trafficking)

Pour la plupart des protéines transmembranaires, la quantité fonctionnelle ainsi que la demi-vie au niveau de la membrane plasmique est déterminée par un équilibre entre endocytose et exocytose à partir de différents pools intracellulaires. NKCC2 se situe dans la membrane apicale mais aussi dans des vésicules intracellulaires abondantes dans l'espace subapical des cellules de la TAL de rat, (**Ares, Caceres, et Ortiz 2011a**). Gimenez et Forbush ont utilisé la microscopie électronique pour étudier la distribution de NKCC2 dans les TALs de souris et ont rapporté que 5-6% de l'immunomarquage total de NKCC2 se trouve soit dans la membrane apicale, soit à 70 nm de celle-ci. Ils ont également constaté qu'au plus 45% du NKCC2 total est situé dans les 140 nm de la membrane apicale. (**Ares, Caceres, et Ortiz 2011a**) ont estimé l'accessibilité de NKCC2 à la biotinylation de surface des TALs dans des conditions de base, à 3-5% de la quantité totale de NKCC2. Cette fraction est quelque peu variable en fonction des anticorps utilisés pour détecter NKCC2 (NH₂ terminus versus COOH terminus). Ces résultats et ceux d'autres chercheurs indiquent que seule une petite fraction du pool total de NKCC2 est accessible à la lumière du TAL.

NKCC2 a une demi-vie d'environ 1 heure à la membrane apicale, maintenue par exocytose, endocytose et recyclage. Un faible rapport entre la surface et le total de NKCC2 dans les TAL suggère un mécanisme permettant d'augmenter rapidement et efficacement l'influx de NaCl par exocytose de petites quantités du pool intracellulaire de NKCC2, ce qui suggère aussi que la maturation du transporteur actif n'est pas efficace, et qu'une fraction de la protéine n'atteint jamais la surface.

La vasopressine et d'autres hormones qui augmentent l'AMPc dans la TAL sont les stimuli physiologiques les plus puissants de la réabsorption du NaCl. L'AVP augmenterait la quantité de NKCC2 dans la membrane apicale et la phosphorylation des thréonines N-terminales (Thr96 et Thr101). Le trafficking de NKCC2 augmente ses niveaux dans la membrane apicale, et ce mécanisme est principalement responsable de l'augmentation de la réabsorption de NaCl par la TAL. (**Ares, Caceres, et Ortiz 2011a**). NKCC2 subit une exocytose constitutive dans les TALs, ce qui suggère que le trafic de NKCC2 est un processus dynamique continu plutôt qu'un événement déclenché. L'augmentation de l'AMPc intracellulaire stimule le taux d'exocytose de NKCC2 par deux fois. L'augmentation de NKCC2 apicale et le taux d'exocytose sont très probablement orchestrés par la PKA. Un agoniste sélectif de la PKA (N6-Bnz-cAMP) a augmenté l'exocytose et l'expression de surface de NKCC2, (**Ares, Caceres, et Ortiz 2011a**). Ces données indiquent que la stimulation de la PKA augmente le trafic de NKCC2 vers la membrane apicale en augmentant le taux d'exocytose. Cependant, l'inhibition de la PKA n'a pas complètement bloqué l'augmentation des taux de NKCC2 de surface stimulée par l'AMPc, ce qui suggère que d'autres voies de trafic, comme l'endocytose, peuvent être inhibées par l'AMPc. Au moins deux acides aminés de NKCC2 du rat sont phosphorylés par la PKA, les Ser126 et Ser874. Les mécanismes moléculaires par lesquels la PKA stimule l'exocytose de NKCC2 dans la TAL sont inconnus. LA PKA peut stimuler l'exocytose de NKCC2 en modulant les dernières étapes finales de la fusion des vésicules avec la membrane plasmique ou en augmentant le nombre de vésicules

qui atteignent/se fixent et fusionnent avec la membrane apicale. Toutes ces étapes impliquent des membres de la famille des récepteurs SNARE (N-ethyl-maleimide-sensitive factor attachment protein receptor (SNARE)). Parmi ceux-ci, VAMP2 et VAMP3 sont présents dans les TALs ainsi que la syntaxine-3, la syntaxine-4, et SNAP23. Plusieurs protéines modulatrices de SNARE sont exprimées dans la plupart des cellules épithéliales. C'est le cas de la snapine, de la tomosyn, de la complexine, et de la Munc18b/c, qui sont impliquées dans l'exocytose stimulée par la PKA dans d'autres cellules.

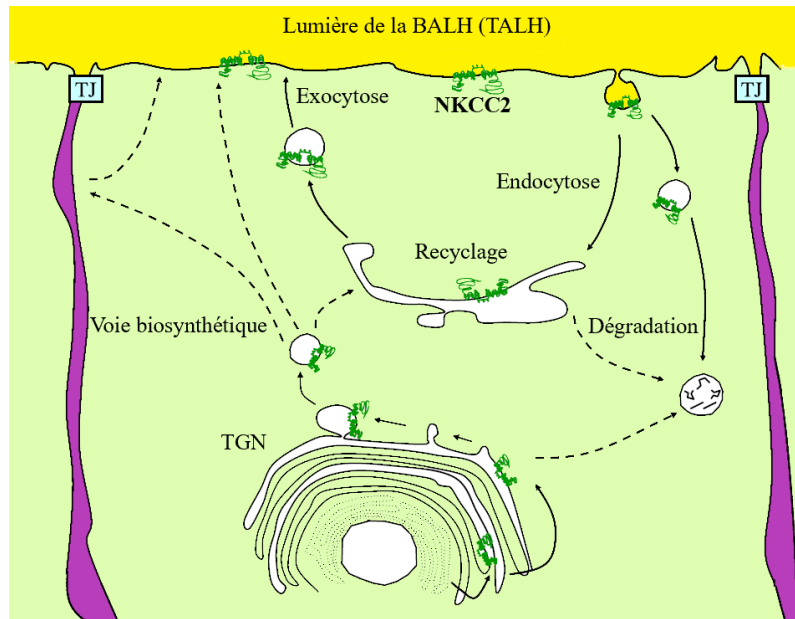


Figure 15 : Un modèle du trafic, ou trafficking en Anglais, de NKCC2 dans la TAL

Les processus connus sont indiqués par des lignes pleines. Les processus non complètement étudiés ou non validés dans les TALs, sont indiqués par des lignes en pointillées. TGN : réseau trans-Golgien (Ares, Caceres, et Ortiz 2011a) (modifié)

↻ Endocytose de NKCC2

Les données montrant une exocytose constitutive de NKCC2 au cours du temps suggèrent que les niveaux de NKCC2 à la surface sont maintenus par endocytose et peut-être par recyclage de celui-ci internalisé, en l'absence de stimuli, (figure 15). (Ares, Caceres, et Ortiz 2011a) ont étudié l'endocytose et le recyclage de NKCC2 en l'absence de stimulation. NKCC2 subit une internalisation constitutive à un taux qui correspond étroitement à l'insertion exocyttaire rapportée. Le trafic constitutif de NKCC2 est essentiel à la fonction de réabsorption de la TAL. Une déplétion aiguë de cholestérol par de la méthyl-cyclodextrine, un agent connu pour l'extraire de la membrane plasmique, inhibe l'endocytose de NKCC2, augmente son taux de surface et le transport net des chlorures par les TALs. Cela suggère que l'exocytose n'est pas affectée. L'augmentation du transporteur à la surface membranaire, après extraction du cholestérol, pourrait aussi être due à l'exocytose de NKCC2 situé dans des vésicules riches en cholestérol (enrichies dans les compartiments endosomaux et de recyclage) dans le but de

restaurer le cholestérol en maintenant l'intégrité de la membrane plasmique, (**Ares, Caceres, et Ortiz 2011a**). A l'appui de cette hypothèse, trois groupes ont montré qu'une fraction de NKCC2 s'associe à des vésicules riches en cholestérol et en sphingolipides ("radeaux lipidiques "lipid rafts"), (**Welker et al. 2008**), (**Yu et al. 2008**), (**Carmosino et al. 2010**).

Les protéines transmembranaires en chemin vers la membrane apicale suivent différentes voies dans des cellules épithéliales modèles. Le transfert de NKCC2 entre le réseau Golgien et la membrane plasmique n'a pas été étudié, et les protéines impliquées dans l'acheminement de NKCC2 vers la membrane apicale ainsi que la régulation de cette voie pendant une stimulation hormonale aiguë ou chronique sont inconnues. Une fois dans la membrane apicale, NKCC2 est internalisé par endocytose, une fraction de NKCC2 récupéré est recyclée vers la membrane apicale, et une fraction est probablement dégradée par des mécanismes inconnus.

⌘ Phosphorylation de NKCC2

Les sites de phosphorylation ont été démontrés chez le rat, la souris, le lapin et l'homme. **Figure 16** (**Mutig 2017**) (**Ares, Caceres, et Ortiz 2011a**).

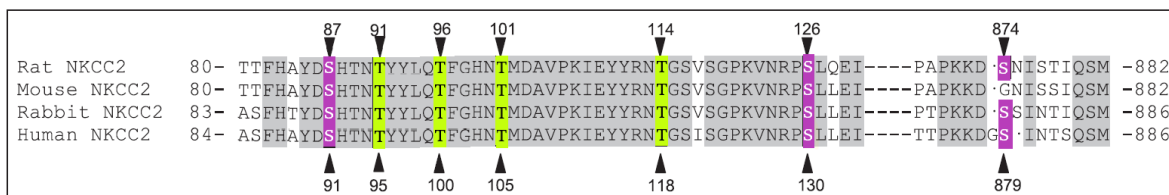


Figure 16 : les sites de phosphorylations de NKCC2 et la conservation inter-espèces

Vert : site Thréonines, **Rose** : Sites Sérinte. (**Ares, Caceres, et Ortiz 2011a**)

La phosphorylation N-terminale de NKCC2 est à priori nécessaire pour atteindre l'activité de transport maximale mais semble être dispensable pour sa fonction de base.

La phosphorylation aux résidus Thr96 et Thr101 induite par l'AVP peut être impliquée dans l'augmentation de l'activité de NKCC2 et de la réabsorption de NaCl dans les TAL pendant l'antidiurèse. Cependant, de manière paradoxale, la charge en eau, qui diminue le transport de l'AVP et du NaCl dans la TAL, augmente également la phosphorylation en Thr96 et Thr101.

L'effet de la phosphorylation sur les résidus Thr96 et Thr101 sur l'activité, le trafic et le renouvellement du transporteur NKCC2 n'a pas été étudié dans les TALs ou les cellules épithéliales polarisées. Bien que les mécanismes sous-jacents sont en partie insaisissables, des données récentes ont suggéré que les phosphorylations des Thr96 et Thr101 peuvent augmenter l'affinité de NKCC2 au Cl⁻, facilitant ainsi son activité, (**Borschewski et al. 2016**). L'hypotonie augmente la phosphorylation de Thr99, Thr104, et Thr117 de NKCC2 de lapin produit dans l'ovocyte de xénopes. Les trois thréonines sont nécessaires à l'activation induite par la phosphorylation. La mutation des trois thréonines élimine l'activité et la

phosphorylation stimulées par l'hypotonie. L'effet de ces mutations sur l'expression de surface ou totale et la maturation de NKCC2 n'a pas été étudié.

Dans les cellules de mammifères non polarisées, les données concernant le rôle de la phosphorylation de la thréonine dans l'activation de NKCC2 sont contradictoires. **(Richardson et al. 2011)** ont examiné les sites de phosphorylation du NKCC2 humain transfecté dans des cellules HEK-293. Cela a permis l'identification de nouveaux phosphosites comme la Ser91 équivalent à Ser87 chez le rat et la souris. Contrairement aux TALs, le taux de NKCC2 semble être très élevé au niveau de la membrane plasmique dans les cellules HEK et cette localisation n'est pas altérée par les phospho-mutants.

⌘Phosphorylation par SPAK et OSR1.

Les kinases SPAK (SPS1-related proline/alanine-Rich kinase) et OSR1 (ou oxidative stress-responsive kinase) interviennent dans la phosphorylation de l'extrémité NH₂ de la protéine NKCC2 induite par l'hypotonie et les faibles quantités de chlorure dans les cellules en culture.

En utilisant la technique du double hybride dans la levure, **(Piechotta, Lu, et Delpire 2002)** ont d'abord identifié que SPAK et OSR1 interagissent directement avec le motif RFQV présent dans l'extrémité NH₂ de NKCC2. SPAK et OSR1 sont des sérines/thréonines kinases de la famille des kinases germinales (GCK). La suppression du site de liaison SPAK/OSR1 sur NKCC2 diminue la phosphorylation au niveau des Ser91, Thr95 et Thr100, favorisée par l'hypotonie.

Le Knock in chez la souris exprimant le mutant inactif SPAK (T243A) montre une diminution du niveau protéique de NKCC2 de 30 à 40%, de sa phosphorylation de 80 % au niveau de la Thr95 et également une diminution du taux de phosphorylation du transporteur NCC sensible aux thiazides, présent dans le tubule distal. Ces souris présentent une pression artérielle inférieure de 10 mmHg dans le cadre d'un régime normal ou faible en sel, mais pas dans le cadre d'un régime riche en sel.

L'ensemble de ces données suggèrent que SPAK et OSR1 seraient des stimulateurs physiologiques de la phosphorylation de NKCC2 et maintiendraient les taux de NKCC2. Cependant, le *knock out* de SPAK chez l'animal entier peut induire des changements hormonaux compensatoires qui influencent la TAL. De plus, d'autres cibles pour SPAK et OSR1, comme KCC3, peuvent être présents dans la TAL. Ainsi, il n'est toujours pas clair par quel degré, mécanisme, et/ou condition physiologique SPAK et OSR1 régulent l'activité de NKCC2 et la réabsorption de NaCl par la TAL. Enfin, on connaît peu les mécanismes physiologiques qui stimulent SPAK ou OSR1 dans la TAL ou le tubule distal.

La vasopressine augmente la phosphorylation des Thr96 et Thr101 dans la TAL de la souris, et elle stimule également le trafic de NKCC2. De même, l'hormone de croissance (GH) augmente la phosphorylation des Thr96 et Thr101 de NKCC2 dans la TAL de rat, mais ne semble pas stimuler l'activité de NKCC2 car le potentiel transépithélial n'est pas augmenté

après 6 heures de traitement par celle-ci. En fait, on ne sait pas si la GH stimule SPAK ou OSR1. Les seuls régulateurs en amont connus de SPAK dans le rein sont la famille des with-no-lysine kinases (WNKs) WNK1, WNK3, et WNK4. Plusieurs études ont montré que les WNKs jouent un rôle dans la réabsorption du NaCl par le néphron et dans le contrôle de la pression artérielle. WNK3 est exprimé dans la TAL et, lorsqu'il est coexprimé dans les ovocytes, il augmente l'activité de NKCC2. **(Ponce-Coria et al. 2008)** ont montré que la diminution du Cl intracellulaire dans des ovocytes exprimant NKCC2 induit une phosphorylation au niveau des Thr96 et Thr101 et une augmentation de l'activité de NKCC2. L'effet de l'hypotonie et/ou d'un déficit en Cl sur NKCC2 est renforcé par WNK3 d'une manière dépendante de SPAK. Ils ont conclu qu'une diminution du Cl intracellulaire active WNK3 par un mécanisme inconnu, qui se lie et active SPAK pour phosphoryler NKCC2.

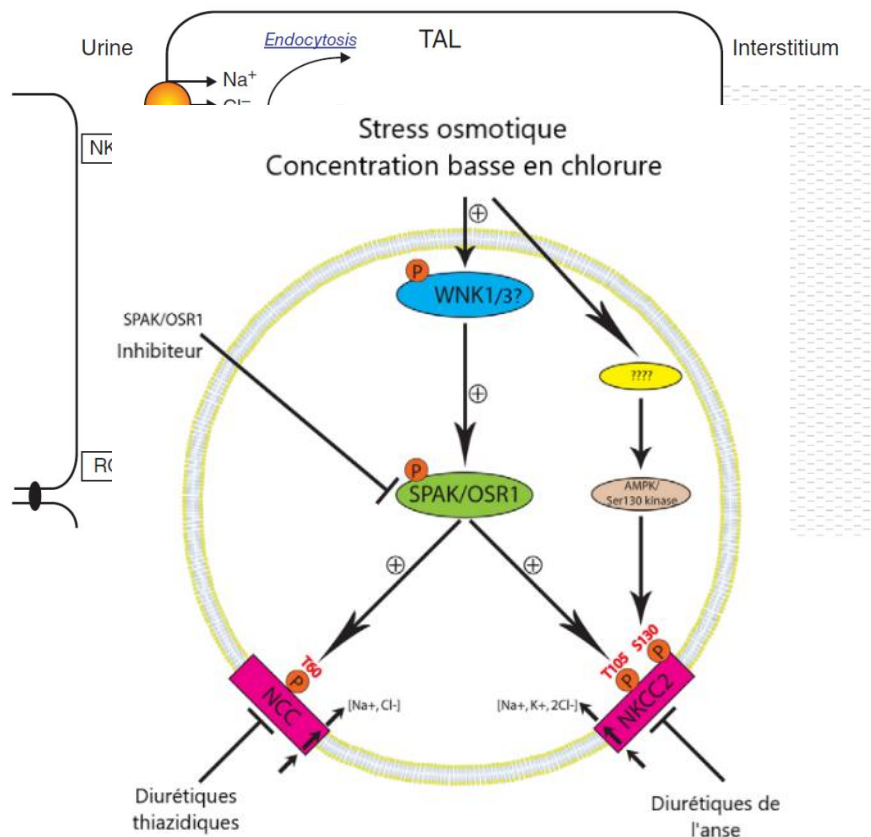
Une protéine interagissant avec SPAK, SORLA (ou sorting protein-related receptor with A-type repeats) semble réguler la localisation subcellulaire de SPAK et sa capacité à phosphoryler NKCC2 au niveau des Thr96 et Thr101. Chez les souris SORLA knockout une fraction plus petite de SPAK colocalise avec NKCC2, et le taux de phospho-NKCC2 est sévèrement diminué (75%) alors que le taux de NKCC2 total n'est pas affecté. Cependant, la quantité de NKCC2 dans la membrane apicale n'est pas différente de celle des souris type sauvage, ce qui plaide contre un rôle de la phosphorylation de la thréonine.

L'ensemble de ces données soutiennent l'idée que la phosphorylation des Thr96 et Thr101 par SPAK, et peut-être OSR1, stimule l'activité de NKCC2 par un mécanisme régulant son niveau d'expression, sa dégradation, sa stabilité et/ou sa maturation, indépendamment du trafficking à la membrane apicale. SPAK et OSR1 ont des cibles supplémentaires qui sont présentes dans les TALs, comme les KCCs et ROMK qui peuvent influencer l'activité de NKCC2, (Figure 17).

Figure 17 : Proposition de régulation de la phosphorylation des transporteurs NCC (tubule contourné distal) et NKCC2 (branche ascendante large de Henle) par SPAK/OSR1 (Richardson et al. 2011)

Phosphorylation par la PhosphoKinase A (PKA)

L'hyposmolalité et une très faible concentration de chlorure stimulent la phosphorylation des Thr96 et Thr101 dans les ovocytes et les cellules en culture. Le principal stimulus physiologique de l'activité et du trafficking de NKCC2 est l'AMPC stimulé par l'AVP ou la stimulation des récepteurs adrénergiques béta2 (β 2AR). (La spectrométrie de masse a



démonstré que les Ser126 dans l'extrémité NH2 (équivalent à la Ser130 dans le NKCC2 humain) et la Ser874 dans l'extrémité COOH (équivalent à la Ser879 dans le NKCC2 humain) sont phosphorylés après l'augmentation des niveaux d'AMPC dans les Tals traitées avec un cocktail d'hormones. Des expériences in vitro indique que la PKA phosphoryle directement les peptides englobant les sites Ser126 et Ser874. Ces données suggèrent fortement que la PKA régule la phosphorylation de NKCC2 en réponse à l'AMPC et à la vasopressine.

Lorsqu'il est exprimé dans des ovocytes, un mutant NKCC2 dépourvu de Ser126 montre une diminution de 70 % de l'activité. (Figure 18).

Figure 18 : **Représentation de l'AMPC comme un " pivot " dans la régulation de NKCC2**

L'activation de l'adénylate cyclase (AC) par la protéine **G couplé protéine α_s** (stimulée par les récepteurs de la vasopressine : **V2**) et l'inhibition par **G α_i** (activée par les récepteurs de la prostaglandine : **EP3**) régule la synthèse de l'AMPC à partir de l'ATP. L'AMPC est dégradé en AMP par des phosphodiesterases, dont l'une d'elles, la **PDE2** est sous le contrôle de la voie de signalisation **PI3K-Akt-eNOS**, oxyde nitrique (**NO**), GMPc activée par le récepteur de l'endothéline (**ET**). L'AMPC a des

effets transcriptionnels, se liant à l'élément CREB (C-AMP Response Element) dans le promoteur du cotransporteur NKCC2 conduisant à une augmentation de sa transcription. L'AMPC stimule également la **PKA**, qui joue un rôle dans le trafic de la NKCC2 vers la membrane plasmique. La protéine synaptique, **VAMP2**, est impliquée dans le processus de trafic médié par la PKA. D'après (**Delpire et Gagnon 2018**)

↻Phosphorylation par l'AMP-activated protein kinase (AMPK)

Une autre kinase phosphorylante NKCC2 est la kinase activée par l'AMP (AMPK). (**Fraser et al. 2007**) ont rapporté que l'AMPK induisait in vitro, la phosphorylation de NKCC2 immunoprécipitée à partir d'une lignée cellulaire de la macula densa (MMD1). Ce site a été identifié comme étant la Ser126 (correspondant à Ser130 du NKCC2 humain) et un anticorps dirigé contre ce site a reconnu une bande de 120 KDa provenant des cellules MMD1. Dans ces cellules, seul la forme NKCC2 immature/non glycosylé était phosphorylée.

(**Richardson et al. 2011**) ont rapporté que l'activateur de l'AMPK, la phenformine, augmentait la phosphorylation de la Ser130 de NKCC2 exprimée dans les cellules HEK-293 et que cette phosphorylation était diminuée par un inhibiteur non sélectif de l'AMPK. Des conditions hypotoniques à faible teneur en chlorure ont également augmenté la phosphorylation de la Ser130, sans stimulation de l'activité de l'AMPK, suggérant peut-être que la voie AMPc/PKA peut être stimulée par une faible concentration en chlorure. La PKA phosphoryle la Ser126, et elle est connue pour stimuler le trafic et l'activité de NKCC2. Cependant, on ne sait pas si l'AMPK stimule ou inhibe l'activité de NKCC2 dans les TALs.

(**Davies et al. 2014**) montrent une augmentation de la phosphorylation de NKCC2 sur la Ser126 de NKCC2, définissent l'AMPK comme un médiateur de la réabsorption de Na⁺ dans l'obésité, et identifient un nouveau rôle pour l'AMPK dans la régulation de l'activité de SPAK/OSR1.

↻La régulation de NKCC2 par les interactions protéine-protéine

L'étude de la régulation de NKCC2 par les interactions protéine-protéine, ouvre de nouvelles voies de compréhension importantes dans sa régulation post-transcriptionnelle et sa physiologie cellulaire. Ces interactions révèlent une mosaïque complexe de mécanismes

visant à régler avec précision son activité. Des données récentes *in vivo* placent ce transporteur au centre du contrôle de la pression artérielle.

Les premières interactions protéine-protéine avec le co-transporteur ont été décrites avec SPAK et OSR1, évoquées ci-dessus et connues pour réguler sa phosphorylation. D'autres interactions ont été découvertes dont plusieurs impliquées dans la régulation de sa présence à la membrane.

✧ Aldolase B

En 2006, notre groupe découvre l'interaction de NKCC2 avec Aldolase B, une abondante enzyme glycolytique, par la technique du double hybride dans la levure, en utilisant l'extrémité COOH de NKCC2 (acides aminés 661-768) comme appât et la confirme par immunoprécipitation dans des cellules de rein d'opossum (OKP) par augmentation du taux d'un NKCC2 exogène, (**Benziane et al. 2007**).

Dans les cellules OKP, l'augmentation des niveaux de l'aldolase B diminue la présence de NKCC2 à la surface apicale sans affecter sa quantité totale. La diminution des niveaux de NKCC2 de surface est accompagnée d'une diminution de son activité, mesurée par l'entrée d'ammonium (NH_4^+) qui peut se substituer au K^+ . Nous avons constaté que l'ajout de fructose 1,6-diphosphate, le substrat de l'aldolase B, au milieu cellulaire diminuait l'interaction de NKCC2 avec celle-ci avec pour conséquence la réapparition du NKCC2 à la surface membranaire. (**Rangarajan et al. 2010**) ont montré que l'Aldolase B se lie avec une grande affinité à la nexine de tri 9 (SNX9), en diminuant la liaison membranaire de SNX9 via ses résidus 165-171. L'Aldolase B interagit également avec la V-ATPase, impliquée aussi dans l'endocytose. La SNX9 fonctionne dans un complexe avec la GTPase dynamin-2 dans les vésicules recouvertes de clathrine, où elle provoque la fission de celles-ci afin d'achever l'endocytose. La localisation du complexe SNX9/dynamin-2 aux vésicules recouvertes de clathrine est aussi bloquée par des interactions avec l'Aldolase, qui se lie au domaine LC4 de la SNX9. Le mécanisme par lequel l'aldolase agirait serait donc une inhibition de l'endocytose par interaction avec SNX9.

✧ The tetraspan protein myelin and lymphocytes-associated protein (MAL/VIP17)

(**Carmosino et al. 2010**) identifient la famille MAL/VIP17, membre du tétraspan, comme un nouvel acteur dans la régulation du taux de NKCC2 au niveau de la membrane plasmique apicale dans le rein. Le partenaire d'interaction additionnel avec l'extrémité COOH de NKCC2, MAL/VIP17, est une protéine associée aux radeaux lipidiques, impliquée dans la distribution apicale de certaines protéines transmembranaires et dans l'endocytose de l'aquaporine-2. MAL/VIP17 est exprimé dans les TAL, les tubules contournés distaux et les canaux collecteurs. Dans les lysats médullaires rénaux de souris, NKCC2 interagit avec

MAL/VIP17. L'endocytose de la chimère NKCC1/CtermNKCC2 est diminuée par l'augmentation du taux de MAL/VIP17 dans les cellules LLC-PK1 et augmentée par l'extinction de MAL/VIP17 dans les cellules MDCK, ce qui suggère que MAL/VIP17 inhibe l'endocytose de NKCC2. Cette étude est en partie basée sur une chimère NKCC1/NKCC2 cterm, il n'est donc pas certain que le trafficking membranaire de NKCC2 natif exprimée dans les cellules de la TAL, affecté par le MAL/VIP17, soit en réalité le même.

▣ Secretory carrier-associated membrane protein (protéine de structuration des vésicules 2 - Scamp2)

Notre groupe a aussi mis en évidence l'interaction de la protéine de structuration des vésicules 2 (SCAMP2) avec l'extrémité COOH terminale de NKCC2. SCAMP2 est identifiée lors d'un criblage d'ADNc de rein humain, par la même technique du double hybride dans la levure, comme interagissant avec la région proximale de l'extrémité C-terminale (acides aminés 661-768) (**Zaarour et al. 2011**). Cette interaction est confirmée dans des cellules OKP exprimant NKCC2. L'augmentation du taux de SCAMP2 dans les cellules OKP diminue la quantité de NKCC2 à la surface membranaire en diminuant le taux d'insertion exocytaire à partir des pools intracellulaires mais n'affecte pas l'endocytose. Une fraction de SCAMP2 colocalise avec NKCC2 dans les structures intracellulaires positives pour Rab11 mais pas à la membrane plasmique dans les cellules OKP. Ces données suggèrent que SCAMP2 retient NKCC2 dans un compartiment de recyclage et sont en accord avec le recyclage constitutif de NKCC2 rapporté dans les TALs. SCAMP2 interagit également avec l'extrémité COOH de NCC (*Slc12a3*), NHE5, NHE7, ainsi que, dans d'autres cellules, les transporteurs de sérotonine et de dopamine. Dans les cellules endocrines PC12, SCAMP2 interagit avec SNAP-23, le partenaire de VAMP2/3 dans la formation du complexe SNARE.

SCAMP2 régule le transit de NKCC2 par les endosomes de recyclage et limite le ciblage de la surface cellulaire du co-transporteur en interférant avec son trafic exocytaire.

▣ Moésine

Pour rechercher les protéines interagissant avec NKCC2, des chercheurs ont utilisé une approche protéomique basée sur l'utilisation de la méthode bidimensionnelle blue native/SDS-PAGE (BN/SDS-PAGE) couplée avec la spectrométrie de masse (MS) dans des cellules LLC-PK1 transfectées avec la protéine chimérique NKCC2, en conditions non dénaturantes. Cette technique a permis d'identifier la moésine comme interacteur de la partie C-terminale de NKCC2 dans des conditions physiologiques. (**Carmosino et al. 2012**) ont identifié cette protéine comme un nouvelle actrice régulant l'insertion exocytaire de c-NKCC2 dans les conditions stables. La moésine appartient la famille des protéines ezrin, radixin, moesin (ERM). Les protéines ERM partagent une structure conservée comprenant deux domaines fonctionnels principaux : la partie N-terminale, qui se lie à des cibles protéiques au niveau de

la membrane plasmique, et la partie C-terminale, qui contient le site de liaison à la F-actine. Dans la conformation fermée (ou inactive), la partie C-terminale de chaque protéine ERM se lie étroitement à son propre domaine N-terminal, empêchant ainsi l'interaction avec des cibles membranaires et l'actine. Dans le rein, la moésine, est exprimée dans les cellules endothéliales mésangiales et glomérulaires. Elle est probablement impliquée dans la migration cellulaire et le remodelage glomérulaire. La moésine est spécifiquement localisée dans la médullaire externe, précisément dans les cellules de la TAL. Elle est absente dans les canaux collecteurs de la médullaire interne, ce qui souligne la pertinence physiologique des résultats.

NKCC2 colocalise et co-immunoprécipite avec la moésine dans les cellules HEK, ainsi que dans les cellules polarisée LLC-PK1. Cette étude montre que la moésine est une protéine d'interaction de NKCC2 dans les cellules épithéliales et qu'elle est nécessaire à l'exocytose et à l'expression membranaire du cotransporteur. La moésine jouerait un rôle critique dans l'insertion de la membrane apicale de NKCC2, suggérant une implication possible de celle-ci dans la régulation de l'absorption du Na^+ et du Cl^- dans le rein.

▣ Dynamine2, Clathrine et radeaux lipidiques

La dynamine-2 est une GTPase (Guanosine triphosphate hydrolase) qui joue un rôle clé dans la libération des vésicules nouvellement formées de la membrane plasmique au cours de l'endocytose. Dans le néphron, la dynamine-2 a été détectée dans le canal collecteur. Sa localisation et sa fonction dans la TAL ne sont pas connues. La clathrine est une protéine structurelle, constituant l'enveloppe (ou manteau) de certaines vésicules et serait impliquée dans l'endocytose. (**Ares et Ortiz 2012**) montrent la colocalisation de la Clathrine avec NKCC2 dans la TAL in vivo chez le rat. Si la preuve d'une interaction avec la dynamine 2 ou la clathrine n'est pas montrée dans cette étude, les auteurs fournissent la première preuve que l'endocytose de NKCC2 est régulée en partie par celle-ci, la clathrine et des voies dépendantes des radeaux lipidiques dans l'épithélium rénal. NKCC2 connaît une endocytose constitutive dans les TALs natifs, principalement via une voie régulée par la dynamine-2 et les voies dépendantes de la clathrine et des radeaux lipidiques contribuant à l'internalisation apicale du cotransporteur.

▣ Annexine (AnxA2)

Le criblage par la technique du double hybride a identifié une autre interaction entre NKCC2 et la protéine cytosolique, Annexine A2 (AnxA2) (**Dathe et al. 2014**). Dans cette étude les auteurs montrent que l'AnxA2, liée aux phospholipides de manière Ca^{2+} -dépendante, organisant des microdomaines, est codistribuée avec NKCC2 pour promouvoir sa translocation apicale en réponse à la stimulation de l'AVP et au stress hypotonique à faible teneur en chlorure.

Les microdomaines des radeaux lipidiques servent généralement de plateformes aux protéines membranaires pour faciliter leurs interactions avec d'autres protéines. Les annexines régulent

le trafficking dépendant des radeaux lipidiques. En particulier, l'AnxA2 joue un rôle spécifique dans le rein, où elle sert de médiateur pour le trafic induit par l'AMPc de l'aquaporine 2 dans le canal collecteur. L'AnxA2 est également exprimée dans la TAL, où la fusion des vésicules transportant NKCC2 avec la membrane plasmique luminal, induite par l'AMPc, permet le recrutement rapide en surface et l'activation du NKCC2 stocké au niveau apical. La microscopie confocale montre une colocalisation apicale substantielle de l'AnxA2 avec NKCC2 dans les cellules médullaires (m)TAL et macula densa (MD). L'AnxA2 phosphomimétique portant un phospho-accepteur mutant (AnxA2-Y24DGFP) a multiplié par 5 le taux de surface et l'association de la NKCC2 à un radeau lipidique lors d'une stimulation hypotonique à faible teneur en chlorure. NKCC2 et l'AnxA2 interagissent d'une manière dépendante de la phosphorylation mais l'effet de l'AnxA2 n'implique que le NKCC2 non phosphorylé. **(Dathe et al. 2014)** définissent l'AnxA2 comme un facteur de trafic de NKCC2 associé aux radeaux lipidiques et fournissent un aperçu mécaniste de la régulation de ce cotransporteur essentiel.

▣ Protéine membranaire associée aux vésicules 2 (VAMP2)

Certains SNAREs (*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein Receptor*) ont été rapportés comme étant exprimés dans la TAL. Il s'agit de VAMP2, VAMP3, SNAP-23, syntaxine 3, et syntaxine 4. Les SNAREs sont une super famille de protéines majoritairement transmembranaires dont la structure et la séquence sont particulièrement conservées. **(Caceres, Mendez, et Ortiz 2014)** montrent la coimmunoprécipitation de NKCC2 avec VAMP2 dans les TALs de rat, et leurs colocalisations dans des domaines précis à la surface apicale. L'étude, montrent aussi que la stimulation de l'AMPc augmente la livraison exocyttaire de VAMP2 à la membrane plasmique des cellules rénales, et la stimulation de la PKA augmente la coimmunoprécipitation de VAMP2 avec NKCC2 dans les TALs. Comme nous l'avons vu, les voies biologiques qui stimulent la production d'AMPc, comme la stimulation hormonale par l'arginine, la vasopressine ou les récepteurs adrénergiques, améliorent la réabsorption du NaCl par la TAL en augmentant l'expression du NKCC2 de surface à l'état stable. De la même manière, des facteurs comme l'oxyde nitrique et le GMPc, diminuent l'abondance de NKCC2 à la surface apicale du TAL et donc le transport du NaCl. Leurs données suggèrent que le mécanisme par lequel l'AMPc et la PKA améliorent la livraison exocyttaire de NKCC2, pourrait impliquer une interaction accrue de VAMP2 avec NKCC2. Les auteurs apportent un faisceau concordant et suffisant pour conclure que VAMP2 interagit avec NKCC2 pour réguler son trafic apical exocyttaire stimulé par l'AMPc dans les cellules épithéliales rénales natives. Une diminution de 70% de VAMP2 diminue de 50 % l'état d'équilibre à la surface membranaire apicale de NKCC2 et bloque complètement le transport exocyttaire de NKCC2 stimulé par l'AMPc. VAMP2 est un médiateur de la libération exocyttaire de NKCC2 stimulée par l'AMPc et augmente sa présence à la surface membranaire dans les TALs.

▣ Calcineurin (PP2B) and Sorting-Related Receptor with A-Type (SORLA)

L'inhibition de la calcineurine phosphatase stimule le transport dans la TAL et le tubule contourné distal. Les inhibiteurs de la calcineurine sont largement utilisés comme médicaments immunosuppresseurs.

Les immunosuppresseurs possèdent des avantages indiscutables dans la réduction des taux de rejet après une transplantation, mais ils ont aussi des effets secondaires importants, dont l'hypertension. **(Borschewski et al. 2016)** identifient NKCC2 comme une cible de l'isoforme Ab de la calcineurine. L'administration de la cyclosporine, un inhibiteur de la calcineurine, augmente à court terme chez les souris l'abondance du phospho-NKCC2, et le traitement du TAL isolé avec la cyclosporine augmente l'affinité pour le chlorure et l'activité de transport de NKCC2.

(Borschewski et al. 2016) démontrent que la déphosphorylation de NKCC2 dépend de la calcineurine, avec laquelle il interagit. SORLA module ce processus via son interaction avec la calcineurine et colocalise avec NKCC2. A l'heure actuelle, on ne sait pas si la calcineurine déphosphoryle le transporteur directement ou indirectement par d'autres phospho-enzymes. SORLA et la calcineurine sont les composants d'une voie de signalisation régulant la fonction de NKCC2.

▣ the Alström syndrome 1 (*ALMS1*) gene locus

Des études d'association pangénomique, (en anglais *genome-wide association study*, GWAS) ont identifié le locus du gène du syndrome d'Alström 1 (*ALMS1*) pour expliquer la susceptibilité au dysfonctionnement rénal, à l'hypertension et à l'insuffisance rénale chronique (IRC).

Les mutations du gène *ALMS1* chez l'homme provoquent le syndrome d'Alström, qui se caractérise par des altérations métaboliques progressives, dont l'hypertension et l'IRC. Chez l'homme, les mutations perte-fonction dans le gène *ALMS1* provoquent le syndrome d'Alström caractérisé par une cardiomyopathie, une hypertension, de l'obésité et un diabète de type 2. Le mécanisme biologique sous-jacent par lesquelles mutations du gène *ALMS1* conduisent à la pathophysiologie évoquée ci-dessus n'est pas comprise.

(Jaykumar et al.2018.), (Jaykumar et al. 2016) découvre une nouvelle fonction potentielle de l'*ALMS1* en tant que régulateur de l'homéostasie rénale du NaCl et de la pression artérielle (PA). Les auteurs montrent que l'*ALMS1* est exprimé le long du néphron et semble être enrichi dans la TAL, où il interagit avec l'extrémité C-terminale de NKCC2. En caractérisant un nouveau modèle génétique de rat dont l'insertion d'un transgène provoque la délétion de l'*ALMS1*, les auteurs montrent que chez ces rats *ALMS1*-KO, une plus grande réabsorption de NaCl est induite par NKCC2, en raison, à la fois, d'une augmentation de sa présence à la

surface apicale des cellules de la TAL et d'une diminution de l'endocytose de celui-ci. De plus, les rats ALMS1-KO présentent une capacité rénale réduite à excréter une charge volumique salée et de l'hypertension. Les auteurs concluent que l'interaction d'ALMS1 avec NKCC2 est essentielle au processus de réabsorption rénale de NaCl et, par conséquent, à la régulation de la PA.

▣ Osteosarcomas 9 (OS9)

Afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation du transit de NKCC2 dans le réticulum endoplasmique (RE), nous avons porté notre attention sur une nouvelle interaction protéine-protéine, entre l'extrémité C-terminale distale de NKCC2 (résidus 898-1095) et la lectine OstéoSarcomas 9 (OS9) (**Seaayfan et al. 2016**). OS9 est une protéine ubiquitaire identifiée à l'origine comme étant augmentée dans certains ostéosarcomes. Des études antérieures ont associé OS9 au contrôle de la qualité du réticulum endoplasmique (ERQC) et le transport du RE vers le Golgi. OS9 participe ainsi à la voie de la dégradation associée au réticulum endoplasmique (ERAD) des glycoprotéines mal repliées. La coimmunoprécipitation dans des cellules rénales révèle l'interaction d'OS9 avec NKCC2 et implique principalement la forme immature de celui-ci. L'analyse immuno-cytochimique en microscopie confocale montre la colocalisation de NKCC2 et OS9 au niveau du réticulum endoplasmique. L'augmentation du taux d'OS9 dans des cellules rénales en culture, diminue la stabilité du core glycosylé de NKCC2 en augmentant sa dégradation par la voie du protéasome. A contrario, la déplétion d'OS9 augmente la stabilité et la maturation de la protéine du co-transporteur. L'ensemble de ces résultats suggèrent ainsi la présence d'une voie ERAD de la forme immature de NKCC2 médiée par OS9 et dépendante du protéasome.

▣ protéine chaperon de stress 70 (STCH) et la protéine de choc thermique 70 (Hsp70)

Nous avons identifié la protéine chaperon de stress 70 (STCH) et la protéine de choc thermique 70 (Hsp70) inductible par le stress, comme deux nouveaux partenaires de liaison de la forme de NKCC2 résidante dans le RE. L'Hsp70 (Hsp72/HSPA1A) inductible par le stress est communément appelée Hsp70. STCH est également connue sous le nom de "protéine ATPase centrale de la protéine de stress 70 microsomale" et de "protéine de choc thermique 70-kDa membre 13" (HSPA13). STCH est présente de manière constitutive dans tous les types cellulaires d'origine humaine. Elle est induite par une incubation avec du calcium, mais pas par une exposition à un choc thermique. Au contraire de la Hsp70 inductible par le stress, largement étudiée, seules quelques études ont établi un lien entre STCH et certaines maladies, et sa principale fonction cellulaire et moléculaire reste mal définie (**Bakhos-Douaihy et al. 2021**).

Le knock-down de STCH augmente le niveau de protéines totale de NKCC2 alors que le knock-down de Hsp70 ou son inhibition par YM-01 provoque l'effet inverse. Le test à la cycloheximide montre que dans les cellules présentant une augmentation du taux de STCH, la stabilité et la maturation de NKCC2 sont fortement altérées. Contrairement à STCH, l'augmentation associée des taux de Hsp70 avec NKCC2 dans des cellules de mammifères augmente la maturation de celui-ci. De plus, nous avons montré que la voie de dégradation de NKCC2 associée au RE (ERAD) induite par la STCH, implique également la voie de dégradation associée au lysosome via le RE. Le rôle de mécanismes supplémentaires de contrôle qualité des protéines nouvelles synthétisées dans le RE, définis comme des voies de dégradation associées au RE vers le lysosome (ERLAD), apparaît progressivement, car certaines protéines mal repliées échappent aux facteurs de l'ERAD et peuvent former des agrégats qui ne peuvent pas être déplacés à travers la membrane du RE. L'ensemble de ces données sont cohérentes avec les effets différentiels et antagonistes de STCH et Hsp70 sur la biogenèse de NKCC2. Nous montrons que STCH et Hsp70 interagissent avec la forme immature de NKCC2 principalement au niveau du RE. D'une manière intéressante, nous avons aussi constaté que STCH et Hsp70 régulent de manière différentielle l'expression de NKCC2 et de ses mutants pathogènes. STCH favorise une dégradation efficace de NKCC2 au niveau du RE, d'une manière dépendante du protéasome et du lysosome, révélant ainsi une nouvelle voie moléculaire dans la régulation du co-transporteur (**Bakhos-Douaihy et al. 2021**).

La [Figure 19](#) présente une synthèse des partenaires de NKCC2 dans les différents compartiments subcellulaires.

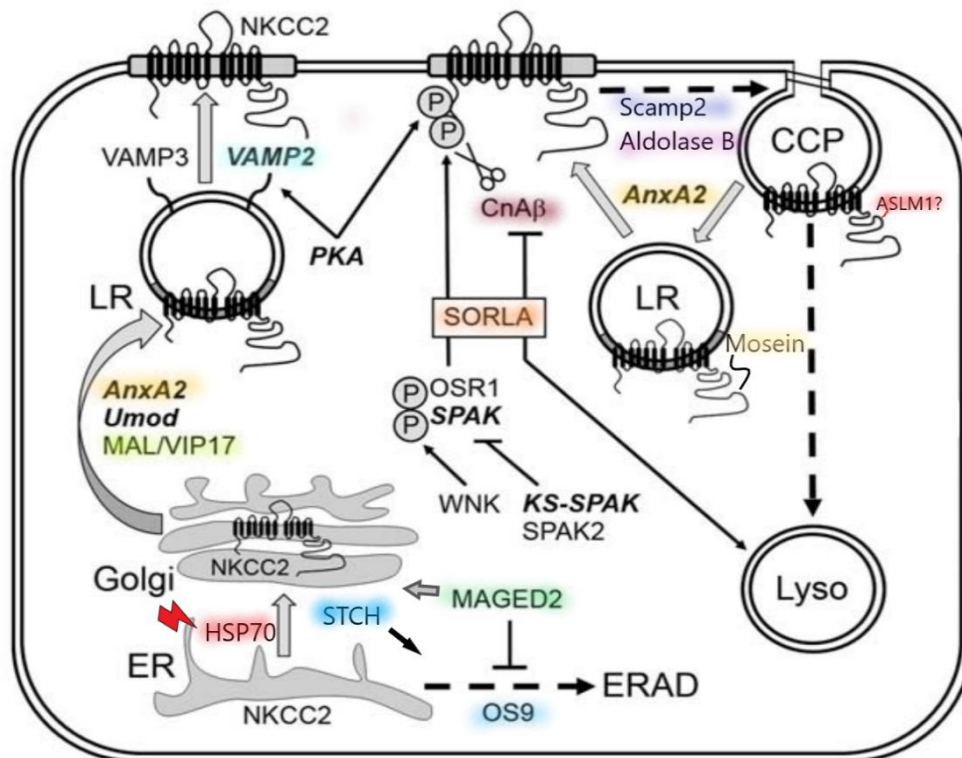


Figure 19 : Récapitulation des découvertes sur la régulation de NKCC2 par les interactions protéine-protéine

Les flèches grises épaisses indiquent les principales étapes du trafic apical, les flèches en pointillés montrent la voie de dégradation, les flèches fines indiquent les effets activateurs, et les barres en forme de T ou les ciseaux indiquent les effets inhibiteurs. Les protéines impliquées dans l'activation de NKCC2 induite par l'AVP sont représentées par des styles gras et italique. CCP (clathrin-coated pits), puits recouverts de clathrine ; ER, réticulum endoplasmique ; FL, pleine longueur ; LR, radeaux lipidiques ; Lyso, dégradation lysosomale ; OS9, protéine 9 amplifiée de l'ostéosarcome ; Umod, uromoduline. L'éclair rouge symbolise le stress. Schéma modifié d'après (Mutig 2017).

Le contrôle qualité et le système de Dégradation des protéines Associé au Réticulum Endoplasmique (ERAD)

Généralités sur l'ERAD et le contrôle qualité des protéines

Le réticulum endoplasmique (RE) est un organite cellulaire jouant des rôles fondamentaux dans la production, la transformation et le transport des protéines et des lipides. C'est l'organite responsable de la maturation d'environ la moitié des protéines, dans lequel des protéines aberrantes peuvent être générées, notamment dans diverses conditions de stress physiologique. Si les protéines mal repliées ne sont pas éliminées à temps, cela peut entraîner un stress protéotoxique. Le maintien de la protéostase cellulaire est une condition nécessaire à l'accomplissement de la fonction cellulaire de base. Ainsi, la cellule emploie un système de contrôle de la qualité des protéines (ERCQ), essentiel pour séquestrer, tenter de replier et dégrader toutes protéines mal conformées.

Malgré la présence de divers facteurs dans le RE qui favorisent le repliement des protéines, de nombreuses protéines ne parviennent pas à se plier et à s'assembler correctement. Les protéines régulatrices du RE subissent elles-mêmes une dégradation en réponse à des stimuli ou à l'évolution des besoins de la cellule.

Le système ubiquitine-protéasome (UPS) est responsable de la majorité de la dégradation protéique au niveau du RE. Ce processus est appelé dégradation associée au RE (ERAD).

La fonction première de l'ERAD est d'assurer le contrôle de la qualité des protéines associées à la membrane, en ciblant les protéines définitivement mal repliées, intra-organelles et intramembranaires pour les dégrader. Il semblerait que le système ERAD fonctionne également pour maintenir des niveaux appropriés d'un sous-ensemble de protéines associées à la membrane. En effet, l'ERAD jouerait un rôle dans le maintien de la stœchiométrie appropriée des complexes multiprotéiques, en assurant la dégradation des composants produits en excès par rapport à la sous-unité limitante du complexe (**Printsev, Curiel, et Carraway 2017**). Les protéines définitivement mal repliées du RE, luminales ou transmembranaires, sont alors reconnues par leur hydrophobie et leur état de glycosylation, par des chaperons moléculaires, capables de reconnaître les défauts de repliements protéiques, simultanément ubiquitinées, et retirées du RE par un mécanisme de rétrotranslocation, puis dégradées par le protéasome cytosolique (**Vitale et Denecke 1999**).

Le protéasome est la plus importante protéase cytoplasmique. Le protéasome 26S est une protéase multi-catalytique de grande taille (~2,5 MDa) principalement localisée dans le cytoplasme. La coiffe du protéasome, ou la particule 19S (également connue sous le nom de PA700), abrite des récepteurs d'ubiquitine, des enzymes de dés-ubiquitination et une série d'ATPases AAA qui déplient et délivrent les substrats dans le cœur du protéasome 20S (**Needham et Brodsky 2013**).

L'incapacité à éliminer les protéines mal repliées conduit souvent à leur accumulation sous forme d'agrégats protéiques, un évènement commun au développement de nombreuses maladies dégénératives (**Schwartz et Ciechanover 2009**). Les agrégats protéiques erronés, ne pouvant pas être repliés, peuvent aussi être éliminés par les chaperons. Ces protéines sont alors dégradées lors de la fixation covalente de l'ubiquitine, de manière ATP-dépendante. L'ubiquitination peut être soit une mono-ubiquitination par ajout d'une seule molécule d'ubiquitine, soit une poly-ubiquitination par ajout d'une chaîne de molécules d'ubiquitine. Le sort des substrats ubiquitinés est déterminé par la position de la lysine par laquelle l'ubiquitination est médiée. Les protéines sont ainsi susceptibles d'être éliminés par le système ubiquitine-protéasome (UPS) ou par l'autophagie selon le type et la position de l'ubiquitine (**Zhang et al. 2020**).

L'ERCQ de la cellule est donc constituée de deux fonctions autonomes qui collaborent. D'une part, le système des chaperonnes moléculaires, constitué de divers types de protéines de choc thermique (HSP), dont la fonction est de libérer et de déplier des agrégats les protéines individuellement mal repliées, et, d'autre part, le système de dégradation, via le système ubiquitine-protéasome (UPS) et/ou les voies de l'autophagie (**Zhang et al. 2020**).

L'ERAD des protéines membranaires, cytosoliques et luminales

Le contrôle de qualité de toutes les protéines membranaires ou de la voie de sécrétion, est le processus qui contrôle les protéines synthétisées au niveau du RE et les empêche d'être transférées au Golgi avant qu'elles ne soient correctement pliées et assemblées (**Vitale et Denecke 1999**).

Le mécanisme de l'ERAD est capable de dégrader un sous-ensemble diversifié de protéines, y compris celles situées dans la lumière du RE, de la membrane du RE, de l'enveloppe nucléaire, du cytoplasme et du nucléoplasme.

Les substrats de l'ERAD dont les signaux de dégradation sont situés dans la lumière du RE sont appelés substrats de l'ERAD-L. Les substrats ERAD-L sont ciblés pour être dégradés par des mécanismes de reconnaissance qui dépendent du repliement de la protéine et/ou de son état de glycosylation. Toutes les ligases E3 majeures exposent leurs domaines RING (Really Interesting New Gene) catalytiques sur le côté cytoplasmique de la membrane du RE. Les substrats de l'ERAD-L sont reconnus dans la lumière du RE et transportés à travers la membrane pour subir une ubiquitinylation à la surface du RE. Ces substrats sont ensuite extraits dans le cytosol pour être dégradés par le protéasome. Le transport des protéines à travers la membrane du RE et l'extraction membranaire subséquente sont appelés rétrotranslocation. L'implication des diverses ligases E3 de mammifères dans la dégradation des protéines luminales est moins bien définies que dans la levure (**Mehrtash et Hochstrasser 2019**).

Les protéines membranaires intégrales ciblées par l'ERAD sont généralement classées en deux autres sous-classes en fonction de l'emplacement de leurs domaines mal repliés. Les protéines membranaires contenant un défaut de repliement dans leur région membranaire sont appelées substrats de l'ERAD-M, tandis que celles contenant un défaut de repliement dans la partie exposé du côté cytoplasmique sont appelées substrats de l'ERAD-C. Après leur ubiquitinylation, les substrats membranaires sont transférés dans le cytoplasme et dégradés par le protéasome (**Mehrtash et Hochstrasser 2019**), ([Figure 20 et 21](#)).

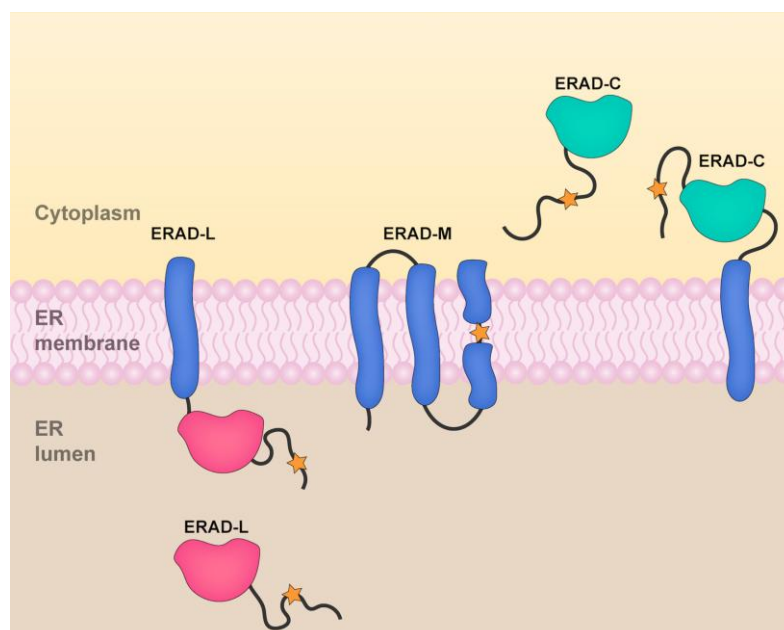


Figure 20 : les différentes classes de substrat de l'ERAD des protéines membranaires, cytosoliques ou luminales

Les protéines ciblées par l'ERAD sont classées en trois classes de substrats en fonction de la localisation de leurs domaines mal repliés ou dégrons (désignés par une étoile orange). Les différentes classes de substrat portent des dégrons situés dans la lumière du RE (ERAD-L), la membrane du RE (ERAD-M), ou le cytoplasme (ERAD-C). Les substrats ERAD-L et ERAD-C comprennent des protéines membranaires intégrales et des protéines solubles. (ER : reticulum endoplasmique, Lumen : lumière, Cytoplasm : cytoplasme) (Mehrtash et Hochstrasser 2019).

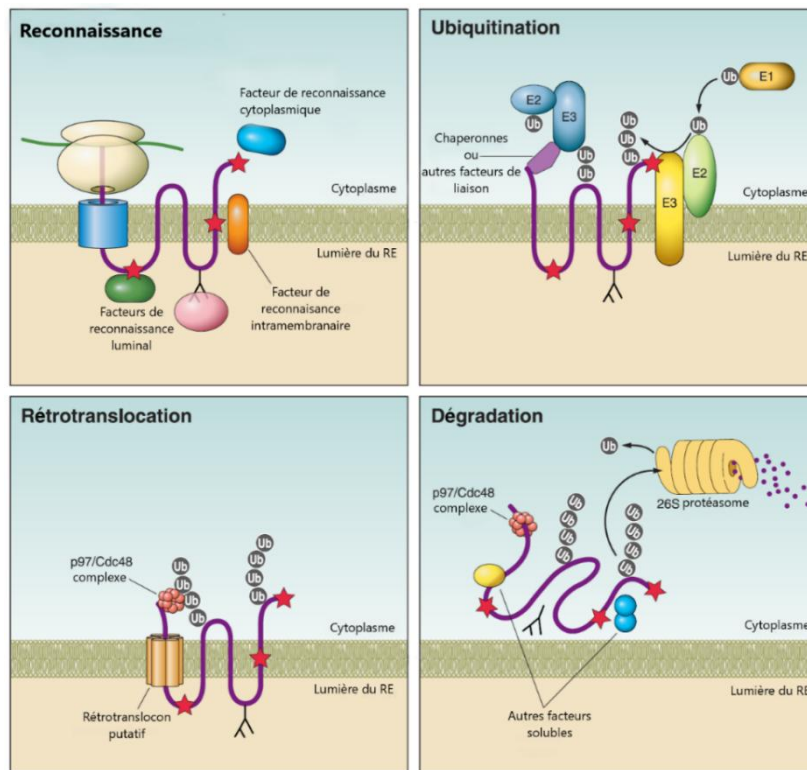


Figure 21 : Les étapes de la dégradation associée au réticulum endoplasmique (ERAD)

Reconnaissance : pendant la synthèse et la translocation des protéines, une région mal repliée (étoile rouge) peut se trouver dans les domaines cytoplasmique, luminal du RE ou transmembranaire d'une protéine. La reconnaissance est médiée par les chaperons luminaux du RE ou cytoplasmiques, comme indiqué, en fonction de l'emplacement du défaut de repliement (ERAD L, M ou C). Dans le cas des glycoprotéines, les lectines (en rose) interagissent avec les N-glycanes et, dans certains cas, surveillent l'état de repliement des glycoprotéines.

Ubiquitination : après la reconnaissance, la machinerie d'ubiquitination est recrutée sur le substrat mal plié, soit directement dans la membrane, soit par des interactions avec des chaperons cytoplasmiques. Une enzyme activatrice d'ubiquitine (E1) transfère l'ubiquitine (cercle gris noté Ub) à

une cystéine du site actif d'une enzyme conjuguée d'ubiquitine (E2) dans un processus dépendant de l'ATP. L'ubiquitine est ensuite transférée, le plus souvent, à un résidu lysine sur une protéine candidate via une ubiquitine ligase (E3). L'ubiquitination à la membrane du RE peut se faire par l'intermédiaire de ligases E3 cytoplasmiques ou localisées dans le RE, qui sont toutes deux présentées.

Rétrotranslocation : pour les protéines membranaires (illustrées), la rétrotranslocation peut se produire par le retrait de la protéine à travers un canal (rétrotranslocon) et/ou par le retrait de la protéine et de la membrane environnante (non illustré). Dans les deux cas, la rétrotranslocation dépend presque toujours du complexe p97/Cdc48 (P97/CdC48) (P97 ou VCP : vasoline-containing protein en anglais ou encore ATPase transitoire du réticulum endoplasmique chez les mammifères et CDC48 chez *S. cerevisiae*, est une ATPase de la famille AAA qui désassemble les protéines SNARE après la fusion des membranes. Chez l'homme elle est codée par le gène *VCP*), et interagit avec l'ubiquitine et les régions mal repliées d'un substrat. p97/Cdc48 fournit la force mécanique par hydrolyse de l'ATP pour l'élimination du substrat.

Dégradation : à la suite de la rétrotranslocation, les protéines mal repliées sont dirigées vers le protéasome 26S et doivent rester solubles pour éviter l'agrégation. Les N-glycanes sont coupés par la N-glycanase (non représentée), et les fragments d'ubiquitine sont éliminés par des enzymes de désubiquitination dans le cytosol ou dans la coiffe du protéasome. Le protéasome contient trois activités peptidases, de type trypsine, chymotrypsine et caspase, qui clivent les protéines en courts fragments peptidiques. Légèrement modifié, d'après (**Guerriero et Brodsky 2012**)

CONTEXTE DE L'ETUDE

D'après les résultats de la biosynthèse et la maturation de NKCC2 obtenus dans nos travaux antérieurs, seule une faible fraction de NKCC2 est capable d'atteindre la membrane plasmique sous sa forme mature. Environ 70% des protéines NKCC2 nouvellement synthétisées dans le RE sont au moins dégradées par le système ERAD (**Benziane et al. 2007**). Ces résultats suggèrent ainsi que le contrôle de qualité de NKCC2 dans le réticulum endoplasmique est une étape limitante pour la maturation et le trafic du cotransporteur vers la membrane plasmique. Ceci nous a incité à étudier d'une manière plus approfondie les déterminants moléculaires, en particulier les partenaires protéiques, impliqués dans la maturation du cotransporteur.

Afin d'identifier de nouvelles protéines interagissant avec NKCC2, nous avons utilisé la technique du double hybride dans la levure, décrit dans les articles (**Benziane et al. 2007**), (**Nancy Zaarour et al. 2011**) et (**Seayfan et al. 2016**). Nous avons criblé une banque d'ADNc de rein humain, en utilisant une série de trois fragments chevauchants, correspondant à l'extrémité C cytoplasmique prédite de NKCC2 murin (résidus 661-1095). Ces trois fragments ont été définis et nommés C1-term (résidus 661-768), C2-term (résidus 741-909) et C3-term (résidus 898-1095). Nous avons précédemment identifié quatre protéines d'interaction avec NKCC2 : l'aldolase B, SCAMP2 et STCH, qui interagissent spécifiquement avec la région proximale de l'extrémité C-terminale de NKCC2 (résidus 661-768, extrémité C1), et OS9 qui interagit spécifiquement avec la région proximale de l'extrémité C-NKCC2 (résidus 898-1095, extrémité C3).

En particulier, nous avons montré l'implication de la lectine OS-9, (**Seayfan et al. 2016**). La finalité de notre étude était de mieux comprendre les mécanismes moléculaires qui soutiennent la régulation du transit de NKCC2 dans le RE. Des découvertes récentes impliquent

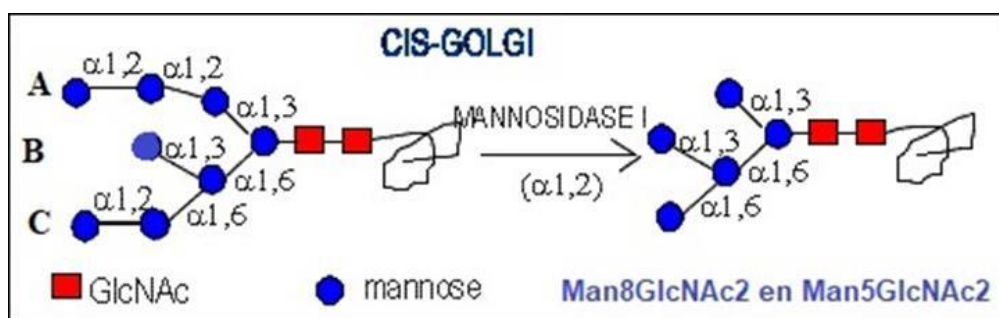
OS9 dans l'ERAD des glycoprotéines mal repliées (**Szathmary et al. 2005**) (**Hosokawa et al. 2009**) (**Satoh et al. 2010**) (**Zhang et al. 2020**), ce qui confirment la relevance de nos résultats. Nous avons aussi démontré le rôle de STCH, protéine chaperonne de stress 70 résidant dans le RE et/ou le cis Golgi, accélère l'ERAD de NKCC2. L'ERAD de NKCC2 induit par STCH implique à la fois le protéasome et les voies du lysosome, (**Bakhos-Douaihy et al. 2021**). La voie de dégradation associée au RE (RE-to-lysosome ou ERLAD) se présente ici comme une autre voie potentielle de dégradation de NKCC2. Il a aussi été démontré qu'un certain nombre de substrats de l'ERAD subissent un cycle vésiculaire à travers les compartiments précoces du Golgi, et que les trois 1,2-mannosidases traditionnelles de mammifères localisées dans le Golgi (IA, IB et IC) contribuent à la dégradation intracellulaire des glycoprotéines mal repliées. Ces résultats suggèrent une implication possible des mannosidases golgiennes dans l'ERAD de NKCC2.

La technique du double hybride a permis d'identifier à partir de la région proximale de la terminaison C1 de NKCC2 (résidus 661-768) des clones positifs dont le numéro 34 correspond à la séquence d'ADNc de la mannosidase, alpha, classe 1A, membre 1 (ManIA). La ManIA se présente donc comme une nouvelle protéine interagissant avec la partie cytosolique C-terminale de NKCC2 dans la levure.

A l'image des protéines de la famille HSP et OS-9 (**Hosokawa et al. 2009**), (**Szathmary et al. 2005**), les alpha-Mannosidases (**Pan et al. 2011**), (**Pan, Cheng, et Sifers 2013**) semblent être également impliqués dans le contrôle de la qualité des protéines et ainsi dans le système ERAD.

LA PROTEINE MANNOSYL-OLIGOSACCHARIDE 1,2-ALPHA-MANNOSIDASE IA (ManIA)

L'enzyme mannosidase alpha 1-2 1A1 golgienne ou Man9-mannosidase (ManIA) a été initialement purifiée et caractérisée à partir d'un Golgi de foie de rat, (**Tabas et Kornfeld 1979**). La protéine codée par cet ADNc est une hydrolase dont le nom systématique est 2-alpha-mannosyl-oligosaccharide alpha-D-mannohydrolase et hydrolyse les résidus alpha-D-mannose terminaux 1,2-liés dans l'oligosaccharide, oligo-mannose Man9 (GlcNAc) 2. Elle est impliquée dans la synthèse des glycoprotéines et on pense qu'elle se trouve, en particulier, au niveau du cis Golgi où elle participe à la modification post-traductionnelle des protéines

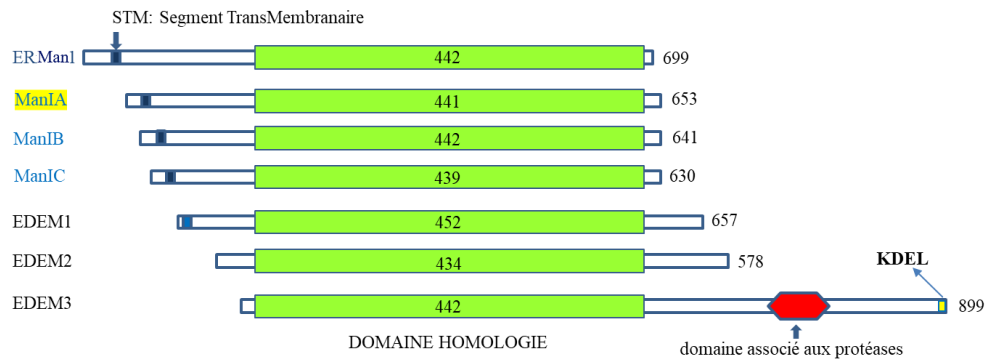


(Figure 22).

Figure 22 : schéma de la réaction catalysée par la mannosidase alpha 1-2 1A1 (modifié d'après

une figure de Emilia Zmuda-Trzebiatowska, **Glycosylation 1997**)

<http://www.cryst.bbk.ac.uk/pps97/assignments/projects/emilia/Start!!!.htm>



La classe 1 alpha 1,2 mannosidase (ManIA) fait partie de la famille 47 (CAZy) glycosylhydrolase (GH47) (Herscovics 2001) (Coutinho et al. 2003). Les α 1,2-mannosidases possèdent un rôle essentiel dans la maturation des N-glycanes des mammifères. La caractérisation des gènes et des ADNc codant pour les α 1,2-mannosidases de différentes espèces a révélé l'existence d'une famille de protéines apparentées conservées au cours de l'évolution eucaryote. Cette famille comprend trois sous familles. La première contient une seule forme de mannosidase RE mannosidase I, *MAN1B1* (ERMan1) qui clive le résidu α 1,2-Man de la branche B centrale dont l'équivalent est MnS1p chez *Saccharomyces cerevisiae*. La deuxième comprend trois enzymes liées : appelées Golgi α -mannosidase IA, *MANIA1* (ManIA), Golgi α -mannosidase IB, *MANIA2* (ManIB), et Golgi α -mannosidase IC, *MANIC1* (ManIC). Les trois enzymes golgiennes clivent aussi le résidu α 1,2-Man positionné sur la branche B. Une troisième sous famille contient trois paralogues : les ER degradation-enhancing alpha-mannosidase-like, EDEM protéines (EDEM1, EDEM2, et EDEM3) (Moremen 2014) (Figure 23).

Figure 23 : **Présentation des trois sous familles de la famille GH47.**

Représentation schématique des membres de la famille GH47 (humain). La famille GH47 comprend trois sous-familles de protéines, dont l'ER α 1,2mannosidase I, une collection de mannosidases alpha 1,2 du Golgi (Golgi ManIA, IB et IC) et trois protéines EDEM (EDEM1, EDEM2 et EDEM3). Le domaine d'homologie mannosidase conservé est en vert. EDEM3 contient un domaine associé aux protéases (rouge) et le signal de rétention KDEL. Les régions transmembranaires de la mannosidase ERmanI, et de Golgi ManIA, IB et IC sont représentées en bleu foncé. La région transmembranaire putative d'EDEM1 est indiquée en bleu clair. Modifié d'après (Olivari et Molinari 2007)

Toutes les α -mannosidases GH47 clivent les liaisons α 1,2-Man. Cependant aucune démonstration directe de l'activité de clivage des glycanes pour les protéines EDEM n'a été démontrée. Les enzymes GH47 clivent peu ou pas du tout les substrats aryl- α -Man et sont inhibées par la 1-désoxymannojirimycine et la kifunensine, mais pas par la swainsonine.

Les hydrolases de la famille GH47 ont besoin de Ca^{2+} pour leur activité catalytique, et l'ion est étroitement lié de sorte qu'une activité significative peut être observée même en l'absence

de Ca^{2+} ajouté. Les chélateurs de calcium EDTA et l'EGTA sont des inhibiteurs puissants de toutes les α -mannosidases de GH47. (Moremen 2014)

Les trois mannosidases golgiennes IA, IB et IC clivent $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ -sn et/ou $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ produisant des produits isomères distincts plus petits, $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$, $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ et $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$. L'ordre de clivage des résidus des trois branches et les mannosidases golgiennes impliquées ne sont pas encore connus (Figure 24).

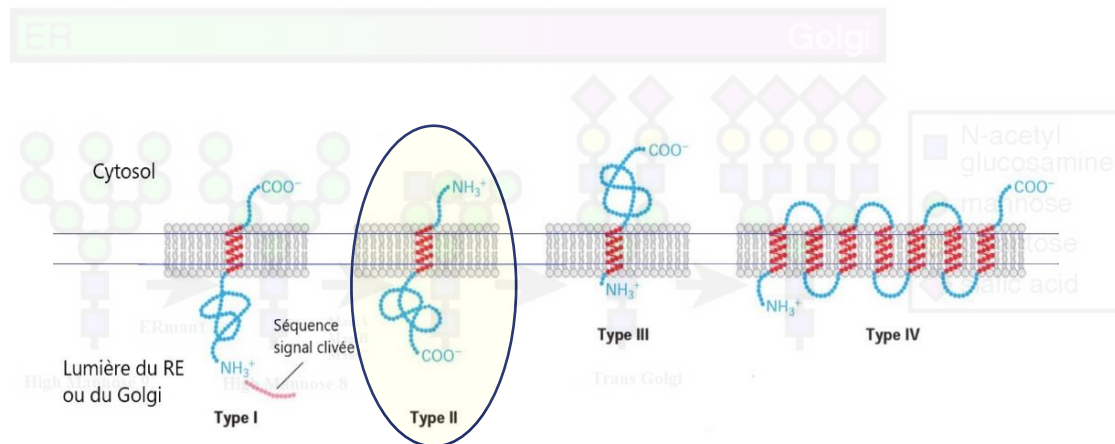


Figure 24 : Schéma de la N-glycosylation par étapes (Yolitz et al. 2018)

La synthèse des N-glycanes commence dans le RE où le complexe oligo-saccharyl-transférase catalyse le transfert de $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ préformé du pyrophosphate de dolichol aux chaînes polypeptidiques naissantes.

Les résidus de glucose sont ensuite éliminés par les α -glucosidases, un processus associé au cycle calnexine/calréticuline qui facilite le repliement des glycoprotéines nouvellement formées dans le RE.

Bien que l'isomère B de $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ soit le principal produit de l' α 1,2-mannosidase du RE humain, une petite quantité de $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ est également produite par l'enzyme recombinante in vitro, comme observé avec l'ER α 1,2-mannosidase de levure.

Figure 25 : Les différents type de protéines transmembranaires.

Les trois α 1,2-mannosidases du Golgi de mammifères de classe I, IA, IB et IC sont des protéines de Type II indiqué dans l'ovale. Modifié d'après **Telser. A PhD, Reviewer.** Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Il n'y a pas d' α 1,2-mannosidase dans le Golgi de *Saccharomyces cerevisiae* et l'activité ERman1 n'est pas nécessaire pour la maturation des N-glycanes. Chez cette espèce, il n'existe qu'une seule α 1,2-mannosidase qui forme principalement l'isomère B de $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ dépourvu du résidu de mannose sur la branche α 1,3 centrale de $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$.

Les trois α 1,2-mannosidases du Golgi de mammifères de classe I, IA, IB et IC ont été clonées. Ce sont des protéines transmembranaires de type II de 71-73kDa avec une courte extrémité cytoplasmique et un long domaine catalytique (Figure 25). Les motifs signature de la classe I

sont présents dans tout le domaine catalytique, mais possèdent des régions N-terminales différentes ([Figure 23](#)). Les trois α 1,2-mannosidases sont codées par des gènes situés sur des chromosomes différents.

Les α 1,2-mannosidases du RE et du Golgi clivent collectivement les résidus de mannose liés à l' α 1,2 du précurseur oligosaccharidique et fournissent ainsi les substrats nécessaires à la formation de N-glycanes hybrides et complexes dans le Golgi des cellules de mammifères. La principale différence entre les trois α 1,2-mannosidases de Golgi est leur expression spécifique aux tissus et aux cellules. Il existe également quelques différences dans l'ordre d'élimination du mannose de Man8-9GlcNAc2.

Le modèle général proposé de la maturation du glycanes est le suivant : l'élagage des mannoses est initié par l'action de ERman1 qui clive un seul résidu α 1,2-Man de la branche B de l'intermédiaire Man9GlcNAc2-Asn, et un clivage supplémentaire a lieu dans le complexe de Golgi par l'action concertée des α -mannosidases IA, IB et IC de Golgi, en fonction des niveaux d'expression relatifs des enzymes respectives dans chaque type de cellule.

Contrairement à ce qui avait été supposé initialement, ERMan1 est probablement localisée de manière prédominante dans le complexe de Golgi plutôt que dans les compartiments sécrétoires antérieurs ([Moremen 2014](#)), ce qui suggère que tous les découpages de l' α 1,2-Man peuvent se produire simultanément dans le Golgi ([Pan et al. 2011](#)). Sa localisation semble aussi controversée dans deux études distinctes. ERMan1 est retrouvée pour une équipe de recherche dans le cis Golgi ([Pan et al. 2011](#)) et interagit avec la sous unité gamma de COP 1 ([Pan, Cheng, et Sifers 2013](#)) alors que pour une autre équipe, elle est exprimée plutôt dans les vésicules du contrôle de qualité (QVCs) ([Ogen-Shtern et al. 2016](#)) et n'est pas retrouvée dans le Golgi. Si le rôle de la ManIA dans la voie de l'ERAD a été décrit, la localisation de la ManIA semble mal définie et son rôle exact dans le contrôle qualité reste à déterminer.

L'ordre de clivage des structures Man9GlcNAc2-Asn ou Man8GlcNAc2-Asn par les α -mannosidases IA, IB et IC du Golgi se chevauche, mais des intermédiaires isomères distincts sont formés ([Herscovics 2001](#)), ([Moremen 2014](#)) indiquant des différences dans la liaison du substrat pour chaque enzyme. Cependant, les trois enzymes du Golgi clivent le résidu α 1,2-Man de la branche B dix fois plus lentement que les autres résidus α 1,2-Man, tandis que ERMan1 clive le résidu de la branche B dix fois plus rapidement que n'importe quelle autre enzyme. Ainsi, les deux mannosidases présentent des spécificités complémentaires et essentiellement non chevauchantes pour le clivage efficace de tous les résidus α 1,2-Man, de l'intermédiaire de transformation Man9GlcNAc2-Asn jusqu'à une structure Man5GlcNAc2-Asn.

La ManIA contient un domaine transmembranaire unique, une région du côté luminal du réticulum endoplasmique non indispensable pour son activité enzymatique appelée domaine de la tige ou « stem domain » supérieure à 100 acides aminés, située entre les domaines transmembranaire et catalytique et une région catalytique luminal du côté C-terminal commune avec les Golgi transférases. ([Moremen 2014](#)) ([Herscovics 2001](#)). La ManIA a été

isolée sous la forme d'un monomère. Des sous-produits protéolytiques ont également été détectés, vraisemblablement par la dégradation du domaine de la tige.

En plus de son activité d'hydrolyse des mannoses et son rôle dans la maturation des protéines membranaires, la ManIA jouerait un rôle dans le contrôle qualité du réticulum endoplasmique (ERQC) et dans la voie de dégradation (ERAD) vers le protéasome des protéines nouvellement synthétisées dans le réticulum endoplasmique, mal repliées et ne pouvant être corrigées. (**Hosokawa et al. 2007**).

A ce jour son rôle exact dans l'ERQC et l'ERAD et sa localisation sont mal définis. S'il existe une mannosidase de mammifère présente apparemment exclusivement au niveau du réticulum endoplasmique ERMan1 qui hydrolyse le mannose 9 en mannose 8 en position B, impliquée lui aussi dans L'ERQC et L'ERAD (**Avezov et al. 2008**) (**Benyair et al. 2014**), Man1A1 jouerait un rôle similaire entre l'interface du réticulum endoplasmique et du golgi. Elle a, en particulier, été retrouvée dans les vésicules du contrôle de qualité (QVCs) (**Ogen-Shtern et al. 2016**).

Aspects biologiques

Les alpha mannosidases de la famille GH47, sont localisées aux premiers compartiments de la voie sécrétoire, à savoir le RE et le complexe Golgien en accord avec leurs rôles respectifs.

Cependant, La localisation des alpha-mannosidases GH47 de mammifères dans le RE ou le complexe de Golgi reste plus controversée (**Pan et al. 2011**). Des premières études sur la maturation des glycanes des mammifères montrent une initiation par l'élimination du mannose dans le RE. Des études sur l'évolution temporelle indiquent que l'élagage du mannose est initié presque immédiatement après le transfert du glycanes précurseur aux polypeptides naissants (**Moremen 2014**). ERman1 était supposée être une enzyme localisée dans le RE. Pourtant, des données d'immunofluorescence indiquent que l'enzyme résiderait principalement dans le Golgi au moins dans les cellules HeLa (**Pan et al. 2011**) et les HEK293 (données non publiées de Moremen).

En revanche, des études immuno-EM (Microscopie Electronique) utilisant des anticorps contre la ManIA indiquent que cette enzyme est localisée dans le RE dans les hépatocytes de porc, dans le Golgi des cellules COS, et des cellules L de souris. (**Moremen 2014**).

Des variations cellulaires et tissulaires de la localisation de la ManIA dans les compartiments Golgien et post-Golgien de la voie de sécrétion ont également été observées dans les tissus de rat. Dans l'appareil reproducteur du rat, les α -mannosidases IA et IB de Golgi ont des profils d'expression cellulaire différents et, même dans les mêmes cellules, la ManIA se trouve dans les saccules trans du complexe de Golgi alors que la Man IB est concentrée dans les saccules cis (**Moremen 2014**).

La localisation de l'enzyme dans le complexe Golgien remet en question le compartiment intracellulaire où l'ERAD est initié et la dynamique de transport nécessaire à l'exécution du

processus d'ERAD. En revanche, les protéines EDEM semblent être exclusivement localisées dans la lumière du RE où il a été proposé qu'elles agissent après ERman1 dans la création du signal nécessaire à l'ERAD (**Moremen 2014**).

Enfin, plusieurs études suggèrent qu'un compartiment unique entre le RE et le Golgi joue un rôle dans l'élimination des protéines mal repliées (compartiment de contrôle de la qualité du RE, ERQC) (**Leitman et al. 2013**) La dynamique du transport des protéines substrats mal repliées et les enzymes de clivage du mannose qui sont impliquées dans le processus restent non résolues.

OBJECTIFS

Les mêmes approches expérimentales, déjà décrites dans nos travaux précédents ont été utilisées afin d'étudier l'effet des interactions de l' α -1,2 Mannosidase IA, sur la maturation de la protéine NKCC2.

Nous avons émis l'hypothèse que la ManIA participerait à la dégradation des protéines NKCC2 mal repliées par le système ERAD, lors de leurs synthèses en agissant au niveau du réticulum endoplasmique et/ou du cis golgi par la rétrogradation de celles-ci vers les vésicules du contrôle qualité et/ ou du RE.

Les études ont été réalisées *in vitro* en culture cellulaire monocouche, sur deux modèles de cellules : une lignée de cellules rénales d'opossum sensible à la PTH, les OKP, et une lignée humaine embryonnaire rénale, les HEK293.

En premier lieu, il s'agissait de confirmer l'interaction de la ManIA dans les cellules de mammifères puisque le crible double hybride a été réalisé dans des cellules eucaryotes type levure, afin de confirmer la relevance de l'interaction trouvée dans un système proche de la physiologie cellulaire humaine.

Par immunocytochimie, la localisation du cotransporteur NKCC2 a été vérifiée dans le, ou les compartiments cellulaires où se trouve la ManIA et l'interaction de la ManIA avec NKCC2 a été mise en évidence.

L'effet de la ManIA de souris, étiquetée V5 en C-terminal, sur NKCC2 de souris, étiquetée myc en N-terminal, a été constaté par deux approches complémentaires. Une approche par augmentation du niveau de synthèse des deux protéines, grâce à deux plasmides recombinant codant pour les deux protéines, au sein des systèmes d'expression choisis. Une autre par la diminution de l'expression du gène codant pour la ManIA (si RNA).

L'inhibition de l'activité enzymatique des mannosidases a été étudiée et il a été déterminé si celle-ci est impliquée dans les effets de la ManIA sur NKCC2.

Enfin, l'effet de la ManIA a été testé sur des mutants de NKCC2 impliqués dans le syndrome de Bartter de type 1.

METHODES

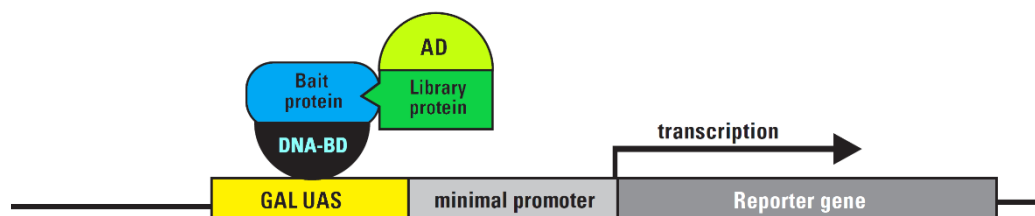
Test du double hybride dans la levure

Principe de la technique du double hybride GAL4.

Une protéine nommée GAL4 est constituée de deux domaines : un domaine de liaison à l'ADN, BD, pour DNA binding domain, et un domaine dit d'activation AD. Les séquences nucléotidiques de ces deux domaines sont séparées et insérées dans deux vecteurs différents. Ainsi le vecteur pGBKT7-BD sur lequel est ajouté un site de multiclonaage pouvant contenir n'importe quelle séquence nucléotidique peut synthétiser dans la levure AH109 une protéine chimère contenant le domaine de liaison de GAL4. Le domaine d'activation est quant à lui inséré dans un vecteur nommé pACT2 et de la même façon un site multiclonaage est ajouté à la partie activatrice de GAL4. La protéine chimère contenant le domaine d'activation Gal4 peut ainsi être synthétisé dans les levures Y187.

Les levures ainsi transformées avec leur vecteurs respectifs sont matés (mating), c'est à dire que les deux souches de levures fusionnent et continuent de croître. Les deux vecteurs synthétisent deux protéines chimères contenues dans la levure hybride et si les séquences nucléotidiques codent pour des protéines ou parties de protéines qui interagissent entre elles, la protéine Gal 4 est reconstituée, reconnaît son site de liaison à l'ADN et peut activer un gène ou des gènes rapporteurs contenus dans les levures ([Figure 26](#))

Dans le système Matchmaker 3, un gène appât est exprimé par fusion au domaine de liaison à l'ADN GAL4 (DNA-BD), tandis qu'un autre gène ou un ADNc (ADN complémentaire provenant d'une banque d'ADNC par exemple) est fusionné au domaine d'activation GAL4 (AD) ([Fields & Song, 1989](#) ; [Chien et al., 1991](#)). Lorsque les protéines de fusion de l'appât et de la bibliothèque interagissent, l'DNA-BD et l'AD reconstituent une protéine entière et le facteur de transcription ainsi reconstitué provoque la transcription de quatre gènes rapporteurs ([Figure 26](#)). Cette technologie peut être utilisée pour identifier de nouvelles interactions



protéiques, confirmer des interactions suspectées et définir des domaines d'interaction.

Figure 26 : Le principe du double hybride

Le DNA-BD correspond aux acides aminés 1 à 147 de la protéine GAL4 de levure, qui se lie au GAL UAS en amont des gènes rapporteurs. L'AD correspond aux acides aminés 768-881 de la protéine GAL4 et fonctionne comme un activateur de transcription. Extrait de Matchmaker™ GAL4 Système bi-hybride 3 (bait : appât, library : banque. Reporter : rapporteur)

Utilisation au laboratoire

Le criblage double hybride dans la levure a été effectué comme suit : en bref, le fragment d'ADNc codant pour la région distale de l'extrémité NKCC2 C-terminale a été placé dans le cadre de lecture avec le domaine de liaison à l'ADN GAL4 dans le vecteur pGBKT7-BD et transformé dans la souche de levure AH109. AH109 exprimant l'appât (Figure 30) a ensuite été couplé à la souche de levure Y187 prétransformée avec une banque d'ADNc de rein humain construite dans le vecteur pACT2-AD. Les cellules de levure accouplées ont d'abord été cultivées sur des boîtes de sélection à faible stringence (-Leu, -Trp, -His), puis sur des boîtes de sélection à forte stringence (-Leu, -Trp, -His, -Ade) (Figure 26). Les levures sont exigeantes pour certains acides aminés sans lesquelles elles ne peuvent pas se développer : -Leu (Leucine) (Figure 27, bleu) sélectionne les AH 109 contenant pGBKT7 ; -Trp (tryptophane) (Figure 27, vert) sélectionne les Y187 contenant pACT. L'interaction est sélectionnée par la reconstruction de la protéine GAL 4 (Figure 27).




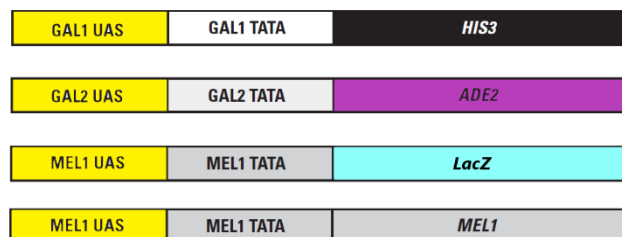
Strain	SD/-Ade	SD/-Met	SD/-Trp	SD/-Leu	SD/-His	SD/-Ura	YPDA
AH109		+				+	+
Y187		-				+	+

Figure 27 : phénotype des levures AH 109 et Y187

Le milieu standard SD est dépourvu des acides aminés citées : Adénine (Ade), Méthionine (Met), Tryptophane (Trp) Leucine (Leu), Histidine (His). AH 109 pousse en absence de la méthionine. YPDA milieu complet. (+) : pousse (-) : ne pousse pas.

AH109 Constructs



Y187 Constructs



Figure 28 : les différents gènes rapporteurs des souches de levure AH109 et Y187

Les levures sont cultivées en absence de His (histidine), ADE (Adénine). MEL 1 est un gène endogène sensible à GAL4.

Les gènes rapporteurs HIS3, ADE2, et MEL1/lacZ sont sous le contrôle de trois éléments UAS et promoteurs complètement hétérologues et sensibles à GAL4. MEL1 est une enzyme alpha-galactosidase (EC 3.2.1.22). Lac Z est une beta galactosidase. GAL2 TATA : TATA box du promoteur minimal permettant la transcription du gène en présence de GAL4 reconstitué. Constructs : constructions.

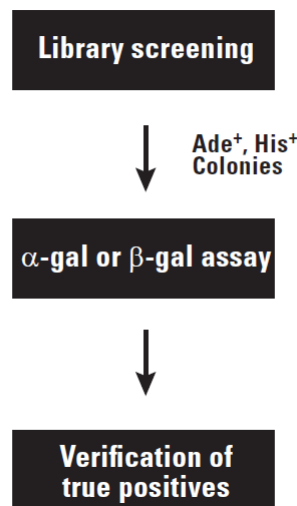


Figure 29 : Étapes générales résumées du double hybride. True positives ; vrais positifs. Library screening : Analyse de la bibliothèque. Assay : test.

Les colonies ont été testées pour l'activité β-galactosidase, et l'ADN des clones positifs codant pour les protéines putatives interagissant ont été isolés des cellules de levure en utilisant le kit d'isolement du plasmide de levure RPM (BIO 101 Systems). Les plasmides d'intérêt ont été amplifiés par transformation dans des bactéries DH5α (Invitrogen) et isolés à l'aide d'un kit Qiagen. Les tailles des inserts ont été vérifiées par digestion par BGL II. Les plasmides d'ADNc ont ensuite été séquencés et évalués à l'aide du programme BLAST(Figure 29).

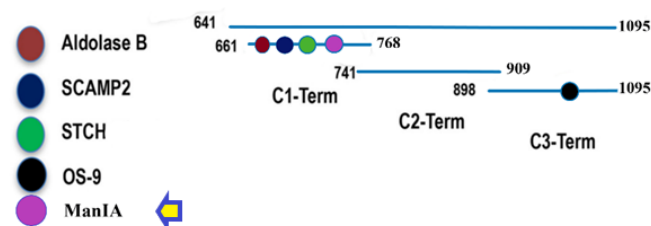


Figure 30 : les trois appâts C1, C2, C3 de la partie C-terminal cytosolique de NKCC2 utilisés pour le double hybride

La partie C-terminale (641-1095 aa) étant très longue, nous avons construit trois vecteurs pGBKT7 contenant trois parties chevauchantes nommées C1-term, C2-term et C3-term.

Pour vérifier la spécificité de l'interaction entre la ManIA et le domaine C1-term de NKCC2, des levures AH109 ont été co-transformées avec la ManIA et NKCC2 C1-term (résidus 661-

768). Contrairement à OS9, aucune croissance n'a été observée lorsque les cellules de levure AH109 ont été transformées avec la ManIA et la région distale de l'extrémité C3-term de NKCC2 (données non montrées), ce qui indique que l'interaction du co-transporteur avec la ManIA est spécifique à la région proximale de l'extrémité C1 terminale de NKCC2 ([Figure 30](#)).

Constructions de plasmides et mutagenèse dirigée

L'ADNc codant le transporteur NKCC2 1095 acides aminés de type F de souris ont été fusionnés à l'extrémité N-terminale de Myc (Myc-NKCC2) (GenBank : AAC52633.1, GenBank: U20975.1, 05-Juillet-1996), en utilisant pCMV-myc (Clontech) ou pTarget (Promega) pour les mutants Y998X et A508T ([Annexe2](#)).

La séquence codante de la ManIA de souris (séquence NCBI Reference: NM_008548.4) a été sous-clonée dans le vecteur d'expression pcDNA3.1/V5-TOPO ([Annexe3](#)) de mammifère. La séquence codante de l'ARN messager a été introduite avec sa séquence kozak.

La construction *Cytox*, correspondant à la délétion de la partie cytoplasmique de NKCC2 a été modifiée par PCR et la construction *Catax*, correspondant à la délétion de la partie catalytique de la ManIA a été réalisées en utilisant le système de mutagenèse dirigée Quick Change (Stratagene) à partir de la construction la ManIA-V5 décrite ci-dessus. Les séquences des primers utilisés pour la PCR et la mutagenèse dirigée sont indiqués ci-dessous. Toutes les mutations ont été confirmées par séquençage complet.

Primers pour supprimer la partie cytoplasmique Cytox :

Sens : 5'CCGGAGCGATGAAGTTCGTGCTGCTGC3'

Reverse : 5'TTTCTCTTTGCCATCAATTTTC 3'

Primers pour supprimer la partie catalytique Catax :

Sens : 5' GAGGGCAAAGATCAAAGAGTAGATGACCCATGCTTGGGAAT 3'

Reverse : 5' ATTCCAAGCATGGGTCATCTACTCTTTGATCTTTGCCCTC 3'

Pour l'étude du DMG (Double Mutant Glycosylé) versus NKCC2, la séquence codante de souris 1090 acides aminés (aa) a été utilisée. NCBI Reference Séquence : NM_001079690.2, NP_001073158n, CCDS: CCDS50694.1 La séquence a été référencée au 26 juin 2021.

La protéine 1090 aa est une autre possibilité de séquence pour NKCC2 de souris où cinq acides aminés sont manquant du côté N-terminal. La 1095 aa est la première séquence proposée par Gérardo Gamba en 2005.

Pour l'immunocytochimie le plasmide pEGFP-C2 (Clontech) qui contient le gène de la protéine fluorescente verte (EGFP), un site de multiclonaage (MCS) et un gène de résistance kanamycine a été utilisé 4 ([Annexe3](#)). La séquence 1090 acides aminés (aa) de souris y est inséré. La protéine EGFP ne change pas la localisation de NKCC2 (résultats non montrés) en comparaison de la protéine 1090 aa tagué myc.

Les mutants, DMG, Y998X et A508T ont été obtenu par mutagénèse dirigé (Stratagene). Pour le DMG, les deux sites de glycosylation Asn-442 et Asn-452 ont été remplacé par une Glutamine (N442Q, N452Q). Ces trois mutants ont été construits précédemment dans le groupe. (**Benziame et al. 2007**) (**Seaayfan et al. 2016**)

Primers pour le DMG

Sens : 5'GATGCCACTGGCAGCATGCAAGACACCATCGTTTC 3'

Sens : 5' ATGAATTGCCAAGGCTCTGCGGCCTG 3'

Les mutants Y998X et A508T ont été générés avec la méthode Stratagene (**N. Zaarour et al. 2009**) (**Bakhos-Douaihy et al. 2021**) (**Shaukat et al. 2021**)

Tous les primers ont été dessinés pour les mutagénèses dirigées de façon à obtenir une température d'annealing supérieur ou égale à 78 °C, selon les recommandations du protocole de Stratagene.

Construction du vecteur codant pour la ManIA.

L'ADNc de souris fœtale a été utilisé pour la PCR, généré et gracieusement donné par le Docteur Mélanie Viltard. La PCR a été réalisée en gradient de température pour une meilleure efficacité, les deux primers n'ayant pas la même température d'annealing (hybridation).

Protocole	PCR en gradient de 45 à 52°C
H2O	38µl
Tampon PCR 10x	5µl
MgCl ₂ 50mM	1.5µl
dNTP 10mM	1µl
Primer Sens	1µl
Primer reverse	1µl
Taq polymérase	0.25µl
Taq haute-fidélité	0.25µl
QSP	50µl

Primers pour la PCR de la ManIA :

Sens : 5' CTA CAA CCT CCG GAG CGA tg 3'

Reverse : 5' TTT CTC TTT GCC ATC AAT TTC 3'

Insertion dans le plasmide pcDNA3.1 / V5 TOPO

1. 2 µl de la réaction de clonage TOPO® a été ajouté dans un tube de One Shot® TOP10 d'Escherichia coli compétentes.

2. le mélange a été incubé sur la glace pendant 15 minutes.
3. Le choc thermique des cellules a été réalisé pendant 30 secondes à 42°C sans agitation.
4. Les bactéries ont été transférées immédiatement sur la glace.
5. 250 µl de milieu SOC ont été ajoutés à température ambiante.
6. Le tube a été incubé horizontalement à 200 rpm, 37°C pendant 1 heure.
7. 200 µl de la transformation a été étalé sur une gélose LB plus ampicilline 50µg/ml préchauffée et incubé pendant la nuit à 37°C.

Les colonies ont été sélectionnées, amplifiées la nuit à 37°C en milieu liquide Luria Broth plus Ampicilline 50µg/ml sous agitation et les plasmides purifiées avec un KIT Gibco de minipreps

(GeneJET Plasmid Miniprep Kit, référence K0503).

Culture cellulaire

Deux lignées cellulaires rénales ont été utilisées en culture monocouche sur plastique traité pour culture cellulaire.

Les cellules rénales d'Opossum (cellules OKP)

Les cellules OKP (Opossum Kidney sensible à la PTH) (**Cole et al. 1989**), (**Koyama et al. 1978**) sont cultivées dans du DMEM référence 42430 Gibco additionné de 10% de sérum de veau fœtal (Invitrogen USA ou Eurobio Amérique du Sud), de pénicilline (100 U / ml) et de streptomycine (100 U / ml) à 37 °C dans une atmosphère humidifiée à 5%. CO₂.

Les cellules sont repiquées par action de la trypsine 0,25% (Invitrogen), 3 minutes à 37°C. La trypsine est neutralisée par ajout de 10ml de milieu complet puis éliminée par centrifugation. Les cellules sont réensemencées en flasques 75cm² Falcon à raison de 1ml pour 10ml de milieu complet. L'ensemencement en B40 ou BP60 (boîtes de 40mm ou 60 mm de diamètre) se fait à une concentration de 1million ou 2 millions de cellules par boîte respectivement.

Les cellules de rein d'embryon humain (HEK 293)

Les cellules HEK 293 (**Graham et al. 1977**) sont maintenues dans un milieu DMEM (référence 61965 Gibco) supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal (Invitrogen USA ou Eurobio Amérique du sud), de pénicilline (100 U / ml) et de streptomycine (100 U / ml) à 37 °C dans une atmosphère humidifiée à 5%. CO₂. Les cellules sont repiquées par action de la trypsine 0,05% Invitrogen, 3 minutes à 37°C. La trypsine est neutralisée par ajout de 10ml de milieu complet puis éliminée par centrifugation. Les cellules sont réensemencées en flasques de 75cm² Falcon à raison de 1ml pour 50ml de milieu complet. L'ensemencement en B40 (boîtes de 40mm) se fait à une concentration de 2 ml à une dilution de 1/50 d'un flasque de

cellules à 80% de confluence par B40, le double pour les B60. Les boîtes de culture en plastique sont préalablement traitées à la polylysine (Sigma P4707).

Transfections

Les cellules ont été cultivées jusqu'à de 60 à 70% de confluence sur des boîtes de culture en plastique, puis ont été transfectées de manière transitoire pendant 5 heures avec des plasmides en utilisant le kit Lipofectamine 3000 conformément aux instructions du fabricant (Invitrogen).

Protocole :

	DNA ng	DNA µl	Optimem µl	Plus reagent µl	Optimem µl	Lipofectamine µl
Par B40	500	X	95-X	5	95	5
Par B60	1000	X	240-X	10	240	10
	Mélange 1 : 15 minutes à TA (température ambiante)				Mélange 2 : 15 minutes à TA	
Milieu réactionnel	Mélange1 plus Mélange 2 vortex bref, 15 minutes					
Transfection	Ajouter 200µl du mélange 1,2 à 800µl d'optimem 1 par B40 ou 500µl du mélange 1,2 à 1,5 ml par B60					

Les cellules sont lavées deux fois avec du milieu optimem1 (Invitrogen) avant la mise en présence du mélange. 5 heures après la transfection est stoppée par aspiration du milieu réactionnel, et les cellules sont remises en milieu complet.

Knockdown par siRNA

Les siRNA pour la ManIA ont été achetés auprès de Dharmacon sous la forme de pools ON-TARGET plus SMART, (référence humain L-012174-00-0005). Les cellules HEK sont d'abord transfectées avec les siRNA spécifiques à l'aide de la Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen P/N 56531) en suivant les spécifications du fabricant pour la transfection inverse.

Protocole :

Jour 1 : Réalisation de la transfection réverse du SiRNA :

Le mélange siRNA plus RNAiMAX lipofectamine est réalisé dans les boites B40 à température ambiante en présence de milieu Optimem 1. Après 15 minutes d'incubation, les cellules préalablement trypsinées, centrifugées et remises en suspension en présence de milieu complet sans antibiotique, sont distribuées sur le mélange Optimem/siRNA/Lipofectamine.

	Sirna µl	Qsp µl optimem	RNAI MAX lipofectamine µl
Par B40 mélange dans le fond de la boîte à (TA)	X	500	5
Les cellules sont ensemencées sur le mélange.			

Jour 2 : Réalisation de la transfection du DNA.

14 heures après la transfection du Si RNA, le milieu est retiré, et les cellules sont mises en milieu complet sans antibiotique, deux heures minimum avant la transfection du DNA. Après deux heures les cellules sont transfectées avec les plasmides correspondants.

	DNA ng	DNA μ l	Optimem μ l	Plus reagent μ l	Optimem μ l	Lipofectamine μ l
Par B40	x	X	95-X	5	95	5
	Mélange 1 : 15 minutes				Mélange 2 : 15 minutes	
Milieu réactionnel	Mélange1 plus Mélange 2 vortex bref, 15 minutes					
Transfection	200 μ l du mélange 1,2 sur 800 μ l d'optimem 1 par B40					

24 à 48 heures après la transfection, les lysats cellulaires sont analysés en western blot pour chaque protéine en utilisant les anticorps appropriés (voir tableau page 63).

Traitements des cellules

Pour les tests avec l'inhibiteur pharmacologique de la ManIA, les cellules transfectées de manière transitoire ont été traitées avec de la **kifunensine à 25 μ M** (sigma, référence k1140), pendant 6 heures avant la lyse cellulaire. Les cellules OKP ont été traitées 48 heures après transfection. Les cellules HEK ont été traitées 24 heures après transfactions.

Pour les expériences d'inhibition de la dégradation des protéines, les cellules ont été traitées le lendemain de la transfection transitoire avec du **MG132 à 2 μ M** (Sigma M7449) ou de la **chloroquine à 100 μ M** (Sigma C6628) 6 heures avant la lyse des cellules.

Tests à la cycloheximide

La **cycloheximide** (Sigma C4859) est utilisée à la concentration de **100 μ M** pour les deux lignées cellulaires. Pour le test à la cycloheximide la transfection se fait sur la nuit. Fourteen heures post transfection les cellules sont traitées à la cycloheximide. Les lysats sont collectés à 0, 1, 2, et 4 h.

Analyse par immunoblot.

Quarante-huit heures après la transfection pour les OKP ou 24 heures pour les HEK293, , les cellules ont été lavées 3 fois avec du PBS froid et lysées dans 0,2ml (B40) ou 0,5ml (B60) de tampon de lyse (Tris / Cl 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, 1% (v / v) Triton X-100, contenant des inhibiteurs de protéase sans EDTA (Thermo Scientific- Pierce A32955). Les échantillons ont été récoltés, incubés une heure à 4°C sous rotation. Les échantillons sont ensuite passés à l'aiguille 25G 5 fois en aller-retour puis centrifugés à 16 000 rcf pendant 15 min à 4°C. Les surnageants sont récupérés et les taux des protéines ont été évalués par la méthode de Bradford. Après normalisation, les échantillons de protéines sont dénaturés par dénaturation à 95°C dans du tampon de charge, et séparés sur gels à 7,5% de SDS-

Polyacrylamide, transférés sur membrane de cellulose et immunoblotés avec les anticorps primaires adéquats, lavés et marqués avec des anticorps secondaires correspondants, conjugués à la peroxydase, conformément aux procédures standard. Les protéines ont été visualisées par détection améliorée par chimioluminescence (PerkinElmer Life Sciences ou ThermoFisher) conformément aux instructions du fabricant.

Immunoprécipitation.

Les cellules sont solubilisées avec un tampon de lyse contenant 0,4 M de NaCl ; 1,5 mM de MgCl₂; Hepes 10 mM, pH 7,9; 5% (v / v) de glycérol; 0,5% (v / v) Nonidet P-40) et des inhibiteurs de protéase sans EDTA (Complete, Roche Diagnostics ou Pierce A32955). Elles sont ensuite incubées sous rotation à 4°C et le passage à l'aiguille n'est pas réalisé afin de préserver le plus possible les interactions.

L'immunoprécipitation est réalisée en utilisant l'anticorps primaire d'intérêt incubé préalablement avec des billes de protéine G-agarose (Dyna, 10004D) pendant 40 minutes à température ambiante avec une rotation douce, puis lavée avec du tampon phosphate contenant 0,01% de tween, suivi d'une incubation des protéines pendant 1 h à température ambiante avec rotation douce. Après incubation, l'immunocomplexe est lavé trois fois dans du PBS 1x (Invitrogen). Les billes contenant les anticorps et les protéines sont éluées par dénaturation à 95°C dans du tampon de charge. Les surnageants sont récupérés et traités en immunoblot.

Immunocytochimie

24 ou 48 heures après la transfection, les cellules confluentes sont lavées deux fois avec du PBS ++ (pH 7, MgCl₂ 1 mM et CaCl₂ 0,1 mM). Les cellules sont ensuite fixées avec du paraformaldéhyde à 2% dans du PBS pendant 20 min à température ambiante, incubées avec du NH₄Cl 50 mM, perméabilisées avec du Triton X-100 à 0,1% pendant 1 min et incubées avec du tampon de dilution (DAKO, S3022) pendant 30 min pour bloquer les liaisons non spécifiques. Les cellules sont ensuite incubées pendant 1 heure à la température ambiante avec les anticorps primaires à une dilution appropriée diluées dans du tampon de dilution (DAKO, S3022). Les cellules sont alors lavées trois fois cinq minutes avec du PBS. Elles sont ensuite mises en présence des anticorps secondaires couplés approprié pendant une heure à température ambiante. Les cellules sont ensuite lavées trois fois 5 minutes avec du PBS et montées en Vectashield. Les lames sont lutées avec du vernis et conservées à 4°C.

Anticorps

Anticorps secondaires	Fournisseurs	Immunofluorescence	Western blot
Alexa Fluor 555 goat anti-rabbit	A21428. Invitrogen	1/500	
Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit	A11008. Invitrogen	1/500	
Alexa Fluor 555 goat anti-rat	A21434. Invitrogen	1/500	
Alexa Fluor 488 goat anti-rat	A11006. Invitrogen	1/500	
Anti-rabbit Fitc	F0250 Dako	1/200	
Texas red x goat anti-mouse	T6390. Invitrogen	1/200	
Texas Red anti-mouse	115-075-003 Jackson	1/200	
Alexa Fluor 647 chicken anti-mouse	A21463. Invitrogen	1/500	
Anti-Mouse HRP	170-6515 Biorad		1/10 000
Anti-Rabbit HRP	170-6515 Biorad		1/10 000

Anticorps primaires	Fournisseurs	Immunofluorescence	Western blot
Anti V5 mouse	46-0705 Invitrogen	1/200	1/50 000
Anti V5 rat	ab206571 Abcam	1/200	
Anti Myc	631206 Takara (Clontech)	1/100	1/1500
Anti Calnexine rabbit	ab22595 Abcam	1/100	
Anti Giantine rabbit	ab80864 Abcam	1/100	
Anti GM130 rabbit	ab52649 Abcam	1/100	
Anti-ManIA rabbit	ab140613 Abcam		1/1000
Anti-ManIA rabbit	M3694 Sigma		1/1000

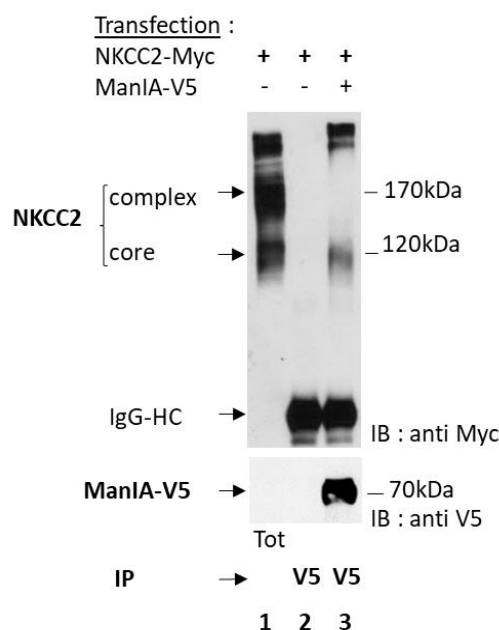
Microscopie confocale

Les images ont été réalisées avec un Zeiss LSM 710 Axio Observer. Les images ont été réalisées avec un objectif 63x/1.40 oil. Le pinhole est ouvert au minimum.

Les graphes représentent l'intensité en fonction d'une distance mesurée arbitrairement et identifiée sur l'image analysée en nm. Les zones sélectionnées pour l'étude de la colocalisation ont été choisies sur des champs où l'intensité de fluorescence n'est pas saturée.

Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM ou \pm SD. Les différences entre les moyennes ont été évaluées selon le cas en utilisant un test t de Student apparié ou non apparié, deux ou une queue (unilatérale ou bilatérale) ou/et un test one way ANOVA ordinaire ou un test RM one way ANOVA. Une valeur $p < 0,05$ est considérée comme statistiquement significative.



RESULTATS

La ManIA interagit avec NKCC2 dans les cellules rénales de mammifères d'opossum in vitro

Afin de mettre en évidence la relevance de l'interaction trouvée chez la levure, dans les cellules de mammifères, nous avons transfecté de manière transitoire le vecteur NKCC2-Myc seul ou en combinaison avec le vecteur codant pour la ManIA taguée V5, dans des cellules d'opossum (OKP). Une immunoprécipitation par les anticorps V5 a été réalisée sur le lysat cellulaire des OKP. Les immunoprécipitats ont été résolus par SDS-PAGE et révélés avec l'anticorps anti-Myc (Figure 31).

Figure 31: La ManIA interagit avec le core glycosylé du cotransporteur NKCC2 dans les OKP Immunoprécipitation.

500 ng/B60 NKCC2-myc sont transfectés de manière transitoire avec ou sans 500 ng/B60 de ManIA-V5 dans des cellules OKP. 48 heures post transfection l'immunoprécipitation est réalisée avec un anticorps anti-V5 et un western blot SDS/page est effectué. Ligne 1, Protéines Totales, dépôt de 4% de lysat total transfecté avec NKCC2-V5, ligne 2 : dépôt de 33% IP V5 sur cellules transfectées NKCC2-myc seul, pour le contrôle négatif et ligne 3 : dépôt de 33% IP V5 sur cellules transfectées NKCC2 et ManIA-V5. IB : ImmunoBlot, HC : chaîne lourde de l'immunoglobuline G, IP : ImmunoPrécipitation. Tot : dépôt des protéines totales du lysat cellulaire. Le western blot montre une interaction de ManIA avec le core glycosylé immature de NKCC2 à 120kDa.

En accord avec nos résultats précédents, lorsque NKCC2 est exprimé de manière exogène dans des cellules rénales en culture, on observe à la fois la forme immature ou core glycosylé, résidant dans le RE et/ou le cis Golgi, et la forme mature, nommé complexe glycosylé. Le core glycosylé de NKCC2, de 120 kDa interagit avec la ManIA dans les cellules OKP ([Figure 24](#) ligne 3). Cette interaction est spécifique puisque nous ne retrouvons pas NKCC2 dans le contrôle négatif immunoprécipité par l'anticorps V5 ([Figure 24](#), ligne 2). Malgré l'expression prédominante de NKCC2 mature et glycosylée dans ces cellules, à 48 heures post transfection, nous n'observons pas d'interaction avec la forme complexe. Cela suggère une localisation de l'interaction, au niveau du réticulum endoplasmique et/ou du cis Golgi, en corrélation avec la localisation de ManIA. De plus, celle-ci semble être spécifique puisque la protéine NKCC2-Myc n'a pas été détectée dans le contrôle négatif.

En résumé, la ManIA interagit avec le core glycosylé immature de NKCC2 dans les cellules de mammifères d'Opossum *in vitro* et les deux protéines s'associent réellement *in vivo*.

Le transporteur NKCC2 colocalise avec la ManIA au niveau cis-golgien dans les cellules OKP

Afin de vérifier la localisation du core glycosylé immature de NKCC2, nous avons réalisé une immunocytochimie et des observations en microscopie confocale sur les cellules OKP. A cette fin, les cellules ont été transfectées avec NKCC2-Myc et la ManIA-V5 afin de mettre en évidence la colocalisation compartimentaire des deux protéines au niveau golgien et au niveau du réticulum endoplasmique, ([Figure 25, 26](#)).

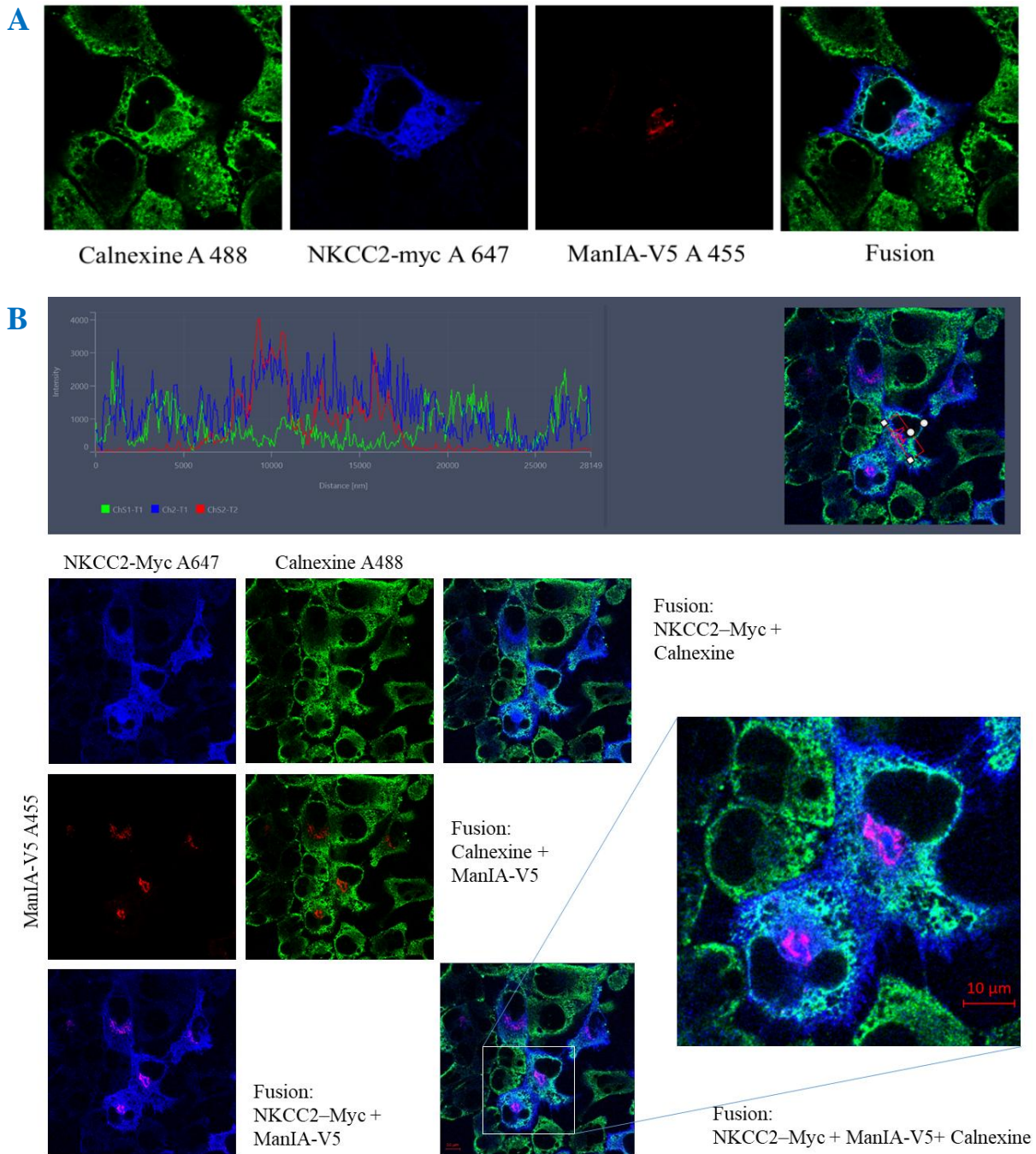
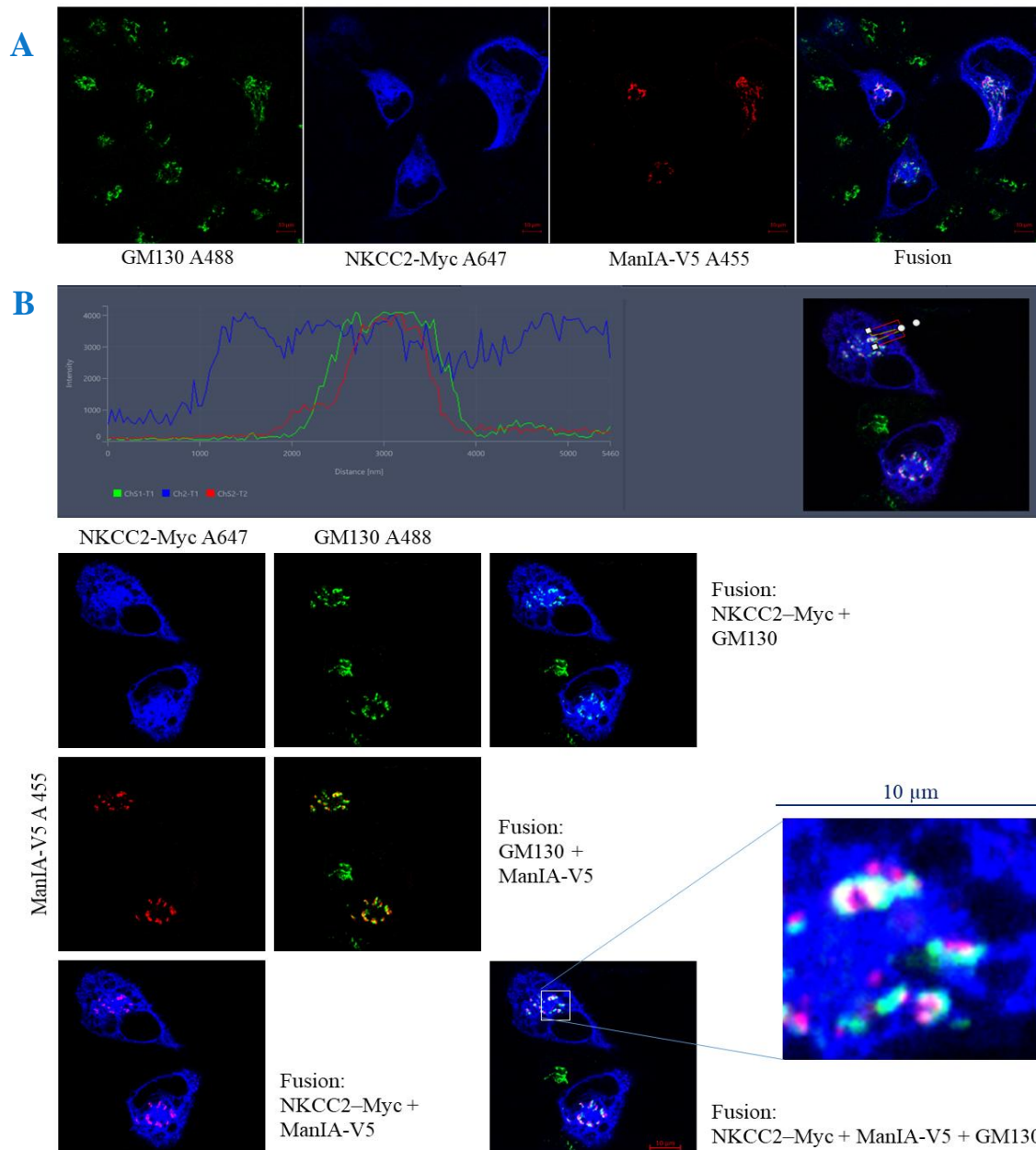


Figure 32: Mise en évidence par microscopie confocale de la distribution de la ManIA et de la colocalisation de la ManIA avec NKCC2 dans les cellules OKP. Triple marquage NKCC2, ManIA, Calnexine (réticulum endoplasmique)

Les Cellules OKP ont été transfectées avec 300ng/B40 de ManIA-V5 et 300ng/ NKCC2-Myc. L'anticorps anti-V5 de souris est reconnu par un fluorochrome anti-Rat rouge A455 et le réticulum endoplasmique (RE) est mis en évidence par l'anti-calnexine de lapin révélé par le fluorochrome vert A488. L'anti-myc de souris, bleu est détecté par un fluorochrome A647. On n'observe pas de couleur jaune qui indiquerait une colocalisation entre la calnexine et la ManIA, ici absente. La couleur Magenta indique une colocalisation entre NKCC2 et la ManIA. La couleur Cyan indique une colocalisation entre la calnexine et NKCC2. Nous n'observons pas de tri-colocalisation entre les trois



protéines, qui serait indiquée par une couleur blanche.

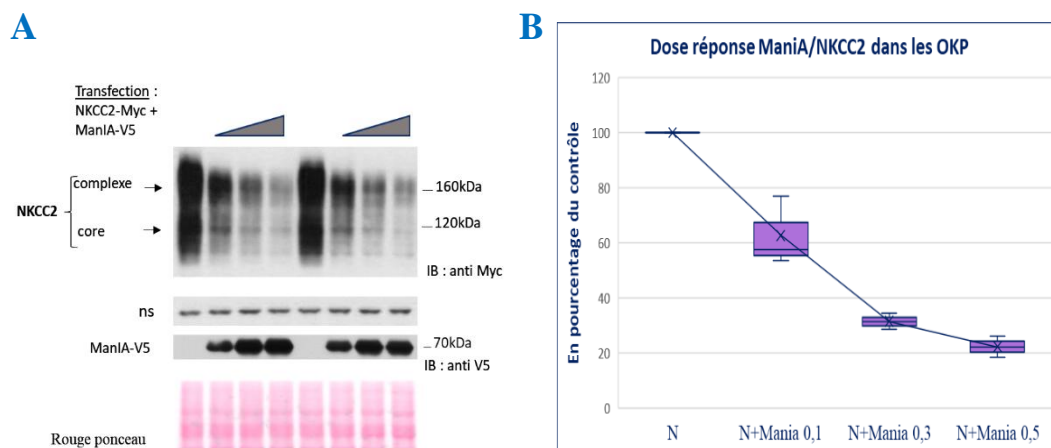
A/ Un exemple de triple localisation. La ManIA n'est localisée pas dans le réticulum endoplasmique.
 B/ Etude de la colocalisation. Un autre champ par rapport à A/. On observe une colocalisation entre NKCC2 et la calnexine représentée sur le graphe et par la couleur Cyan de l'illustration. La ManIA n'est pas localisée dans le réticulum endoplasmique des cellules OKP. Le graphe et la couleur magenta de l'illustration indique une colocalisation entre NKCC2 et la ManIA qui ne se situe pas au niveau du RE. Les barres rouges représentent 5 µm ou 10µm. Les graphes représentent l'intensité des trois fluorochromes le long d'un tracé de 28 µm indiqué dans la photo en insert. Les zones sélectionnées pour l'étude de la colocalisation ont été choisi en fonction de la non-saturation des intensités.

Figure 33 : Mise en évidence par microscopie confocale de la distribution de la ManIA et de la colocalisation de la ManIA avec NKCC2 dans les cellules OKP. Triple marquage NKCC2, ManIA, GM130 (cis Golgi)

La même expérience que précédemment en figure 25 en remplaçant la calnexine par GM130
 A/ Un exemple de triple localisation. La ManIA est localisée dans le compartiment cis-golgien.
 B/ Etude de la colocalisation. On observe une colocalisation entre NKCC2 et GM130 représentée par la couleur Cyan de l'illustration. La couleur blanche met en évidence une tri-colocalisation entre NKCC2, ManIA, et GM130. Les barres rouges représentent 5 µm ou 10µm. Les graphes représentent l'intensité des trois fluorochromes le long d'un tracé de 5 µm indiqué dans la photo en insert.

La ManIA ne colocalise pas avec la calnexine, marqueur du réticulum endoplasmique (Figure 32). Elle colocalise avec GM130 protéine résidente dans le cis-golgi, confirmant des résultats décrits dans la littérature (Moremen 2014), (Figure 33). Le triple marquage NKCC2, ManIA et GM130 montre que NKCC2 colocalise avec la ManIA dans le cis-Golgi des cellules OKP (Figure 33). Cette colocalisation est partielle et on peut émettre l'hypothèse d'une tri-interaction ponctuelle et rapide.

L'ensemble de ces résultats confirment ceux obtenus dans la levure et montre que la forme immature de NKCC2 interagit avec la ManIA au niveau du cis golgi in vitro.



La ManIA diminue la maturation de NKCC2 et la quantité du corps glycosylé dans les cellules OKP

Nous avons cherché à déterminer l'effet de la ManIA sur le taux de NKCC2. A cette fin, une transfection transitoire de NKCC2-Myc avec des doses croissantes de la ManIA-V5 a été réalisée dans des cellules OKP et le taux de NKCC2 a été analysé par Western Blot.

Figure 34: La ManIA diminue le taux de complexe et de core glycosylé de NKCC2 dans les cellules OKP d'une manière dose dépendante.

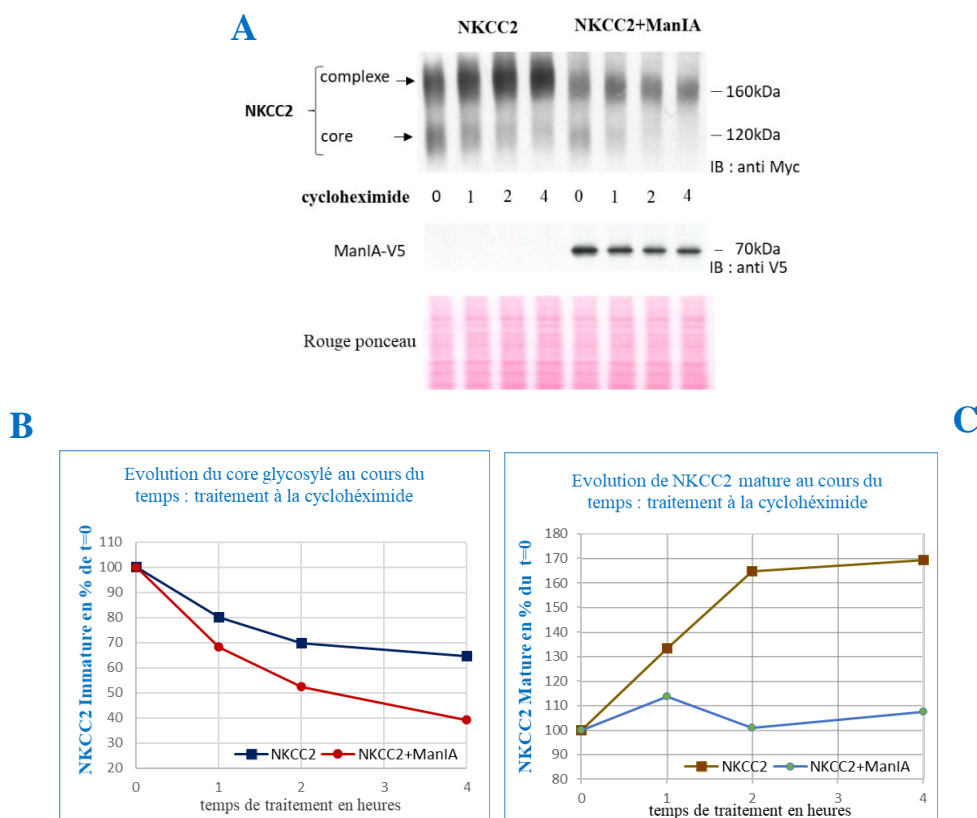
A/Immunoblot de la réponse de NKCC2-Myc par la ManIA-V5 OKP transfectées de façon transitoire par des doses croissantes de ManIA-V5. 100 ng/B40 de NKCC2-myc ont été transfectés avec une dose croissante de ManIA-V5 (100, 300 ou 500 ng/B40). 48 heures après transfection, un western blot a été réalisé. N=3 sauf pour N+ManIA 0,3ng N=2 A/ représente le résultat de l'immunoblot réalisé sur les échantillons. B/Quantification à l'aide d'Image J, du western blot présenté en A, normalisée sur bande

non sp . L'intensité du signal est évaluée en 100% du contrôle transfecté avec NKCC2 seul. Les box plots présentent les points médians reliés, quartile médiane incluse. Moyenne +/- SED d'une expérience réalisée en triplicata indépendant sauf 0,3 duplicata. IB : ImmunoBlot.

Nous observons que, plus les cellules expriment la ManIA, plus le cotransporteur NKCC2 diminue dans sa forme complexe mature, et dans sa forme core glycosylé immature, (Figure 34). Les protéines NKCC2 nouvellement synthétisées in vitro en transfection transitoire passent par le contrôle qualité des protéines ERCQ. Seulement 30% de NKCC2 sont redirigés vers le Golgi. Les protéines définitivement mal repliées sont alors dirigées vers l'ERAD où elles sont dégradées. Ces premiers résultats suggèrent qu'au-delà de son rôle dans la maturation des protéines membranaires, la ManIA serait impliquée dans le contrôle qualité en favorisant celui-ci. Elle serait l'une des protéines chaperonnes impliquées dans la voie de L'ERAD.

La ManIA accélère la dégradation de NKCC2 immature et stabilise sa maturation dans les cellules OKP

Nous avons recherché l'effet propre de la ManIA sur NKCC2 indépendamment de la synthèse du cotransporteur. Pour cela, 14 heures post transfection, nous avons mis les cellules en présence de Cycloheximide, un antifongique connu pour bloquer la synthèse des protéines



chez les eucaryotes, (Figure 35).

Figure 35 : La ManIA limite la maturation de NKCC2 et accélère la diminution de son core glycosylé

A/ immunoblot de NKCC2-Myc en présence ou absence de la ManIA-V5. Les cellules ont été transfectées avec 200 ng/B40 de vecteur NKCC2-Myc en présence ou en absence de 200ng/B40 du vecteur ManIA-V5. 14 heures après la transfection, elles ont été incubées pendant les temps indiqués avec 100µM de cycloheximide. B/ Quantification par image J et normalisation sur le rouge ponceau du core glycosylé (bande inférieure à 120KDa) de l'immunoblot présenté en A (résultat présenté en % du taux à t=0).) En présence de la ManIA le core diminue plus rapidement en fonction du temps par rapport au contrôle sans la ManIA.

C/ Quantification par image J et normalisation sur le rouge ponceau de NKCC2 mature (bande supérieure à 160KDa) (résultat présenté en pourcentage du taux à t=0) . On peut noter une forte diminution de la maturation de NKCC2 et de sa stabilisation en présence de la ManIA, en fonction du temps, par rapport au contrôle. IB : ImmunoBlot.

Le test à la cycloheximide confirme que l'effet de la ManIA sur NKCC2 est indépendant de la synthèse du cotransporteur. En absence de la ManIA la disparition du core glycosylé de NKCC2 en fonction du temps s'accompagne de l'apparition de la forme mature. Au contraire, en présence de la ManIA, on observe une diminution de conversion de la forme immature de NKCC2 en forme mature du cotransporteur par rapport au contrôle (cellules non transfectées avec la ManIA), et une accélération de la diminution du core glycosylé en fonction du temps (Figure 35). Ces deux observations vont dans le sens d'une disparition du core glycosylé NKCC2 en présence de la ManIA non corrélée à la maturation de celui-ci. Ces résultats suggèrent que la ManIA participe à la dégradation de NKCC2.

L'ensemble de ces résultats suggèrent que la ManIA participe à la voie de dégradation de NKCC2 au niveau du cis-Golgi. La ManIA serait impliquée dans la voie de l'ERAD et/ou de la voie de dégradation des protéines associées au golgi via les endosomes (EGAD) et/ou de la voie ER-to-lysosome-associated degradation (ERLAD) de NKCC2 dans les cellules OKP.

La ManIA interagit avec NKCC2 dans des cellules rénales humaines en culture

Le crible double hybride a été réalisé dans la levure avec un ADNc humain codant pour la ManIA humaine et a montré que celle-ci interagit avec la partie C-terminale cytoplasmique de NKCC2 de souris. Il existe 93% d'homologie entre les séquences du cotransporteur NKCC2 humain et de souris et 92% d'homologie entre la ManIA humaine et de souris (Annexe 1). La coimmunoprécipitation dans les cellules OKP a été réalisé entre NKCC2 de souris et la ManIA de souris.

La ManIA montre des effets différents, d'une espèce à l'autre et d'un type cellulaires à l'autre (Moremen 2014). Afin de confirmer les résultats trouvés dans le système double hybride et dans les cellules OKP, nous avons réalisé dans les mêmes conditions et dans des cellules rénales humaines HEK293, une coimmunoprécipitation entre NKCC2 et la ManIA-V5 de souris en surexpression ou la ManIA humaine endogène.

Nous avons transfecté de manière transitoire le vecteur NKCC2-myc, avec ou non le vecteur ManIA-V5. Une immunoprécipitation par les anticorps V5 ou ManIA (Sigma) a été réalisée sur le lysat cellulaire des HEK293, (Figure 36).

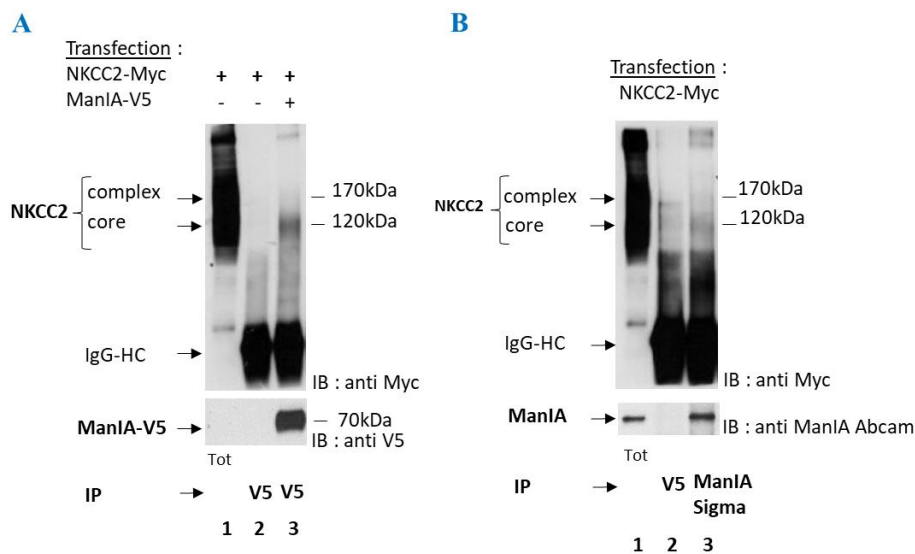


Figure 36 : La ManIA interagit avec le core glycosylé du cotransporteur NKCC2 dans les cellules HEK293 Mise en évidence par co-immunoprécipitation :

A) Immunoprécipitation de la ManIA exogène. 500ng/B60 du vecteur NKCC2-myc sont transfectés de manière transitoire avec ou sans 500ng /B60 du vecteur ManIA-V5 dans des cellules HEK293. 24 heures après la transfection l'immunoprécipitation est réalisée à l'aide d'un anticorps anti-V5, à partir du lysat cellulaire et un western blot est effectué et révélé à l'aide d'anticorps anti-Myc ou anti-V5. Ligne 1, TOT, dépôt de 4% de lysat total transfecté avec NKCC2-V5, ligne 2 : dépôt de 33% IP V5 sur cellules transfectées NKCC2-myc seul, et ligne 3 : dépôt de 33% IP V5 sur cellules transfectées NKCC2-Myc et ManIA-V5.

B) Immunoprécipitation de la ManIA endogène. 500 ng/ μ l /B60 du vecteur NKCC2-Myc est transfecté de manière transitoire dans les cellules HEK 293 lignes 1 ,2,3. Ligne 1, TOT, dépôt de 20 μ l (4%) de lysat total transfecté avec NKCC2-Myc. Ligne 2, dépôt de 40 μ l (66%) IP à l'aide d'un anticorps anti-V5 sur cellules transfectées NKCC2-Myc seul, pour le contrôle négatif. Ligne 3, dépôt de 40 μ l (66%) IP l'aide d'un anticorps anti-ManIA sur cellules transfectées NKCC2-myc seul. IB : Immunoblot, HC : chaîne lourde de l'immunoglobuline G, IP : Immunoprécipitation. TOT : dépôt des protéines totales du lysat cellulaire. Le western blot montre une interaction de ManIA endogène avec le core glycosylé immature de NKCC2 à 120kDa.

Le core glycosylé immature de 120 kDa de NKCC2 interagit avec la ManIA exogène dans les cellules HEK293 (Figure 36A ligne 3). De même on observe une interaction du core glycosylé par immunoprécipitation de la protéine ManIA endogène. (Figure 36B ligne 3). Cette interaction est spécifique puisque nous ne retrouvons pas NKCC2 dans le contrôle négatif immunoprécipité par l'anticorps V5 (Figure 36A et 36B ligne 2). Nous n'observons pas d'interaction avec la forme complexe mature de NKCC2, ce qui laisse supposer que l'interaction se produirait au niveau du cis Golgi, en corrélation avec la localisation de la ManIA.

En conclusion, la ManIA interagit avec le core glycosylé immature de NKCC2 dans les cellules rénales humaines in vitro et confirme l'interaction trouvée dans les cellules OKP.

Le transporteur NKCC2 colocalise avec la ManIA au niveau cis-Golgien dans les cellules HEK293.

La localisation de la ManIA est différente selon le type cellulaire et l'espèce chez les mammifères. Ainsi, on la trouve dans le RE des hépatocytes de porc ou le Golgi des cellules COS7 de singe et des cellules L de souris. Des variations de localisations cellulaires et tissulaires ont aussi été observées chez le rat. A ce jour, nous ne connaissons pas sa localisation subcellulaire intracellulaire et sa distribution dans le néphron du rein.

Afin de vérifier la localisation de l'interaction du core glycosylé immature de NKCC2 avec la ManIA dans une lignée humaine, nous avons réalisé une immunocytochimie et des observations en microscopie confocale sur les cellules HEK293 en culture. A cette fin, des cellules ont été transfectées avec NKCC2-EGFP et la ManIA-V5 afin de mettre en évidence la colocalisation compartimentaire des deux protéines ou de la ManIA seule, (Figure 37).

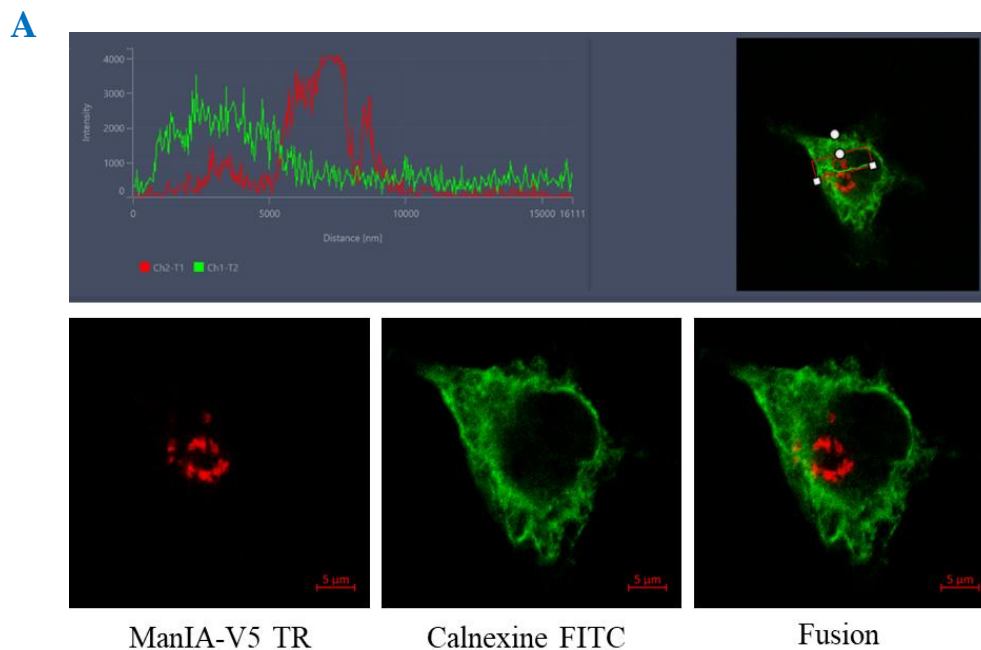


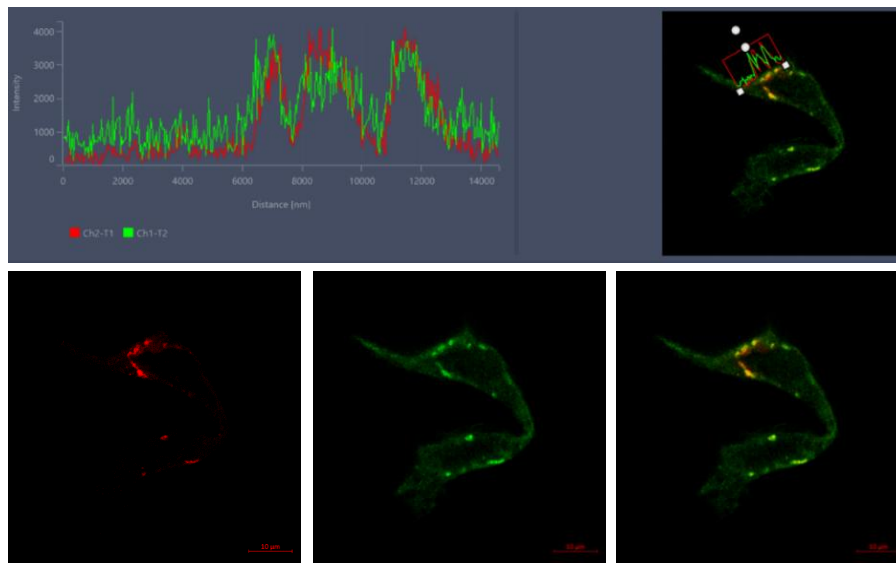
Figure 37 : La ManIA colocalise avec NKCC2 dans le cis golgi des cellules HEK293

Immunofluorescence. Mise en évidence par microscopie confocale montrant la distribution de la ManIA dans les cellules HEK293 et la colocalisation de la ManIA avec NKCC2.

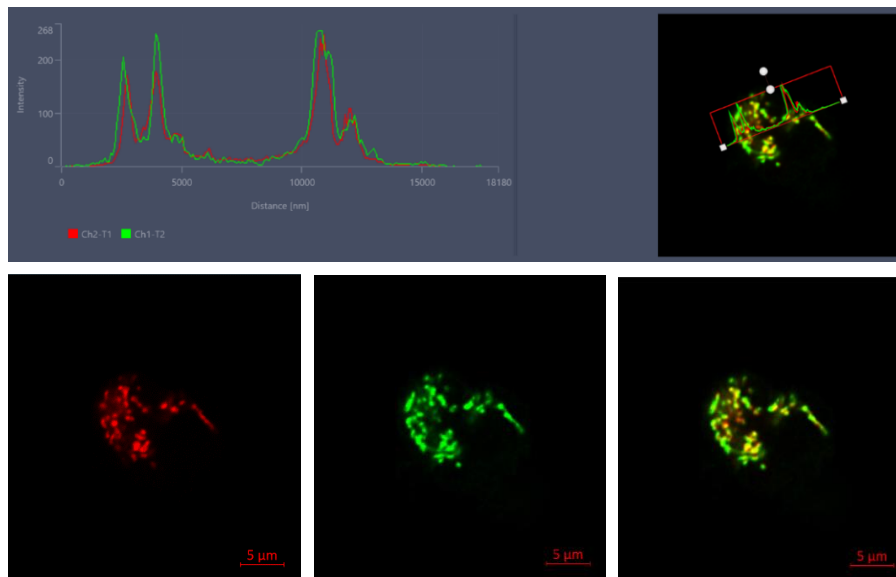
A/ La ManIA ne colocalise pas avec le réticulum endoplasmique

Les Cellules HEK293 sont transfectées avec 300ng/B40 de ManIA-V5 seul. L'anticorps anti-V5 de souris est reconnu par un fluorochrome anti-souris rouge Texas RED et le réticulum endoplasmique (RE) est mis en évidence par l'anti-calnexine de lapin révélé par le fluorochrome FITC (Vert). La couleur jaune indique la colocalisation de la calnexine avec la ManIA. Le graphe met en évidence l'absence de colocalisation. Le graphe représente l'intensité de la fluorescence en fonction de la distance d'un tracé indiqué dans l'insert et met en évidence l'absence de colocalisation.

B ManIA-V5 FITC



C



ManIA-V5 A455

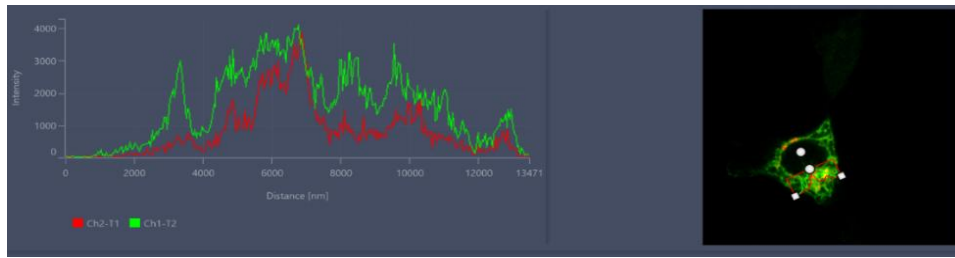
GM130 A488

Fusion

B/ La ManIA colocalise avec le Golgi (médián) : les cellules HEK293 sont transfectées avec ManIA-V5 seul (même protocole qu'en A). L'anticorps anti-V5 de souris est reconnu par un fluorochrome anti-souris Texas Red (rouge) et le Golgi est mis en évidence par l'anti-giantine de lapin révélé par le fluorochrome FITC (Vert). La couleur jaune indique la colocalisation de la giantine avec la ManIA.

C/ La ManIA colocalise avec le cis-Golgi : les Cellules HEK293 sont transfectées avec ManIA-V5 seul. (même protocole qu'en A). L'anticorps anti-V5 de souris est reconnu par un fluorochrome anti-souris Texas Red (rouge) et le cis-Golgi est mis en évidence par GM130 de lapin révélé par le fluorochrome A488 vert. La couleur jaune indique la colocalisation de GM130 et la ManIA. Les images ont été réalisées par le Docteur Dalal Bakhos Al Douaihy.

D

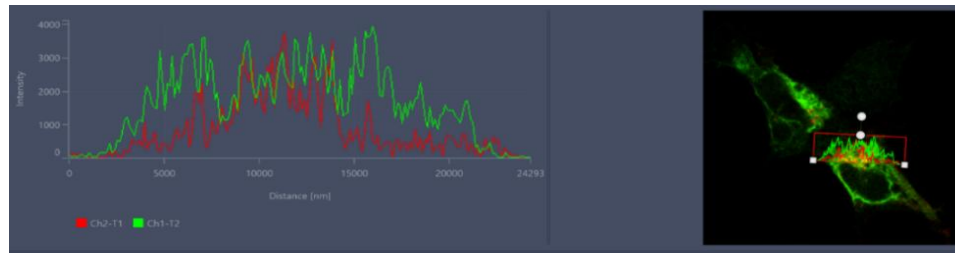


ManIA-V5 TR

NKCC2-EGFP

Fusion

E



ManIA-V5 TR

NKCC2-EGFP

Fusion

D/ La ManIA colocalise avec NKCC2. Les cellules HEK293 ont été transfectées avec 300ng/B40 mmmmmmmllmmmmllmmmmmpmNKCC2 N-terminal étiqueté EGFP (vert) et 300ng/B40 de ManIA-V5. L'anticorps anti-V5 de souris pour ManIA est révélée avec la Texas Red (rouge). La couleur jaune (image fusionnée) indique la colocalisation des protéines.

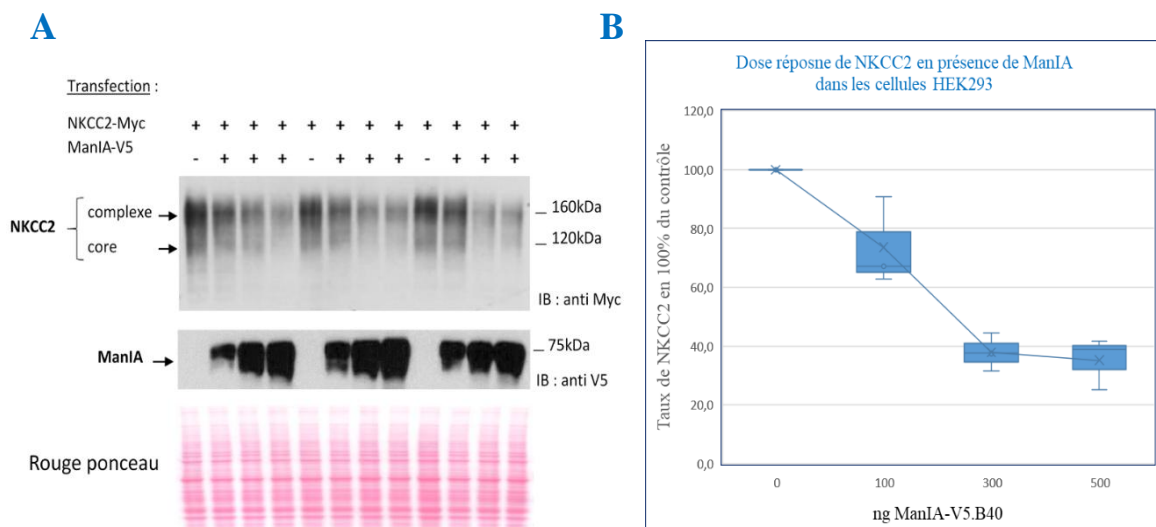
E/ Identique à D un autre exemple de cellule et de colocalisation. Les barres rouges représentent 5 µm ou 10µm.

La ManIA ne colocalise pas avec la calnexine, le marqueur du réticulum endoplasmique (Figure 37A), confirmant l'absence de localisation dans ce compartiment dans les cellules rénales chez deux espèces. Elle colocalise avec la Giantine, marqueur cis et transGolgien (Figure 37B) et avec GM130 un marqueur cis Golgien (Figure 37C). La ManIA est donc localisée dans le trans et le cis Golgi des cellules HEK293. NKCC2 colocalise avec la ManIA dans cellules Hek293 (Figure 37D,E).

L'ensemble de ces résultats confirment ceux obtenus dans la levure et les cellules OKP et montre que la forme immature de NKCC2 interagit avec la ManIA au niveau du cis Golgi dans des cellules rénales humaines.

La ManIA diminue la maturation de NKCC2 et la quantité du corps glycosylé dans les cellules HEK293

Nous avons cherché à confirmer l'action de la ManIA sur le taux de NKCC2 dans les cellules HEK293. A cette fin nous avons réalisé une transfection transitoire de NKCC2-myc avec des doses croissantes de ManIA-V5 et le taux de NKCC2 a été analysé en western blot, (Figure



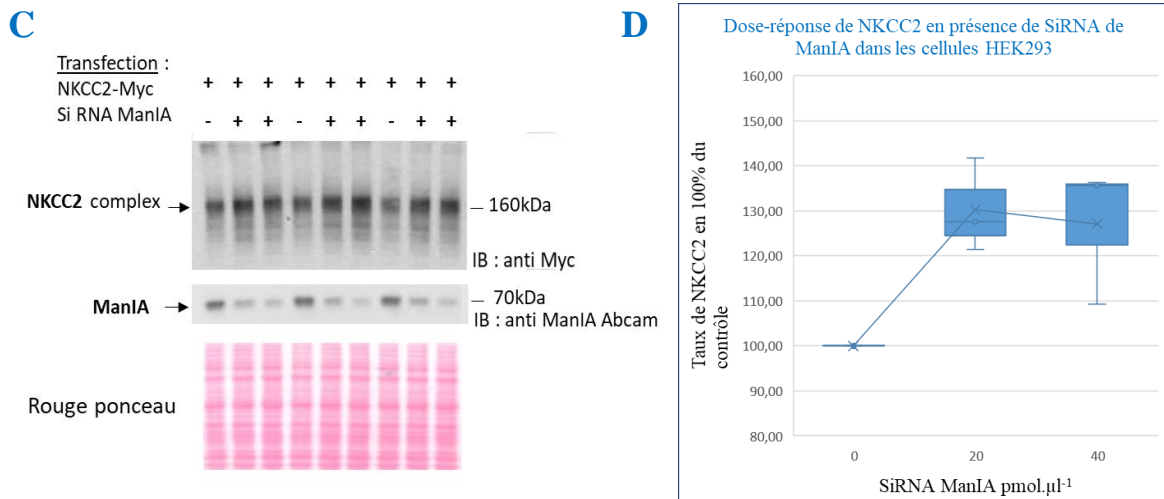
38).

Figure 38 : l'augmentation des taux de la ManIA diminue le taux de NKCC2 et son invalidation augmente le taux de NKCC2 dans les HEK293.

A/Immunoblot de de NKCC2 en absence ou en présence de différentes doses de vecteur ManIA-V5. 100 ng/B40 de NKCC2-myc ont été transfectés avec une dose croissante de ManIA-V5 (100, 300 ou 500 ng/B40). 24 heures après les cellules ont été lysées dans du tampon Ripa, et un western blot a été réalisé. A représente le résultat de l'immunoblot réalisé sur les échantillons en triplicat, une expérience.

B/quantification à l'aide d'image J de NKCC2 total (complexe plus et core glycosylé) normalisée sur le rouge ponceau, l'intensité du signal est évaluée en 100 % du contrôle.

Les deux formes de NKCC2 diminuent au fur et à mesure que la quantité de la ManIA augmente, on atteint un minimum qui semble se stabiliser. L'augmentation de la quantité de la ManIA diminue la stabilité du core glycosylé et la maturation de NKCC2 d'une manière dose dépendante. Les box plots présentent les points médians reliés, quartile médiane incluse. Moyenne +/- SED d'une expérience réalisée en triplicata indépendant.



C/Immunoblot de la réponse de NKCC2-myc après silencing de la ManIA endogène

Des doses croissantes (20 et 40 pmol/B40) de si RNA ManIA ont été transfectées en réverse le jour du repiquage des cellules. 24 heures après 100ng/μl/B40 de NKCC2-Myc ont été transfectées. 24 heures après les cellules ont été lysées, les protéines totales ont été normalisées et un western blot a été réalisé. C représente le résultat de l'immunoblot réalisé sur les échantillons en triplicat, une expérience.

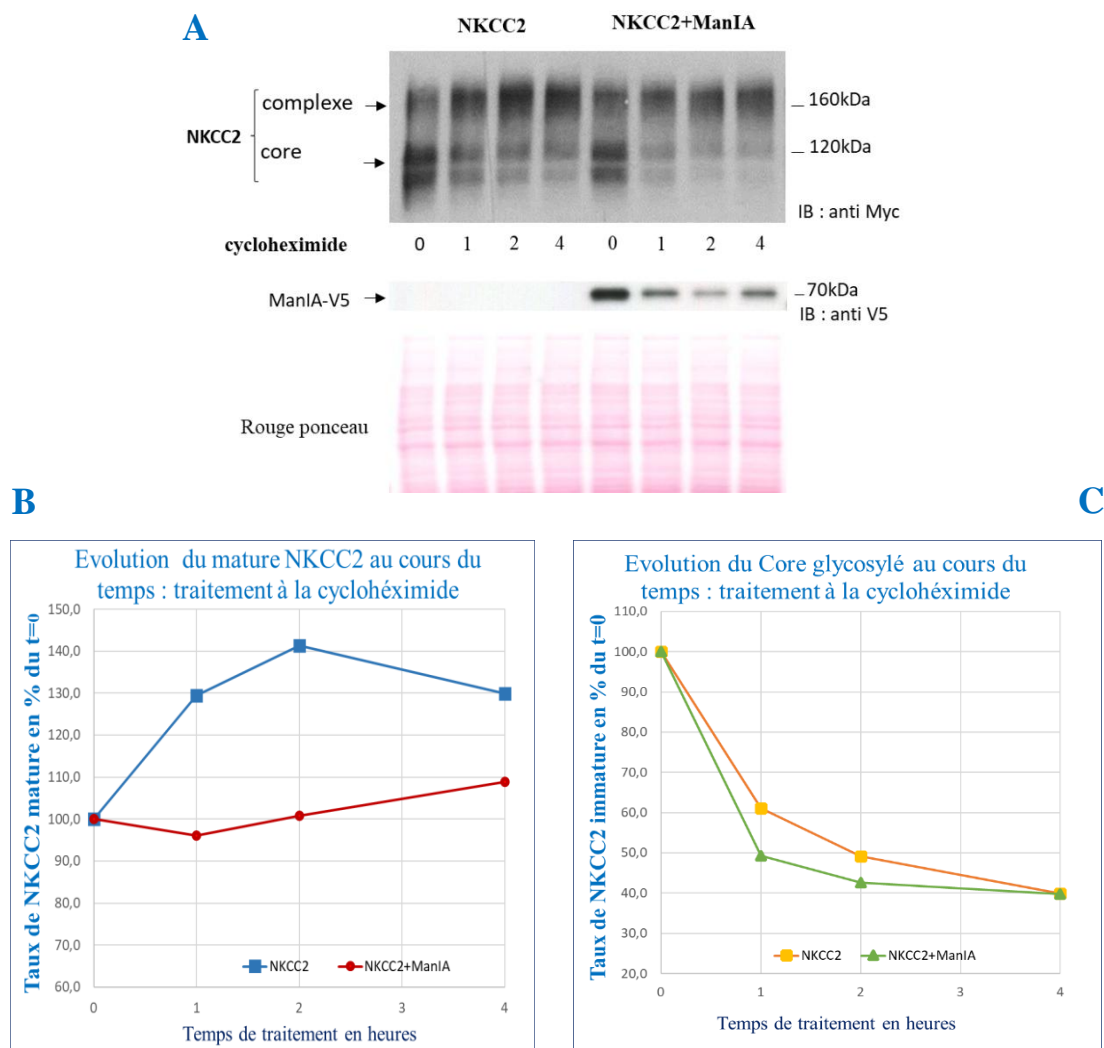
D/ quantification de C dans image J, de NKCC2 total normalisé sur le rouge ponceau, l'intensité du signal est évaluée en pourcentage du contrôle. Les deux formes de NKCC2 augmentent pour les deux doses 20 et 40 pmol/B40 sans différence notable entre ces deux doses. La diminution de la quantité de la ManIA augmente la stabilité du core glycosylé et la maturation de NKCC2. Les box plots présentent les points médians reliés, quartile médiane incluse. Moyenne +/- SED d'une expérience réalisée en triplicata indépendant. IB : immunoblot.

Comme dans les cellules OKP, nous observons que, plus les cellules expriment la ManIA, plus NKCC2 diminue dans ses formes mature et immature, (Figure 38A et 38B). L'augmentation de la quantité de la ManIA diminue la stabilité du core glycosylé et la maturation de NKCC2 d'une manière dose dépendante. Nous avons ensuite confirmé ce résultat par la méthode du Knock down de la ManIA par siRNA, (Figure 38C et 38D). Nous avons utilisé deux doses de si RNA par transfection réverse suivi, 12 heures après, de la transfection de NKCC2-Myc dans les cellules HEK293. La diminution de la quantité de la protéine endogène ManIA dans les cellules HEK293 produit une augmentation de la quantité NKCC2 aussi bien dans sa forme complexe mature que dans sa forme core glycosylé immature (Figure 38C et 38D).

Nous savons que les protéines NKCC2 nouvellement synthétisées in vitro en transfection transitoire passent par le contrôle qualité des protéines ERCQ et que seulement 30% sont redirigées vers le Golgi, le restant de protéines définitivement mal repliées étant dirigées vers l'ERAD où elles seront dégradées (**Seayfan et al. 2016**). Ces derniers résultats confirment que la ManIA serait aussi impliquée dans le contrôle qualité de NKCC2.

La ManIA accélère la dégradation de NKCC2 immature et stabilise sa maturation dans les cellules HEK293

Nous avons voulu confirmer les effets de la ManIA sur la maturation de NKCC2 représentée par la conversion de sa forme immature en forme mature et la dégradation son core glycosylé dans des cellules rénales humaines en culture. Nous avons voulu vérifier que l'action de la ManIA sur NKCC2 persiste dans le temps. Dans les mêmes conditions, 14 heures post transfection, nous avons mis les cellules en présence de cycloheximide, dans des cellules



HEK293, (Figure 39).

Figure 39 : La ManIA limite la maturation de NKCC2 et accélère légèrement la dégradation de son core glycosylé dans les cellules HEK293

A/ Immunoblot de NKCC2 en présence ou absence de la ManIA. Les cellules ont été transfectées avec 200ng/B40 de NKCC2-Myc et/ou 200ng/B40 de ManIA-V5. 14 heures après la transfection, elles ont été incubées pendant les temps indiqués avec 100µM de cycloheximide. B/ Quantification par image J

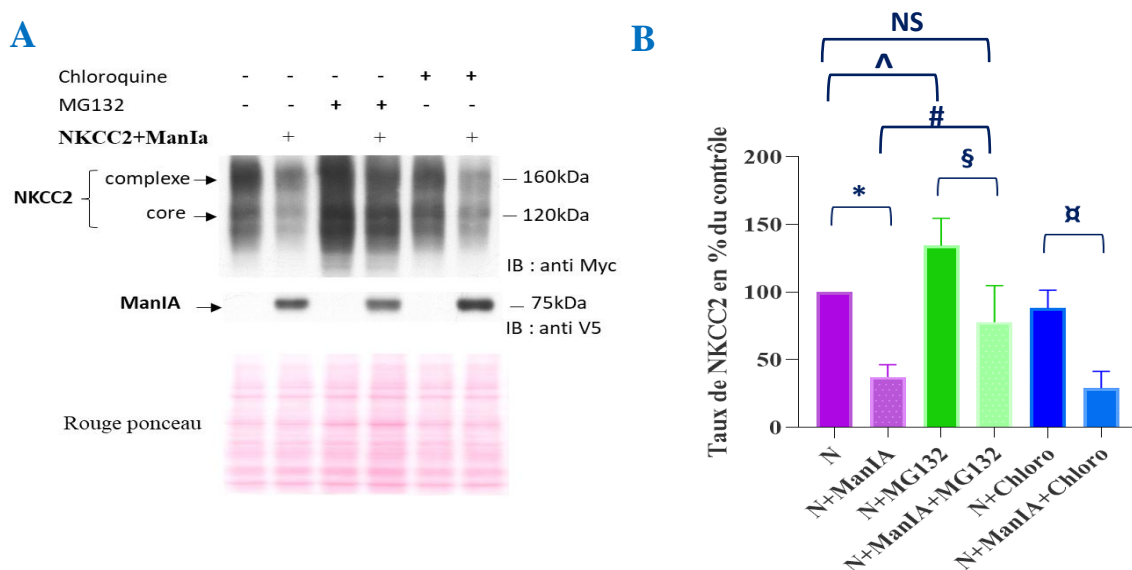
de la forme mature de NKCC2 normalisée sur le rouge ponceau (bande supérieure à 160KDa) du western blot présenté en A. Les valeurs sont exprimées en pourcentage du contrôle. C/ Quantification par image J du core glycosylée de NKCC2 normalisée sur le rouge ponceau (bande inférieure à 120KDa) du western blot présenté en A. Les valeurs sont exprimées en pourcentage du contrôle. IB : ImmunoBlot.

Le test à la cycloheximide confirme l'effet de la ManIA sur NKCC2 et confirme les résultats trouvés dans les OKP. On observe (Figure 39A, 39B, 39C), une stabilisation de la maturation du cotransporteur en présence de la ManIA par rapport au contrôle, et une accélération modérée de la diminution du core glycosylé en fonction du temps par rapport au contrôle non transfecté avec la ManIA. Cette diminution semble toutefois moins rapide que dans les cellules OKP. Ces deux observations confirment que la disparition du core glycosylé est non corrélée à la maturation de celui-ci en présence de la ManIA. Ces résultats confirment que la ManIA participe à la dégradation de NKCC2 indépendamment du type cellulaire et de l'espèce.

L'ensemble de ces résultats suggèrent que la ManIA participe à la voie de dégradation de NKCC2 au niveau du cis-Golgi. La ManIA serait impliquée dans la voie de l'ERAD et/ou de l'EGAD et/ou de l'ERLAD de NKCC2.

L'effet de la ManIA sur NKCC2 est réversé par l'inhibiteur du protéasome MG132

Afin de confirmer et de préciser le rôle de la ManIA dans la diminution du taux de NKCC2 par le mécanisme de l'ERAD et/ou de l'EGAD, le transporteur a été transfecté dans les cellules HEK293 en présence ou non de la ManIA. Les cellules ont été traitées par l'inhibiteur du protéasome MG132. En parallèle et de la même façon, nous avons regardé le rôle du lysosome dans cette diminution en mettant les cellules transfectées en présence de la



chloroquine, un inhibiteur du lysosome, (Figure 40).

Figure 40 : l'effet de la ManIA sur NKCC2 est inhibé par MG132 mais pas par la chloroquine

A/ immunoblot représentant les variations de taux de NKCC2 en fonction du traitement MG132 2 μ M ou Chloroquine 100 μ M en absence ou en présence de la ManIA (200ng/B40, rapport 1/1). 14 heures après la transfection les cellules sont traitées 6 heures avec le MG132 ou la chloroquine avant d'être lysées dans du tampon ripa. IB : immunoblot. B/ Quantifications par Image J de deux immunoblot semblables à A, normalisées sur les rouges ponceaux. Moyenne +/- SED de 2 expériences indépendantes réalisées en duplicata et triplicata. ANOVA suivi d'un test Tukey: ^: p=0,0061, #: p=0,0015, *: p=<0,0001, §: p=<0,0001, ¶: p=<0,0001

En présence de la ManIA on observe une diminution du taux de NKCC2 de près de 60 % par rapport au contrôle (Figure 40B). En présence de MG132 l'effet de la ManIA est aboli de plus de 60%. La différence observée entre les cellules transfectées NKCC2 plus ManIA traitées par MG132 par rapport aux mêmes cellules non traitées est non significative. La chloroquine ne module pas la diminution du taux de NKCC2 en présence de la ManIA. Ceci indique que le lysosome et la voie de l'ERLAD ne sont pas engagés dans l'effet de la ManIA sur le taux de NKCC2. Le traitement étant de 6 heures, la réversion de NKCC2 plus ManIA, traité par MG132 par rapport au contrôle NKCC2 traité par l'inhibiteur du protéasome n'est pas complète. Ceci indique peut-être que le temps de traitement n'est pas suffisamment long par rapport à la synthèse de NKCC2.

L'ensemble de ces résultats indiquent que l'effet de la ManIA sur NKCC2 implique la voie du protéasome et est indépendante de la voie du lysosome. La ManIA serait impliquée dans l'ERAD et/ou de L'EGAD de NKCC2.

L'inhibition des α 1,2 mannosidases n'abolit pas totalement l'effet de la ManIA sur NKCC2 dans les cellules HEK293 et OKP

Pour déterminer le rôle de l'activité enzymatique de la ManIA sur la protéine NKCC2 et savoir si celle-ci est responsable de la diminution de NKCC2, nous avons soumis des cellules HEK293 transfectées transitoirement avec NKCC2-Myc et co-transfectées ou non avec la ManIA-V5 à un traitement kifunensine à 25 μ M pour inhiber l'activité catalytique des sept α 1,2-mannosidases.

La kifunensine est un inhibiteur pour les trois mannosidases Golgiennes ; ManIA, ManIB, ManIC, la mannosidase du réticulum endoplasmique, ERman1 et les trois orthologues impliquées dans l'ERAD, au niveau du RE : EDEM 1, 2 et 3. Il n'existe pas d'inhibiteur spécifique de la ManIA.

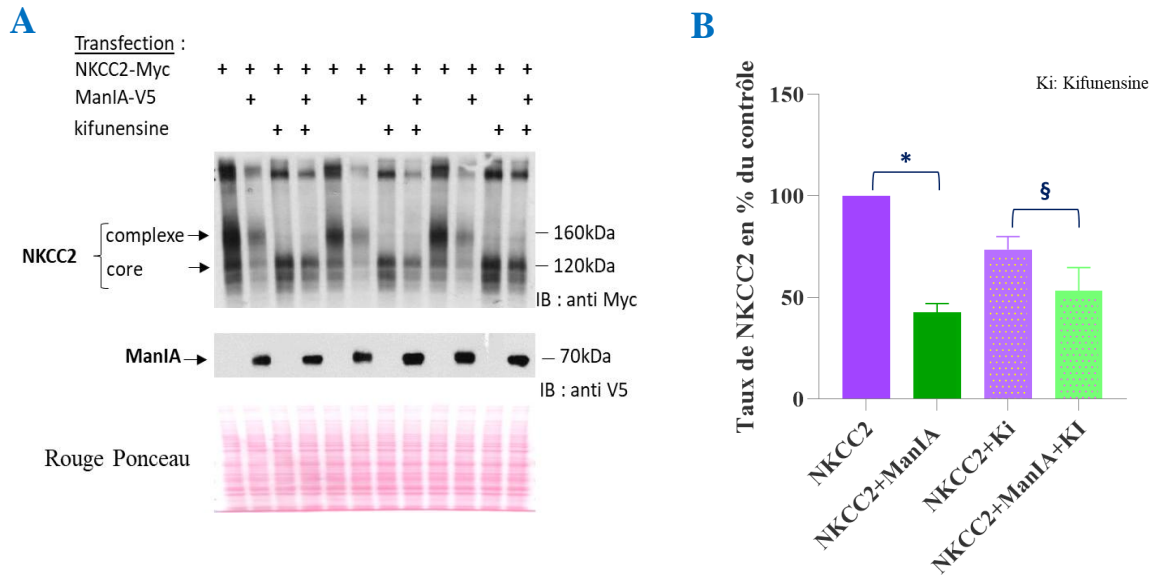


Figure 41 : Effet de l'inhibiteur des mannosidase α 1,2 sur la maturation de NKCC2 et la stabilité de son core glycosylé dans les cellules HEK293

A/Immunoblot montrant l'effet de la kifunensine 25 μ M sur le taux de NKCC2-Myc en l'absence ou en présence de la ManIA-V5 transfectés transitoirement dans les cellules HEK293. 24 heures après la transfection les cellules ont été lysées comme précédemment et un western blot a été réalisé. Expérience réalisée en triplicata. B/ quantification dans image J de NKCC2 total (complexe à 160kDa et Core glycosylé à 120kD), à partir de l'immunoblot présenté en A. Les résultats sont exprimés en pourcentage du contrôle normalisés sur les rouges ponceaux. Moyenne +/- SED d'une expérience réalisée en triplicata indépendant. L'immunoblot montre une diminution drastique de la forme complexe de NKCC2 et une augmentation du core glycosylé en présence de kifunensine. On observe toujours un effet en présence de la ManIA. IB : immunoblot. One way ANOVA : **p=0,0026**. Tukey test : * : NKCC2 vs. NKCC2+ManIA : **p =0,0073**. RM one way ANOVA **p=0,0428**. Tukey test : § : NKCC2 Ki vs. NKCC2+ManIA Ki **p=0,0001**, non significatif en One way ANOVA ordinaire.

La forme mature de NKCC2 diminue drastiquement lorsque les cellules sont traitées par la kifunensine dans les cellules transfectées NKCC2 seul ou avec la ManIA, (Figure 41A). Le core glycosylé augmente dans les deux cas suggérant une rétention dans le réticulum endoplasmique et/ou dans les vésicules du contrôle qualité cis-Golgiennes. La quantification du total de NKCC2 (Figure 41B), montre que le traitement kifunensine abroge presque totalement l'effet de la ManIA sur NKCC2. Il existe cependant un effet résiduel significatif. L'activité des sept α 1,2-mannosidases étant abrogés par la présence de la kifunensine nous pouvons en déduire qu'à la fois que l'activité enzymatique de la ManIA semble être impliquée dans l'effet de la ManIA sur NKCC2 et qu'il existe une action persistante additionnelle indépendante de l'activité enzymatique de la ManIA. Ce résultat confirme l'hypothèse d'une régulation de NKCC2 dépendante de la N-glycosylation et d'une régulation par une interaction protéine-protéine indépendante du rôle catalytique de la ManIA.

Afin de déterminer si cette réversion est un effet propre au cellules HEK293 ou plus général nous avons réalisé la même expérience dans les cellules OKP, (Figure 42).

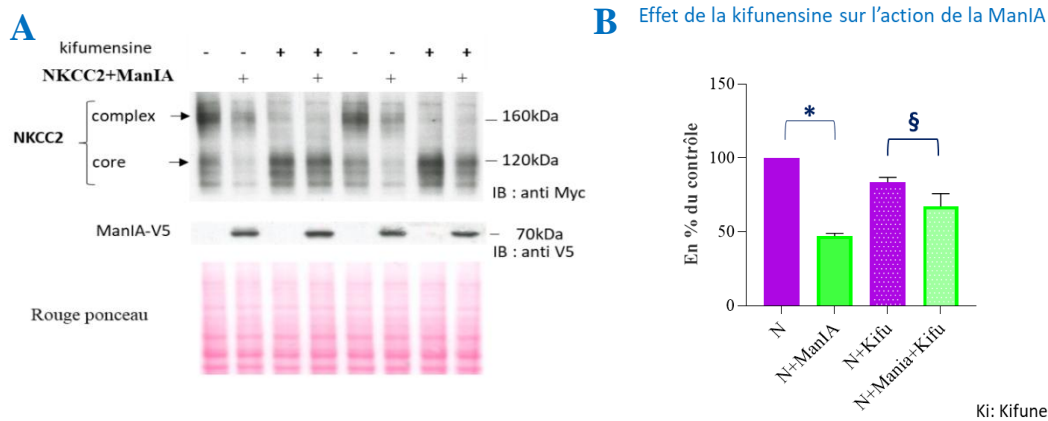


Figure 42 : Effet de l'inhibiteur des mannosidase α 1,2 Kifunensine sur la maturation de NKCC2 et la stabilité de son core glycosylé dans les cellules OKP

A/Immunoblot montrant l'effet de la kifunensine 25 μ M sur NKCC2-Myc en l'absence ou en présence de la ManIA-V5 transfectés transitoirement dans les cellules OKP. 24 heures après la transfection les cellules ont été lysées comme précédemment et un western blot a été réalisé. Moyenne +/- SED d'une expérience réalisée en triplicata indépendant.

B/ Quantification de NKCC2 total dans Image J (complexe à 160 kDa et Core glycosylé à 120 kDa) à partir de l'immunoblot présenté en A. Les résultats sont exprimés en pourcentage du contrôle et normalisés sur le rouge ponceau. D'une manière identique aux cellules HEK293, l'immunoblot montre une diminution drastique de la forme complexe de NKCC2 et une augmentation du core glycosylé en présence de kifunensine. On observe toujours un effet résiduel en présence de la ManIA. L'effet est réversé par rapport au 100% de 50% environ et presque totalement par rapport au contrôle NKCC2 traité. IB : immunoblot. One way ANOVA : $p < 0,0001$. Tukey test * : NKCC2 vs. NKCC2+ManIA : $p = 0,001$ RM one way ANOVA Tukey test NKCC2 Ki vs. NKCC2+ManIA Ki $p = 0,0004$. One sample T test : ****

De manière similaire aux cellules HEK293, la forme mature de NKCC2 diminue drastiquement lorsque les cellules sont traitées par la kifunensine dans les cellules transfectées NKCC2 seul ou avec la ManIA (Figure 42A). De même, le core glycosylé augmente dans les deux cas. La quantification du total NKCC2 (Figure 42B) montre que le traitement kifunensine abroge davantage l'effet de la ManIA dans les cellules OKP par rapport aux cellules HEK293. Cependant comme dans les HEK293 la réversion n'est pas totale si l'on compare le taux de NKCC2 dans les cellules transfectées NKCC2 seul non traitées et le taux de NKCC2 dans les cellules transfectées NKCC2 plus ManIA traitées. Elle n'est pas totale non plus quand on compare les cellules contrôles traités par rapport aux cellules transfectées par NKCC2 plus ManIA traitées et cela de manière significative. La différence entre ces deux dernières conditions est cependant moins importante, comparée aux cellules HEK293, même si elle reste significative.

En conclusion, le clivage des mannosés semble important dans l'effet de la ManIA sur NKCC2 démontrant la nécessité de la N-glycosylation dans celui-ci. Il existe également une action indépendante de l'activité enzymatique de la ManIA dans les deux types cellulaires rénales. L'hypothèse d'une régulation de NKCC2 complémentaire par une interaction protéine-protéine indépendante du rôle catalytique de la ManIA est confirmée.

L'effet de la ManIA sur NKCC2 passe par sa partie cytosolique et par sa partie catalytique.

Pour préciser le rôle de la partie catalytique et de la partie cytosolique d'interaction prédite par le crible double hybride, nous avons construit différents mutants de la ManIA. En effet le crible double hybride a été réalisé avec la partie C-terminale cytosolique de NKCC2. La ManIA interagit donc dans la levure avec la partie C-terminale cytosolique de NKCC2. Nous avons délété la partie cytoplasmique de la ManIA qui est située dans le domaine N-terminal en gardant le premier acide aminé, une lysine, juste avant la zone transmembranaire prédite, (Figure 43A). Pour la partie enzymatique, nous avons inséré un codon stop, par mutagenèse dirigée, juste avant le domaine catalytique de la protéine, (Figure 43A). Les deux mutants ainsi générés ont été nommés Cytos pour la partie cytosolique délétée et Catax pour le domaine catalytique supprimé, (Figure 43A).

Les cellules HEK293 ont été transfectées transitoirement avec NKCC2-Myc en présence ou non de deux doses (200, 300 ng/B40), de chacun des trois vecteurs suivants : ManIA-V5 Wild type, Cytos-V5 ou Catax. La figure 43B présente les résultats des immunoblots 24 heures pour deux expériences de transfection avec les deux doses les plus faibles.

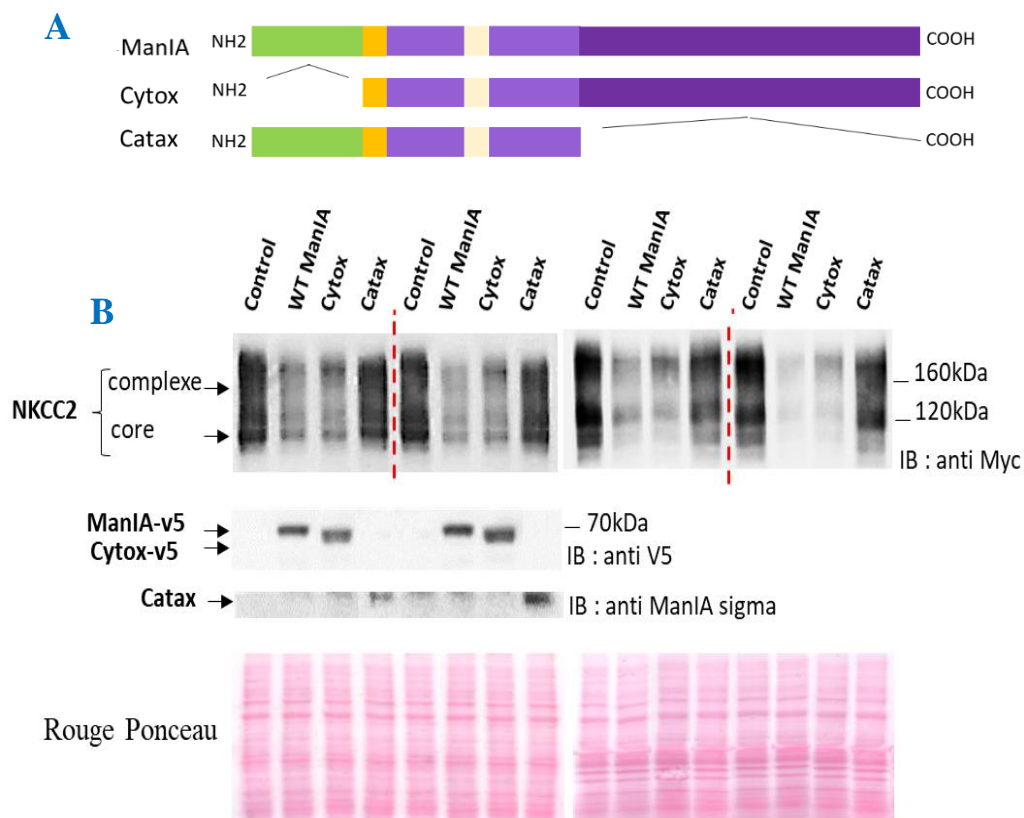
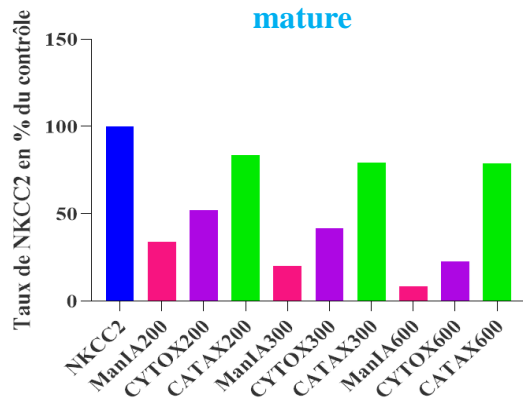


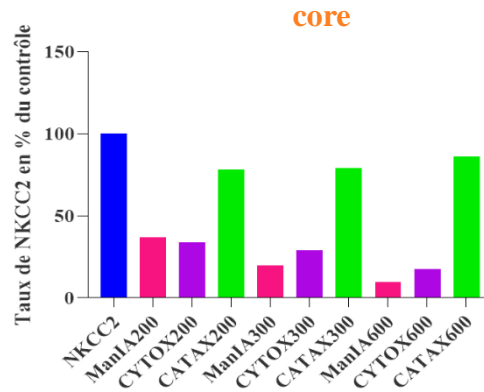
Figure 43: Les délétions Cytos ou Catax n'abolissent pas complètement l'effet de la ManIA sur le taux du cotransporteur NKCC2

Les cellules HEK293 ont été transfectées transitoirement, avec NKCC2-myc, en l'absence ou en présence de doses croissantes de ManIA-V5 (200, 300 et 600 ng/B40), Cytos-V5 ou Catax.

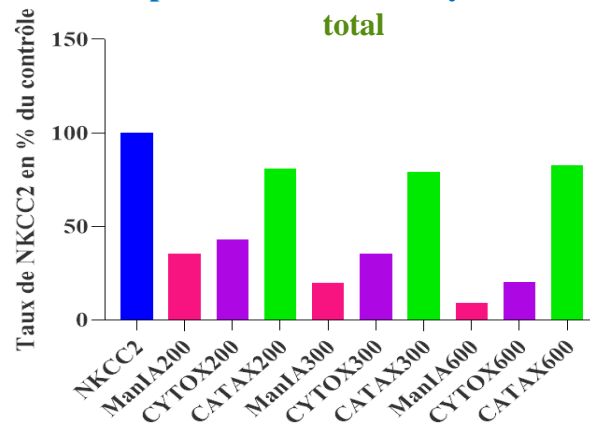
C Dose-réponse de NKCC2 en présence de ManIA/Cytox/Catatax mature



D Dose-réponse de NKCC2 en présence de ManIA/Cytox/Catatax core



E Dose-réponse de NKCC2 en présence de ManIA/Cytox/Catatax total



A/ Schéma représentant la protéine ManIA et ses mutants. Le domaine de prédiction cytoplasmique est représenté en vert, la séquence transmembranaire en orange et le domaine luminal en violet. La partie catalytique de la protéine est montrée en violet foncée. L'orange très clair montre une structure en boucle dont le rôle n'est pas identifié. Les délétions Cytox et Catatax sont représentées. La délétion Cytox inclut la méthionine de départ et le premier acide aminé avant le domaine transmembranaire. La délétion Catatax présente un codon stop juste avant la partie catalytique, le tag V5 est donc absent.

B/ Immunoblots obtenus avec (à gauche) 200ng et (à droite) 300ng des différentes constructions de la ManIA indiquées. Marquage anti V5 pour la ManIA et Cytox, et anti ManIA (Sigma) pour Catatax, (domaine en amont de la partie C-terminale). IB : immunoblot. n=1 triplicat.

C/ Quantification de la forme mature de NKCC2

D/ Quantification du Core glycosylé

E/ Quantification du total NKCC2. Les barres représentent la moyenne des valeurs obtenues avec les deux expériences. Les valeurs sont normalisées sur le rouge ponceau et présentées en pourcentage du contrôle non transfecté. Toutes les quantifications ont été réalisées à l'aide d'image J et normalisées sur le rouge ponceau.

Comme précédemment, la protéine ManIA induit une diminution majeure de la forme complexe mature et de la forme core glycosylé immature de NKCC2 (Figures 43C,43D,43E).

En présence des deux mutants nous observons une minoration de l'effet sur la forme mature de NKCC2 par rapport à la ManIA avec une réversion de l'effet de la ManIA sur NKCC2

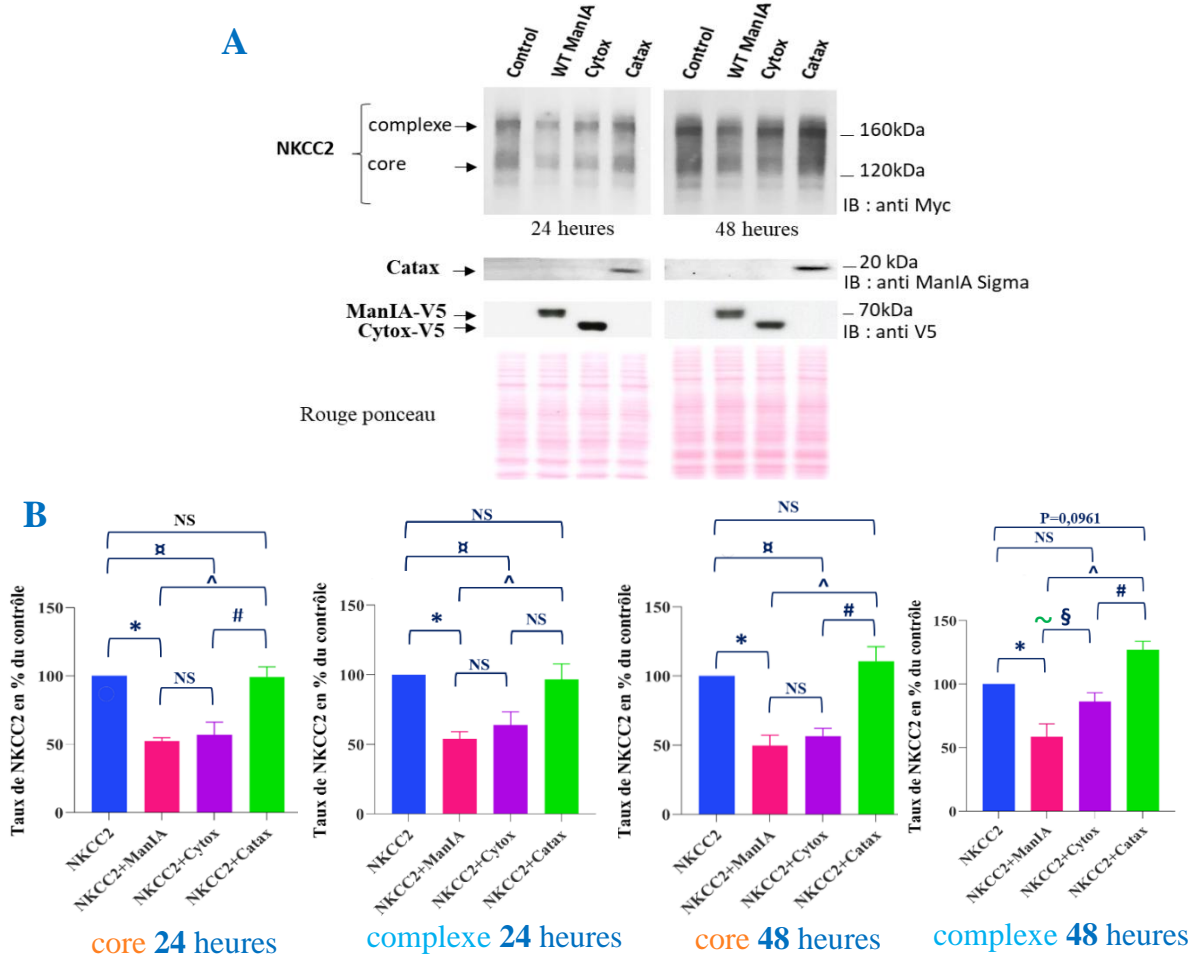
nettement plus forte pour le mutant Catax dépourvu du domaine catalytique sans que celle-ci ne soit totale ([Figure 43D](#)). Pour la forme sauvage de la ManIA comme pour le mutant Cytox, nous pouvons observer un effet dose dépendant. Pour le mutant Cytox, le core glycosylé ne varie quasiment pas par rapport à la ManIA, sauf pour la dernière dose. Ceci montre que la délétion Cytox n'est pas suffisante pour abroger l'effet de la ManIA sur NKCC2 ([Figures 43C, 43D](#)). Nous n'observons pas cette corrélation pour le Catax, dont l'effet n'est pas dose dépendante puisque la perte de l'effet de la ManIA est presque totale pour toutes les doses de plasmides transfectées et semble concerner les deux formes de NKCC2, ([Figures 43C, 43D](#)). L'augmentation de la forme mature de NKCC2 chez les deux mutants par rapport à la ManIA pourrait s'expliquer, par un défaut de dégradation de NKCC2 en conséquence d'un contrôle qualité moins efficace, puisque le core glycosylé augmente aussi dans le cas de Catax ou est plus constant dans le cas de Cytox, et/ou, par le remplacement du rôle de la ManIA par ManIB et/ou ManIC dans la glycosylation de NKCC2 au niveau du golgi. En effet, selon le contexte, ManIB et/ou ManIC peuvent hydrolyser les autres branches, comme la branche A, du high mannose 8. Cette réversion partielle montre à la fois l'implication de la partie cytoplasmique de la ManIA dans le contrôle qualité via une interaction protéine-protéine avec NKCC2, et le rôle indispensable de la partie catalytique dans l'effet de la ManIA sur NKCC2. Le mutant Cytox reverse beaucoup moins. Cependant une petite augmentation de la maturation et une stabilité ou une petite augmentation du core glycosylé en fonction de la dose transfectée sont observées ([Figure 43C, 43D](#)). La partie catalytique étant toujours présente, cela suggère que celle-ci est impliquée dans le contrôle qualité de NKCC2 et dégrade NKCC2 déjà présent et peut la réorienter vers la voie de l'ERAD et/ou de l'EGAD. L'augmentation du complexe mature de NKCC2 semble montrer le blocage de la voie vers l'ERAD/EGAD par absence d'interaction ou diminution de celle-ci et l'action de la partie catalytique dans la maturation au niveau du Golgi. La ManIA aurait donc deux rôles : un rôle dans la maturation de NKCC2 au niveau cis Golgien en hydrolysant le highmannose 8 en position A et un rôle dans la dégradation de NKCC2 en hydrolysant par exemple un mannose dans une autre position que la branche A. La ManIA pourrait mimer par exemple ERMan1 dans la voie de l'ERAD au niveau du Golgi.

Cette expérience confirme le rôle de la ManIA dans l'ERAD et/ou l'EGAD de NKCC2. L'action de la ManIA s'exerce à la fois par sa partie cytoplasmique et sa partie catalytique.

L'effet de la ManIA et de ses mutants est stable dans le temps dans les cellules HEK293

L'expérience précédente ayant été réalisée 14-16 heures après transfection transitoire, nous avons voulu connaître l'évolution de cet effet dans le temps et en particulier celui du mutant Cytox. En effet, nous souhaitons confirmer l'importance de l'interaction protéine-protéine cytoplasmique de ManIA/NKCC2 dans la régulation du cotransporteur. Nous avons ainsi regardé les taux de NKCC2 pour la ManIA et ses mutants à 24 et 48 heures post transfection dans les cellules HEK293, ([Figure 44](#)).

Figure 44 : Evolution du taux de NKCC2 en fonction du temps en présence de la ManIA, ou de ses mutants Cytox ou Catax



A/ Immunoblot. Les cellules HEK293 ont été transfectées transitoirement, avec NKCC2-myc, en l'absence ou en présence de la ManIA-V5, ou des mutants Cytox ou Catax. 24 heures et 48 heures post transfection, les cellules ont été lysées, les protéines totales quantifiées et un immunoblot réalisé. Marquage anti-Myc pour NKCC2, anti-V5 pour la ManIA et Cytox, et anti-ManIA (Sigma) pour Catax. B/ Quantification des différentes formes de NKCC2 sur les immunoblots présentés en A pour n=1, moyenne +/- SED de d'une expérience réalisée en triplicata indépendant. Les valeurs sont normalisées sur le rouge ponceau et exprimées en pourcentage du contrôle. A 48 heures on observe une réversion de l'effet en présence du Cytox pour la forme mature de NKCC2. La différence entre NKCC2 plus ManIA versus NKCC2 plus Cytox est significative seulement en T Student unilatéral § : p=0,0433. De même l'effet de Catax de la forme mature à 48 heures est supérieur de 20% au contrôle NKCC2, T student unilatéral. ~§ : p=0,0433. One way ANOVA + tukey test. * : p<0,05 ✎ : p<0,05 # : p<0,05 ^ : p<0,05 NS : non significatif. IB : Immunoblot.

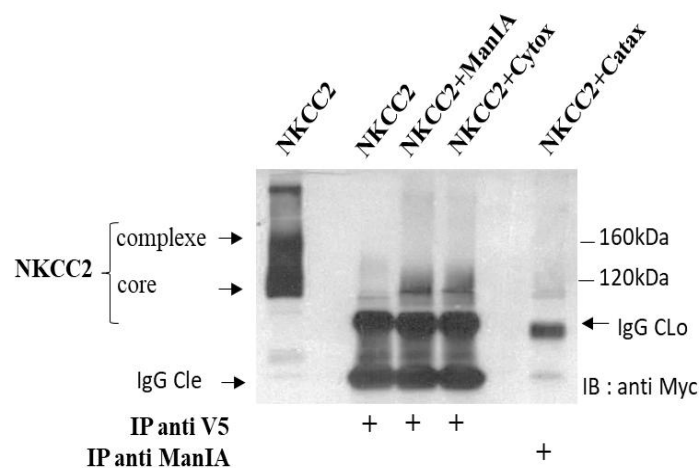
Le taux de la ManIA entraîne une diminution d'environ de 50% diminution du taux de NKCC2 pour les deux formes core glycosylé et complexe à 24 comme à 48 heures. Cette constance suggère un mécanisme de régulation. L'effet du mutant Cytox est constant dans le temps et ne montre pas différence notable par rapport à l'effet de la ManIA sauf à 48 heures où la forme mature retrouve une valeur significative presque similaire au contrôle NKCC2 seul. Ceci confirme le rôle de la partie cytosolique de la ManIA dans l'effet de NKCC2 en

limitant la maturation du transporteur tout en permettant la dégradation de celui-ci prévue par la protéine ManIA sauvage. La forme Catax annule l'effet de la ManIA sauvage sur NKCC2 à 24 heures pour les deux formes. Cette réversion montre que la partie catalytique de la ManIA sur NKCC2 est indispensable et est lié à la dégradation de celui-ci. A 48 heures la forme mature complexe montre une augmentation significative d'environ 20% par rapport au contrôle. Cette augmentation suggérerait un effet dominant négatif sur l'endogène ManIA (Figure44).

Ces résultats confirment l'hydrolyse des mannoses de NKCC2 dans la voie de l'ERAD et/ou de l'EGAD de NKCC2 ManIA dépendante au niveau du cis et/ou du trans Golgi où la ManIA est localisée. La ManIA jouerait un rôle en régulant la maturation et en favorisant le retour de NKCC2 mal replié et/ou en excès vers le ERCQ et la voie de l'EGAD et/ou de l'ERAD.

La délétion du domaine cytoplasmique de la ManIA n'abolit pas l'interaction avec NKCC2

Afin de déterminer plus précisément l'action de la ManIA sur le taux de NKCC2 ou avons réalisé une immunoprécipitation des mutants, (Figure 45). Les cellules HEK293 ont été transfectées transitoirement avec NKCC2-Myc en présence ou non de chacun des trois



vecteurs suivants: ManIA sauvage, Cytos ou Catax. Une immunoprécipitation avec les anticorps anti-V5 ou avec anti-ManIA a été réalisée.

Figure 45: Immunoprécipitation des mutants Cytos et Catax en présence de NKCC2

Immunoprécipitation. 500 ng/B60 NKCC2-myc sont transfectés de manière transitoire avec ou sans 500 ng/B60 de ManIA-V5 de Cytos V5 ou de Catax dans des cellules HEK. 16 heures post transfection l'immunoprécipitation est réalisée avec un anticorps anti-V5 ou anti ManIA (sigma) pour le mutant Catax et un western blot est effectué. De gauche à droite : Ligne 1 : protéines Totales, dépôt de 4% de lysat total transfecté avec NKCC2-V5, ligne 3 : dépôt de 33% IP V5 sur cellules transfectées NKCC2-myc seul, pour le contrôle négatif et ligne 4 : dépôt de 33% IP V5 sur cellules transfectées NKCC2 et ManIA-V5. Ligne 5 : dépôt de 33% IP V5 sur cellules transfectées NKCC2 et Cytos-V5. Ligne 7 : dépôt de 33% IP ManIA (Sigma) sur cellules transfectées NKCC2 et Catax. IB: ImmunoBlot. Clo : Chaîne lourde des IgG, Cle : chaîne légère des IgG. On observe que nous ne perdons pas l'interaction du Cytos en ligne 5. L'interaction avec le Catax est absente.

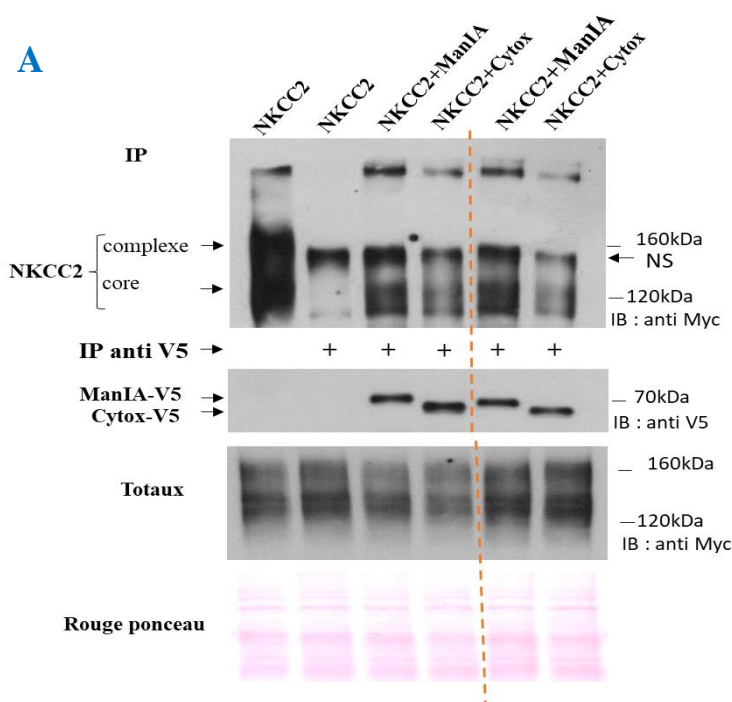
Nous n'observons pas d'interaction entre NKCC2 et le mutant Catax, suggérant une absence d'interaction (Figure 45). Cependant l'anti-ManIA de Sigma a été employé dans cette expérience, correspondant à la reconnaissance d'un épitope positionné du côté N-terminal de la ManIA. L'anticorps reconnaît une séquence consensus entre la ManIA de souris et de l'homme. Il fonctionne pour la ManIA humaine mais ne semble pas fonctionner chez la souris en immunoprécipitation (résultats non montrés). On ne peut donc pas conclure à une absence d'interaction avec NKCC2.

Le mutant Cytos interagit avec NKCC2 (Figure 45). Cette interaction semble diminuer très légèrement par rapport à la forme sauvage de la ManIA, ce qui suggère une perte d'interaction avec le transporteur et expliquerait la légère perte de l'effet de la ManIA sur le taux total de NKCC2, avec une légère augmentation et une réversion partielle de la forme mature de NKCC2 à 48 heures post transfection.

L'interaction avec NKCC2 diminue en présence du Cytos par rapport à l'interaction avec la ManIA

Afin de confirmer l'hypothèse de la diminution de l'interaction de NKCC2 avec le mutant Cytos par rapport à la ManIA, nous avons réalisé une immunoprécipitation quantitative de la ManIA ou du mutant Cytos en présence de NKCC2, (Figure 46).

Des cellules HEK293 ont été transfectées transitoirement avec NKCC2-Myc en présence ou non des chacun des deux vecteurs suivants : ManIA-V5 ou Cytos-V5. Les protéines totales ont été quantifiées et normalisées et une immunoprécipitation avec l'anticorps V5 a été réalisée sur les cellules transfectées avec NKCC2 seul, pour le contrôle négatif, NKCC2 et ManIA-



V5, ou NKCC2 et Cytox-V5 pour les interactions.

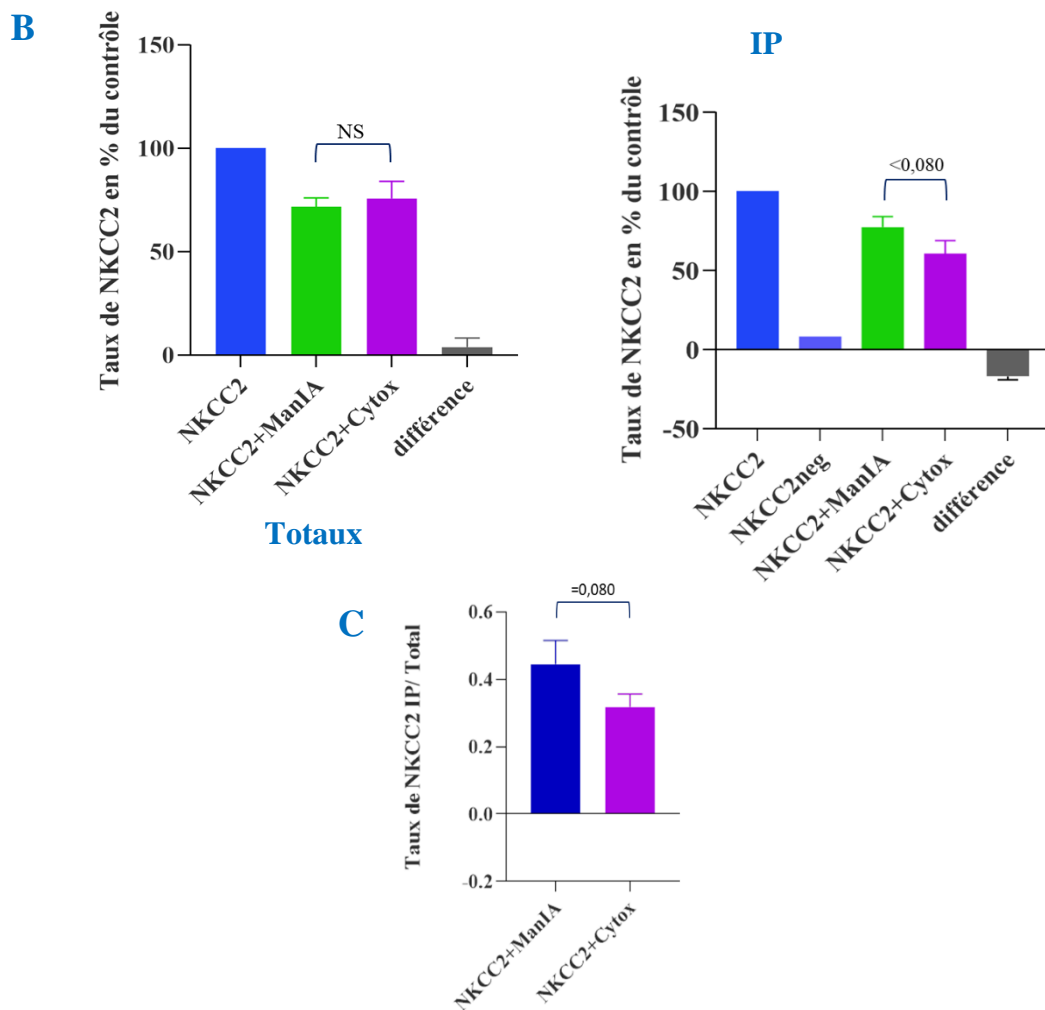


Figure 46 : La ManIA interagit moins avec NKCC2 lorsque sa partie cytosolique est tronquée

A/ Immunoblot de l'immunoprécipitation quantitative de la ManIA ou du Cytox avec NKCC2. 500ng/B60 de NKCC2 ont été transfectée seul ou avec 500ng/B60 de ManIA-V5 ou de Cytox-V5 dans les cellules HEK293. 16 heures post transfection l'immunoprécipitation est réalisée avec un anticorps anti-V5 et un western blot est effectué. De gauche à droite : ligne 1, dépôt de 4% de lysat total NKCC2 transfecté seul. Ligne 2 contrôle négatif. Autres lignes dépôt de 33% de l'immunoprécipitats quantitatif. On observe une diminution de l'interaction en présence de Cytox. IB : Immunoblot. IP : Immunoprécipitation.

B/quantification de A. Histogramme des protéines totales à gauche et de l'IP quantitative à droite, L'intensité du signal est évaluée en 100% du contrôle transfecté avec NKCC2 seul, normalisé sur le rouge ponceau, moyenne +/- SED d'une expérience réalisée en triplicata indépendant. Cytox reverse très modérément l'effet de la ManIA, corrélé à une baisse d'interaction avec NKCC2. t student unilatéral. Neg : contrôle négatif IP. La différence représente la soustraction du taux de NKCC2 en présence de la ManIA et de NKCC2 en présence du mutant Cytox. t student unilatéral Neg : contrôle négatif IP : immunoprécipitation.

C/ représentation du taux de NKCC2 de L'IP divisé par le total NKCC2.

On observe une diminution de celle-ci. P=0,080 t student unilatéral. n=1. Triplicat.

L'immunoblot ([Figure 46A](#)) et sa quantification ([Figure 46B](#)) montre une diminution du pool de NKCC2 (core glycosylé et complexes de haut poids moléculaire) co-immunoprécipité avec le mutant Cytos par rapport au taux de NKCC2 co-immunoprécipité avec la ManIA, alors que le taux total de NKCC2 montre une augmentation discrète en présence de Cytos par rapport à la ManIA (histogramme [Figure 46B](#) à gauche). Ceci montre que la réversion de l'effet de la ManIA sur NKCC2 est réduite lorsque la partie cytosolique est absente suggérant à nouveau un rôle de ce domaine dans l'effet par une interaction protéine-protéine. Ceci montre aussi que la partie C-terminale interagit aussi avec NKCC2 et joue un rôle prépondérant dans l'ERAD du cotransporteur. Les complexes de haut poids moléculaire visible en ([Figure 46A](#)) suggèrent une accumulation de NKCC2 mal repliés dans le réticulum endoplasmique. En présence de la ManIA ils sont augmentés par rapport au mutant Cytos dans l'IP. Ceci montre probablement que la ManIA interagit avec les complexes agrégés de NKCC2. Ces résultats suggèrent que ces agrégats se retrouvent non seulement au niveau du RE mais aussi dans le Golgi ou la ManIA jouerait un rôle dans leur élimination vers l'ERAD.

L'ensemble de ces résultats montre que la partie cytosolique de la ManIA interagit avec NKCC2 et que la partie cytosolique comme la partie catalytique jouerait un rôle dans l'ERAD et/ou l'EGAD de NKCC2.

[Le mutant de Bartter NKCC2 A508T est plus sensible à la dégradation régulée par la ManIA](#)

L'ERAD de NKCC2 étant régulé par la ManIA au niveau cis Golgien, nous avons voulu étudier deux mutants décrits comme induisant le syndrome de Bartter. NKCC2 A508T est un mutant humain précédemment rapporté par ([Vargas-Poussou et al. 1998](#)) ([Brochard et al. 2009](#)). Nos résultats au laboratoire montrent que la maturation de NKCC2 A508T est limitée, suggérant une dégradation précoce due à un mauvais repliement. NKCC2 A998X est une forme tronquée de NKCC2 par la mutation d'une alanine en position 998 générant un codon stop. Cette mutation de NKCC2 entraîne la formation d'une protéine à laquelle il manque les 101 derniers acides aminés du domaine COOH-terminal. Ces 101 derniers acides aminés contiennent un motif de sortie du RE composé de résidus hautement conservés, 1081LLV1083, nécessaire à la maturation et la présence à la surface membranaire ultérieure de NKCC2 ([N. Zaarour et al. 2009](#)). La mutation Y998X humaine est décrite par les mêmes auteurs dans les articles cités précédemment. Nous avons transfecté des cellules HEK293 soit avec NKCC2 sauvage soit avec les deux mutants de Bartter en présence ou en absence de la ManIA, ([Figure 47](#)).

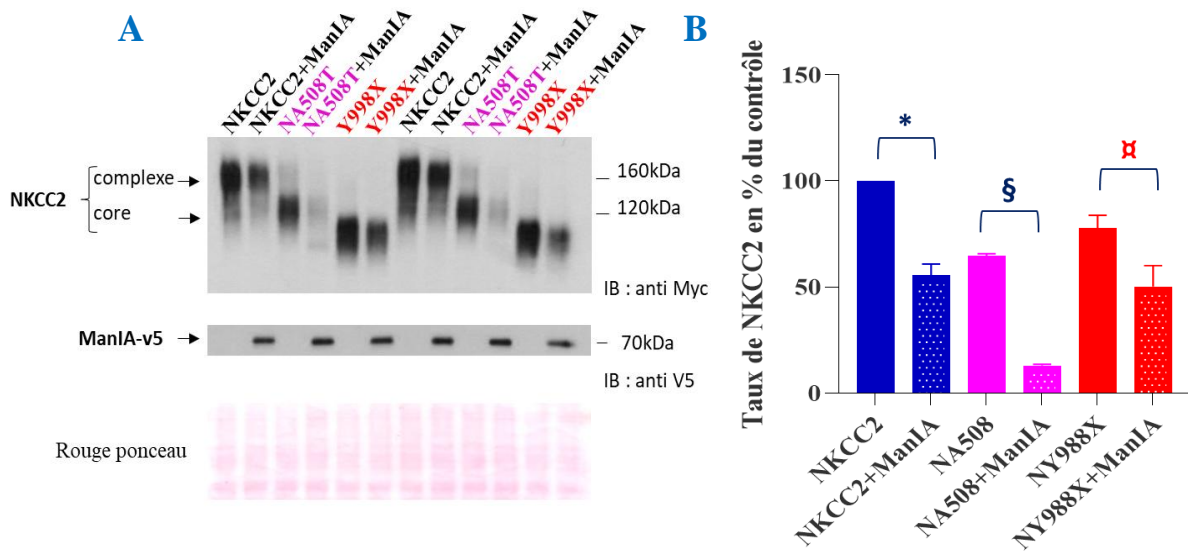


Figure 47 : Le mutant NKCC2 A508T est plus instable que NKCC2 sauvage en présence de la ManIA

A/Immunoblot. 200ng de NKCC2 ou des mutants A508T ou Y998X avec ou non 200ng de la ManIA par B40 ont été transfectés. A noter que le mutant Y998X est plus petit. B/ Quantification de l'immunoblot en A par Image J, normalisée sur le rouge ponceau. moyenne +/- SED d'une expérience réalisée en quadruplicate indépendante. Un histogramme de la quantification est représenté. T student bilatérale : * :p=0,0002. § :p<0,0001. ✕ : t student unilatéral p=0,0271.

A504T diminue fortement en présence de la ManIA et d'une manière supérieure à NKCC2 sauvage. La diminution chez le mutant Y998X est inférieure à celle du NKCC2 sauvage.

En absence de la ManIA, on observe des taux inférieurs pour les deux mutants par rapport à la forme sauvage de NKCC2. Pour les deux mutants, on observe également l'absence de maturation (ou un très faible taux de maturation pour la mutation A508T), ce qui indique une diminution de leur stabilité. En présence de la ManIA l'histogramme montre une forte diminution d'environ 80% du mutant A508T alors que NKCC2 sauvage ne diminue que de moins de 50%. (Figures 47A et 47B). L'effet de la ManIA sur le mutant Y998X est diminué par rapport au transporteur sauvage. Cela indique une efficacité moindre de la ManIA sur ce mutant par rapport à l'effet de l'enzyme sur NKCC2 sauvage.

Nous avons montré dans nos précédentes études au laboratoire que le mutant Y998X reste majoritairement localisé dans le RE. Ce manque d'efficacité sur le mutant Y998X pourrait s'expliquer par le fait que la transcription de la séquence du mutant n'est pas régulée. Elle est associée à un promoteur fort permettant la production de nombreux transcrits. La synthèse protéique abondante pourrait induire la fuite des protéines du RE vers le Golgi et/ou le pré-Golgi dans les vésicules du contrôle qualité EQRC où la ManIA pourrait se trouver et favoriser la rétention du mutant et le réorienter vers l'ERAD.

Le mutant A508T est extrêmement dégradé en présence de la ManIA (Figures 47A et 47B). Cela suggère fortement un défaut de repliement et une confirmation de l'implication de la ManIA dans l'ERAD de NKCC2 au niveau du cis golgi. En effet, l'immunoblot montre un

peu de forme complexe du mutant suggérant la présence de sa forme core glycosylé dans le Golgi. La maturation est probablement empêchée, et le mutant retenu à ce niveau peut être réorienté vers la voie de l'ERAD.

La ManIA interagit davantage avec le mutant NKCC2 A508X

Afin de vérifier la relevance des résultats précédents, nous avons étudié l'interaction de la ManIA avec deux mutants. Pour cela nous avons transfecté NKCC2, Y998X ou A508T avec ou sans la ManIA dans des cellules HEK293, et réalisé une immunoprécipitation de la ManIA à l'aide d'un anticorps anti-V5, (Figure 48).

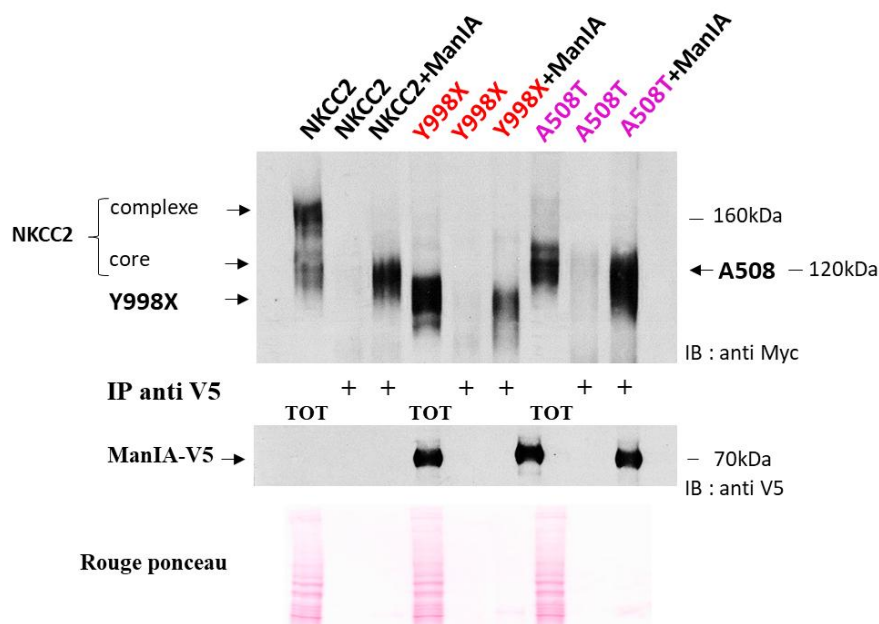


Figure 48 : La ManIA interagit davantage avec le mutant A508T et moins avec le mutant Y998X par rapport à la forme sauvage de NKCC2.

500 ng de NKCC2-Myc ou A508T-Myc ou Y998X-Myc ont été transfecté en présence ou non de 500ng de ManIA-V5 par B60. Ligne 1, 4 et 7 protéines totales des cellules transfectées par NKCC2, Y998X, A508T respectivement. Ligne 2, 5 et 8 immunoprécipitations anti-V5 des cellules transfectées par NKCC2, Y998X, A508T respectivement : contrôle négatif de l'interaction. Ligne 3, 6 et 9 immunoprécipitations anti-V5 des cellules transfectées par NKCC2, Y998X ou A508T et ManIA respectivement. L'immunoblot met en évidence une interaction entre la ManIA et NKCC2, et entre la ManIA et les deux mutants. IB : Immunoblot.

L'immunoblot montre une différence entre les deux mutants de NKCC2 et le cotransporteur sauvage. NKCC2 Y998X interagit moins avec la ManIA comparativement à NKCC2 sauvage (Figure 48). Ceci est cohérent avec à un effet de la ManIA moins important sur la dégradation de NKCC2 Y998X vu précédemment (Figure 47). A contrario l'interaction avec la ManIA pour le mutant A508T est très importante et supérieure au cotransporteur sauvage, en accord avec un effet important de la ManIA sur la dégradation du mutant A508T. Ces résultats

suggèrent que plus l'interaction de NKCC2 avec la ManIA est importante plus l'effet de la ManIA sur la dégradation du transporteur est important.

L'ensemble de ces résultats confirme l'importance de l'interaction dans l'effet de la ManIA avec NKCC2 pour son rôle dans l'ERAD et/ou de l'EGAD du cotransporteur. La ManIA préviendrait les anomalies de conformation de NKCC2 en hydrolysant le ou les mannoses dans les premières étapes de maturation et réoriente les protéines mal repliées vers la dégradation.

L'activité catalytique de la ManIA est dispensable dans l'ERAD et/ou l'EGAD de NKCC2

Pour déterminer l'importance du rôle de l'activité catalytique de la ManIA dans l'ERAD de NKCC2, l'inhibiteur des α 1,2 mannosidases ne réversant pas complètement son effet sur NKCC2 dans les cellules HEK(Figure 41) et l'interaction de la partie catalytique avec NKCC2 semblant importante pour son action (Figure 43), nous avons réalisé une transfection de NKCC2 ou de NKCC2 muté sur ses deux sites de glycosylation nommé DMG pour

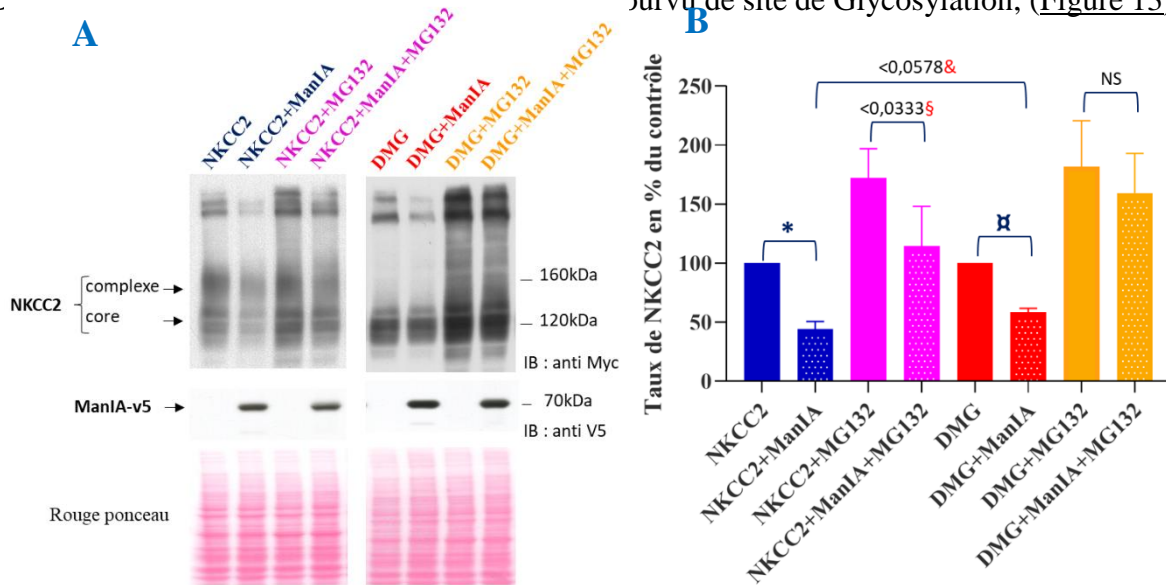


Figure 49 : **L'ERAD de NKCC2 ne passe pas forcément par la fonction de démannosylation de la ManIA**

A/ Immunoblot, représentant l'effet de la ManIA sur NKCC2 ou le DMG plus ou moins en présence de l'inhibiteur de protéasome. 200ng de NKCC2 (1099) ou DMG (1090) sont transfectées en présence de 200 ng de ManIA par B40. On observe que, comme pour NKCC2, le DMG est diminué en présence de la ManIA.

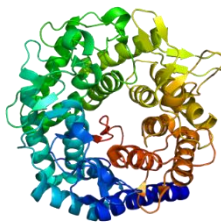
B/ Quantification de A, moyenne +/- SED d'une expérience réalisée en triplicata indépendant. L'effet de la ManIA est significatif pour NKCC2 et le DMG: *=# : p <0,0001. En présence de MG132 l'effet est totalement aboli pour le DMG, pour NKCC2 versus NKCC2 plus ManIA §= p<0,0333, montrant

une réversion presque totale. A noter qu'il existe une significativité proche entre NKCC2 plus ManIA versus DMG plus ManIA suggérant une efficacité plus grande de la ManIA sur NKCC2 par rapport au DMG. $\approx p=0,0578$ t student unilatéral.

Lorsque l'on compare l'effet de la ManIA sur les taux de NKCC2 et du mutant DMG, on note seulement une légère différence qui ne semble pas forcément significative. Nous avons vu précédemment que l'inhibition de l'activité catalytique des 7 mannosidases α 1, 2 par la kifunensine n'abolit pas complètement l'effet de la ManIA sur le taux de NKCC2 (Figure 42). Ceci suggère qu'un effet indépendant de l'activité catalytique des mannosidases existerait. L'inhibiteur du protéasome MG132 abolit l'action de la ManIA sur NKCC2. La dégradation de NKCC2 comme celle du DMG passe donc par la voie de L'ERAD. Nous savons que l'effet de la ManIA implique à la fois son domaine cytoplasmique et son domaine luminal, avec au moins deux interactions possibles avec NKCC2 dans les deux domaines. Il est possible que deux voies de dégradation médiées par la ManIA existent. Une voie qui n'est pas dépendante de la glycosylation de NKCC2 et une voie dépendante de celle-ci. Cependant on peut envisager une voie unique qui allie les deux possibilités. La déglycosylation est nécessaire pour la dégradation des protéines. La ManIA pourrait démannosyler avant de router NKCC2 vers l'ERAD.

Cette légère différence entre l'effet de la ManIA sur NKCC2 par rapport au DMG, suggère que la ManIA semble légèrement plus efficace dans l'ERAD du NKCC2 sauvage. Cela montrerait que la cinétique de l'action de la ManIA est ralentie et confirmerait la nécessité de démannosylation de NKCC2, au moins dans les HEK293. Le highmannose serait réduit à des intermédiaires pour permettre la dégradation de NKCC2 mal replié. La démannosylation semble dispensable pour la dégradation de NKCC2 puisque nous avons toujours un effet en présence de l'inhibiteur des α 1,2 mannosidases. Cela ouvre la porte à différents mécanismes possibles dans la voie de L'ERAD de NKCC2 dépendante de ManIA.

En conclusion, la voie de dégradation de l'ERAD et/ou de l'EGAD de NKCC2 régulée par la ManIA est dépendante de sa glycosylation. Il existerait deux voies indépendantes, l'une dépendante de la glycosylation et l'autre non. Il pourrait aussi exister une voie hybride alliant la déglycosylation médiée ou non par la ManIA et une implication de la ManIA via ses interactions protéine-protéine à la fois du côté cytoplasmique et du côté luminale impliquant la partie catalytique de l'hydrolase.



DISCUSSION

Le but de notre travail est de comprendre les mécanismes régissant la maturation, la dégradation et de la structure-fonction du transporteur NKCC2. En particulier nous cherchons à approfondir les connaissances dans la régulation du cotransporteur NKCC2 par les interactions protéine-protéine. A cette fin nous avons réalisé le crible double hybride de la partie C-terminale de NKCC2 spécifique de ce transporteur. En effet, la longue partie C-terminale de NKCC2 comporte les séquences de routage apicaux contrairement à son homologue NKCC1 qui est adressé à la membrane basolatérale (**Carmosino et al. 2008**).

Le crible double hybride a révélé en particulier une interaction entre la protéine **Mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase IA** (ManIA) et la partie C-terminale cytoplasmique de NKCC2. La ManIA est une hydrolase dont la fonction première est décrite comme étant l'hydrolyse des mannose du High mannose 9 synthétisé dans le reticulum endoplasmique (**Tabas et Kornfeld 1979**). La ManIA est aussi décrite comme étant, avec les deux autres hydrolases golgiennes ManIB et ManIC, impliquée dans l'ERAD de la protéine mutante null Hong Kong alpha1-antitrypsin (NHK) (**Hosokawa et al. 2007**). Les auteurs montrent que, dans des cellules HEK293, l'augmentation du taux des alpha 1,2-mannosidase Golgi IA, IB et IC accélère l'ERAD de la NHK définitivement mal repliée, ainsi que l'élimination des mannoses N-glycanes de la protéine. Cela est corrélé avec la localisation de la NHK dans le cis golgi, la NHK étant principalement localisée dans le RE.

Dans les cellules OKP et HEK 293 la ManIA colocalise avec GM130 mais pas avec la calnexine. Ceci signifie que la ManIA se trouve exclusivement dans le Golgi et plus particulièrement le cis Golgi, au moins dans ces deux lignées cellulaires rénales. NKCC2 colocalise avec la ManIA et GM130 dans les OKP et colocalise avec la ManIA dans les HEK293. De plus, NKCC2 interagit avec la ManIA dans les OKP et les HEK293. L'ensemble de ces résultats suggèrent que cette interaction se réalise au moins dans le cis Golgi et pas dans le réticulum endoplasmique.

NKCC2 se présente en immunoblot sous deux formes. D'après nos travaux antérieurs, la forme immature nommée core glycosylé, se trouve principalement dans le réticulum endoplasmique. La forme complexe glycosylée ou mature active se retrouve au niveau de la membrane plasmique ou dans des compartiments antérieurs post-Golgiens sous une forme inactive. Une augmentation de la quantité de la ManIA dans les cellules OKP et HEK diminue les deux formes de NKCC2. A contrario, le *Knock down* de la ManIA endogène permet une augmentation du taux du cotransporteur dans les cellules humaines embryonnaires rénales.

L'effet observé de la ManIA est dépendant en grande partie de l'activité catalytique de la ManIA. En effet, la kifunensine réduit celui-ci. L'inhibiteur du lysosome ne module pas l'action de la ManIA sur NKCC2, ce qui démontre que le lysosome n'est pas impliqué. En revanche, l'inhibiteur du protéasome MG132 abolit celui-ci. La ManIA est donc impliqué dans l'ERAD dépendant du réticulum endoplasmique et/ou de l'EGAD de NKCC2.

La voie de l'EGAD, récemment décrite (**Fonseca Daniel.al 2019**), présente des similitudes remarquables avec la voie de l'ERAD des protéines dans le réticulum endoplasmique. Elle opère dans les organelles post-ER via le protéasome et contribue en particulier à l'homéostasie des lipides dans les cellules eucaryotes.

Afin de mieux comprendre le rôle de la ManIA dans l'ERAD et/ou l'EGAD de NKCC2, nous avons construit deux mutants de l'hydrolase. Nous avons d'abord retiré la partie cytosolique afin de mieux cerner le rôle de celle-ci dans son effet sur NKCC2 sachant que la partie C-terminale de NKCC2 utilisé dans le crible double hybride est cytoplasmique. La partie cytosolique de l'enzyme est donc attendue comme zone d'interaction. Nous avons aussi retiré la partie catalytique afin de déterminer le rôle de celle-ci dans l'ERAD de NKCC2 médié par l'hydrolase Golgienne.

Les résultats montrent que la partie cytosolique de la ManIA interagit avec le core glycosylé NKCC2 et qu'elle est donc impliquée dans l'ERAD et/ou l'EGAD de NKCC2 au niveau du Golgi. La perte de la partie cytosolique de la ManIA entraîne une perte quantitative d'interaction avec NKCC2 et une réversion de l'effet de la ManIA sur le transporteur. Ceci montre la relevance de l'interaction trouvée dans le double hybride et la nécessité d'une interaction protéine-protéine cytosolique de NKCC2 avec la ManIA. Cette interaction est relative puisque la perte partielle de l'effet, conséquence de la perte d'interaction, montre la nécessité de la partie catalytique dans la diminution de NKCC2 médié par la présence de la ManIA. L'interaction avec la partie catalytique n'a pas pu être montré puisque aucun anticorps ne fonctionne sur cette partie. L'épitope consensus entre l'homme et la souris se trouve en amont de la partie catalytique pour l'anticorps anti-Mania de chez Sigma ou d'autres fournisseurs que nous avons testés. La zone consensus et le peptide d'immunisation commun entre les deux espèces est identique. Nous n'avons pas trouvé d'anticorps anti-ManIA de souris exclusive de la partie N-terminale de la ManIA incluant le stem domaine et le domaine d'insertion membranaire. L'anticorps dirigé contre cet épitope fonctionne sur la forme humaine car nous avons pu mettre en évidence l'interaction du core glycosylé de NKCC2 avec la ManIA endogène dans les HEK mais ne semble pas fonctionner avec la ManIA de souris. Il est donc possible qu'une interaction existe et implique un domaine en amont de la partie catalytique et en aval de l'épitope consensus homme/souris probablement dans le stem domaine.

L'absence de la partie cytosolique de la ManIA diminue très légèrement son effet sur le taux de NKCC2, par la perte partielle de l'interaction. Le pool de NKCC2 mature est légèrement

augmenté. Si on augmente la dose de Cytos, on observe que cette réversion se manifeste d'autant plus par rapport à l'augmentation du taux de la forme sauvage. La partie cytosolique de la ManIA semble impliqué dans une forme de rétention. Cette rétention maintiendrait le transporteur par exemple dans un check point du contrôle qualité qui pourrait se faire au niveau du cis Golgi et/ou entre le Golgi et le RE. La localisation de ce check point n'est pas déterminée à ce jour. La ManIA et ERman1 ont été retrouvés dans les vésicules du contrôle qualité (QVCs) (**Ogen-Shtern et al. 2016**). ERman1 a aussi été retrouvé dans le cis Golgi (**Pan et al. 2011**) et interagit avec la sous unité gamma de COP1. Nous retrouvons la ManIA dans le cis Golgi dans les OKP et dans le cis et le médian Golgi dans les HEK293 (**Figures 33 et 37**). La ManIA ne colocalise pas avec ERGIC 53, un marqueur de l'ERGIC (**Ogen-Shtern et al. 2016**). Cependant cette équipe a utilisé une ManIA taguée avec une protéine fluorescente cherry, une grosse molécule pouvant potentiellement conduire à une délocalisation. Elle peut elle-même subir un contrôle qualité dans ces vésicules. Ces travaux ont besoin d'une confirmation avec un autre tag ou des études de localisation de la ManIA endogène.

La stabilisation du core glycosylé de NKCC2 en présence du mutant Cytos ou son augmentation en présence du mutant Catax par rapport à la dégradation constatée en présence de la ManIA est probablement due à une diminution de l'efficacité du contrôle qualité au niveau du cis Golgi. Le mutant Cytos ne réverse que partiellement l'effet. Cela signifie qu'au moins le stem domaine et/ou la partie catalytique joue un rôle important dans l'ERAD et/ou l'EGAD de NKCC2.

L'augmentation du taux de la ManIA diminue d'environ 50% le taux de NKCC2. Cet effet, stable à 48 heures post transfection, suggère un mécanisme de régulation entre la maturation de NKCC2 et le contrôle qualité médié par la ManIA au niveau du cis Golgi. Le mutant Cytos montre une réversion significative du mature NKCC2 à 48 heures par rapport à la ManIA sauvage, sans que celle-ci ne soit totale. Cela confirme et démontre que la partie cytosolique limite la maturation de NKCC2 par son interaction et l'importance de la partie catalytique. Cet effet semble lent dans les HEK293. Cette stabilisation pourrait permettre d'améliorer le contrôle qualité et le tri des protéines mal repliées ayant échappé au contrôle qualité du RE. La ManIA ou les deux autres mannosidases Golgiennes pourraient alors démannosyler les protéines NKCC2 mal repliées au niveau du cis golgi et les réorienter vers le compartiment intermédiaire entre le Golgi et/ou le RE par un transport rétrograde. Les protéines mal repliées pourraient être à nouveau repliées par le système calnexine/calréticuline et d'autres molécules chaperonnes impliquées dans le repliement au niveau du RE et/ou être réorientées vers l'ERAD. Il est envisageable aussi qu'il n'y ait pas nécessité de revenir au RE pour le repliement. Celui-ci peut s'exercer soit dans les vésicules du contrôle qualité précédemment décrites ou dans l'ERGIC. Nous n'avons pas pu mettre en évidence d'interaction entre la sous unité gamma COP1 et la ManIA ou NKCC2. Il existe peu ou pas d'anticorps gamma COP1 validés pour l'immunoprécipitation à ce jour. Il est possible aussi que NKCC2 interagisse

avec une autre sous unité de COP1 pour un transport rétrograde régulé par la ManIA ou que NKCC2 passe par un autre type de vésicules encore non décrites à ce jour (Arvan et al. 2002). γ COP1 interagit avec ERman1 et a été retrouvé dans le cis Golgi (Pan et al. 2011). Nous pourrions émettre l'hypothèse d'une coopération entre ERman1 et la ManIA dans le contrôle qualité des protéines au niveau cis Golgien et la voie de l'EGAD.

L'ensemble de nos résultats décrit le rôle de la partie cytosolique de la ManIA comme un potentiel routeur dans l'ERAD et/ou l'EGAD de NKCC2 en limitant la maturation du transporteur et en permettant la dégradation de celui-ci par la protéine ManIA.

A 24 heures post transfection le mutant Catax reverse complètement l'effet de la ManIA. Il est possible que ce mutant n'interagisse plus du tout avec NKCC2. En effet la délétion de la partie catalytique pouvant entraîner une un mauvais repliement de la partie de l'enzyme restante, la rendant inefficace au niveau cytosolique. La perte d'interaction corrélée à la perte de l'effet montre clairement l'implication de la ManIA dans l'ERAD et/ou l'EGAD de NKCC2. De façon intéressante, à 48 heures post-transfection il semble y avoir un effet dominant négatif sur l'endogène la ManIA du mutant Catax même si celui-ci est statistiquement seulement proche de la significativité et n'est pas confirmé en dose réponse à moins de 24 heures ou 24 heures post-transfection. L'absence de la partie catalytique annule l'action la ManIA sur NKCC2 totalement à 24 et 48 heures. Comme nous ne pouvons pas savoir s'il y a toujours une interaction, on ne peut pas exclure le rôle du stem domain dans cette réversion. L'augmentation du complexe mature de NKCC2 en présence du mutant Catax semble montrer le blocage de la voie vers L'EGAD et/ou l'ERAD par absence d'interaction ou diminution de celle-ci et par absence de l'activité enzymatique.

La forme Catax en supprimant l'effet de la ManIA sauvage sur NKCC2 à 24 heures et 48 heures pour les deux formes montre donc que soit on a perdu l'interaction avec NKCC2 et l'effet est annulé de fait, soit il existe une interaction qui a lieu dans la partie catalytique et/ou la partie en amont de celle-ci, et est indispensable à L'ERAD et/ou L'EGAD de NKCC2 et/ou l'activité catalytique de la ManIA sur NKCC2 est inclus dans le mécanisme. Cette dernière hypothèse est la plus probable puisque la kifunensine, l'inhibiteur des mannosidases α 1,2 kifunensine, abolit l'effet de la ManIA dans les deux lignées rénales étudiées ici, montrant que la partie catalytique et l'hydrolyse des mannosés est directement impliqué dans l'ERAD et/ou l'EGAD de NKCC2.

L'ensemble de ces résultats confirme l'importance de l'interaction de la partie catalytique et/ou la partie en amont du la partie catalytique dans l'effet de la ManIA dans l'ERAD et/ou l'EGAD de NKCC2.

La ManIA pourrait jouer un rôle exclusivement dans le contrôle qualité et l'ERAD et/ou l'EGAD de NKCC2 ou pourrait aussi jouer un rôle additionnel dans l'hydrolyse du High

mannose 8 en position A et/ou les branches B et C comme les deux autres mannosidases Golgiennes.

Toutes les protéines NKCC2 mal repliées ayant échappées au RE et se situant au niveau cis Golgien implique que la ManIA va, soit déglycosyler celles-ci et les réorienter vers l'ERAD, soit simplement les rediriger directement vers le contrôle qualité sans déglycosylation, soit les orienter vers l'ERAD tout en étant déglycosylées par la ManIA, la ManIB, la ManIC, voire ERman1. Cette dernière ayant été localisée dans le cis Golgi. **(Pan et al. 2011) (Iannotti et al. 2014)**. Cela prouve qu'il y existe un contrôle qualité de NKCC2 au niveau de ce compartiment et que des protéines NKCC2 mal repliées échappent au contrôle qualité du RE et au cycle de la calnexine/calreticuline et à la réponse UPR (unfolded protein response).

Dans le cas du mutant A508T décrit chez l'homme atteint du syndrome de Bartter **(Vargas-Poussou et al. 1998) (Brochard et al. 2009)**, la maturation de NKCC2 A508T est très limitée et suggère une dégradation précoce due à un probable mauvais repliement. L'augmentation du taux de la ManIA chez les cellules HEK293 transfectées induit une forte dégradation de A508T. En comparaison le mutant Y998X tronqué par la mutation d'une alanine en position 998 générant un codon stop, diminue peu. Nous avons montré que le mutant Y998X est plus stable que NKCC2 sauvage et est retenu dans le RE. **(N. Zaarour et al. 2009)**. Y998X ne peut sortir du RE en raison de l'absence du motif de sortie 1081LLV1083 et des motifs 1038LL1039 et 1048LI1049 décrits dans les travaux du laboratoire qui démontrent leurs importances dans le routage des transporteurs chlore inter-espèces, vers la maturation membranaire via le Golgi, **(N. Zaarour et al. 2009) (Nancy Zaarour et al. 2012)**. En présence de la ManIA les deux mutants sont instables, probablement pour deux raisons différentes. Leur dégradation est donc accélérée. Les deux peuvent échapper au contrôle qualité et à la dégradation au niveau du RE. La ManIA est beaucoup moins efficace sur le mutant Y998X, pourtant la présence de l'enzyme augmente légèrement sa dégradation. La ManIA étant exclusivement localisée dans le Golgi, ceci suggère qu'une partie du mutant Y998X sort probablement du RE et se retrouverait dans le cis-Golgi où il serait stoppé par la ManIA et réorientée vers la voie de l'ERAD via le RE ou de l'EGAD. Il pourrait aussi se retrouver dans les vésicules du contrôle qualité **(Ogen-Shtern et al. 2016)**, puis être réorienté vers la maturation dans le cis golgi ou dégradé via le mécanisme de l'ERAD. En accord avec cette hypothèse, l'interaction de la ManIA avec le mutant NKCC2Y998X est très diminuée par rapport au mutant A508T. Cependant, on ne peut pas exclure que la faible interaction de la ManIA avec Y998X soit due à l'absence des 101 derniers acides aminés. En effet cette perte peut aussi entraîner un défaut de conformation au moins dans la partie C-terminale. A contrario, le mutant A508T est extrêmement dégradé. L'interaction avec la ManIA pour le mutant A508T est très supérieure au cotransporteur sauvage, en accord avec un effet important de la ManIA sur le mutant A508T. Nous avons observé que plus l'interaction avec la ManIA est importante plus l'effet de la ManIA est important. L'ensemble de ces résultats confirme un défaut de repliement du mutant A508T. L'hypothèse serait que la ManIA et/ou,

les autres α 1,2 mannosidases ne pourraient donc pas générer les modifications post traductionnelles et en particulier la démannosylation nécessaire à la maturation de NKCC2 muté. L'immunoblot montre des traces de complexe pour le mutant A508T. Il existe donc une grande probabilité pour que le mutant A508T sorte du RE et se retrouve dans le Golgi. De la même façon, au niveau du cis Golgi, la ManIA réoriente A508T vers la voie de dégradation de l'EGAD, c'est-à-dire directement vers le protéasome à la sortie du Golgi, ou celle de l'ERAD, lorsque la voie antérograde passe à nouveau vers le RE via COP1 ou d'autres vésicules.

La kifunensine ne reverse que de 60 à 80% l'effet de la ManIA sur NKCC2, ce qui signifie qu'un effet indépendant de l'activité catalytique des mannosidases existerait également et que l'activité mannosidase est nécessaire mais dispensable dans la voie de l'EGAD et/l'ERAD de NKCC2. A ce jour, deux sites de glycosylation ont été identifiés sur le transporteur. NKCC2 a été muté sur les deux sites asparagines en position (N442Q, N452Q). Ce mutant DMG est diminué d'une manière significative en présence de la ManIA. La ManIA agit donc sur le contrôle qualité du DMG au niveau du cis Golgi sans différence d'efficacité significative par rapport à la forme sauvage de NKCC2 (la tendance est à plus d'efficacité de la ManIA sur le contrôle qualité de NKCC2 sauvage). Cela signifie aussi que l'absence de glycosylation n'empêche pas le routage vers le cis Golgi au moins partiellement. Il est possible que comme dans le cas du Mutant Y998X, le contrôle qualité du RE et les mécanismes de l'UPR ne soient pas suffisants pour dérouter tout le DMG directement vers l'ERAD à la sortie du RE. La transfection peut générer le stress du reticulum endoplasmique en raison d'une quantité anormale de synthèse dans celui-ci par la présence importante d'ARN messager produit à partir des plasmides transfectés. En effet, en étant sous la gouvernance du promoteur fort CMV (Cytomégalo virus), la transcription de ces ARN étrangers n'est pas régulée. Le mutant DMG est probablement dans une conformation proche ou identique au NKCC2 sauvage. En présence de MG132 l'effet de la ManIA sur le mutant DMG est totalement abrogé. Cela montre que la dégradation du DMG en présence la ManIA s'exerce par le protéasome et que la Voie de L'ERAD et /ou de l'EGAD est mobilisée. La ManIA engage donc dans la voie de l'ERAD et/ou de l'EGAD, NKCC2 sauvage, ses mutants mal repliés et les protéines NKCC2 anormales orientées vers le cis Golgi après échappement au contrôle qualité du RE.

La voie mise en évidence ici, via l'effet de la ManIA sur le DMG, montre que la glycosylation de NKCC2 est dispensable pour que la dégradation du transporteur muté soit induite. Cette voie particulière est aussi mise en évidence par le fait que malgré la nécessité du clivage des mannoses montré par l'impact de l'inhibition des α 1,2 mannosidases dans l'effet de la ManIA sur NKCC2, nous avons toujours un effet résiduel de celle-ci sur le transporteur sauvage, (**Figures 34, 35**). Cette voie existe pour EDEM 1 au niveau de l'ERGIC et est corrélée à une augmentation de l'UPR en conditions de transfections transitoires dans les HEK293 et les NIH 3T3 (**Ron et al. 2011**). Il y aurait donc deux possibilités qui pourraient être corrélées à l'état physiologique de la cellule. Une première voie dépendante de l'état de glycosylation et de l'élagage des mannoses au niveau du cis Golgi, et une voie indépendante

de l'état de glycosylation en conditions de stress du RE. L'action de la ManIA dans la voie de l'ERAD et/ou l'EGAD peut aussi nécessiter une démannosylation optionnelle préalable qui peut être opérée par elle-même ou par d'autres α 1,2 mannosidases. La ManIA semble légèrement plus efficace dans l'ERAD de NKCC2 par rapport au DMG, ce qui montre non seulement que la démannosylation est nécessaire au mécanisme mais pourrait aussi suggérer que la présence de mannose serait un atout à l'ERAD et/ou l'EGAD dans les cellules HEK293. Il est probable que la démannosylation soit nécessaire avant le retour antérograde vers le contrôle qualité du RE ou la réorientation vers l'ERAD.

Récemment il a été montré que le Golgi dispose d'un contrôle qualité et donc d'un mécanisme de triage conduisant à l'élimination des protéines anormales. Plusieurs voies post-RE de contrôle de la qualité des protéines existent. Les protéines non natives peuvent être acheminées du Golgi vers le RE pour ensuite éventuellement être corrigées dans leur repliement, puis réorientées vers le cis golgi via COP2, ou, si elles sont définitivement mal repliées, orientées vers la voie de l'ERAD. Elles peuvent apparaître parfois brièvement au niveau de la membrane plasmique où dans la plupart des cas elles sont dégradées par les voies lysosomales. Nous démontrons ici que le contrôle qualité du cotransporteur NKCC2 au niveau du cis Golgi est médié, tout ou en partie, par l'hydrolase ManIA, **Figure 50**.

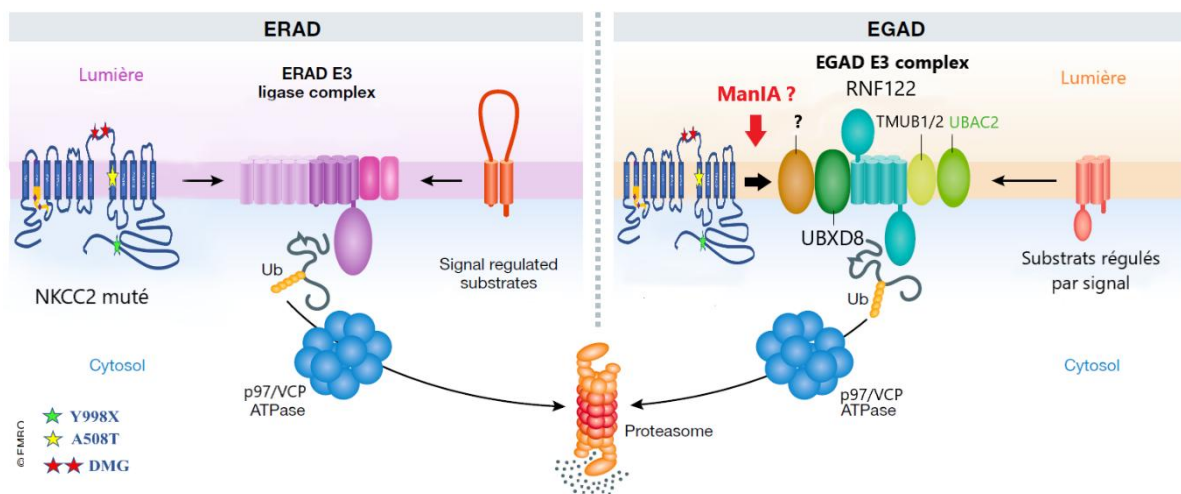


Figure 50 : Hypothèse de régulation de NKCC2 via l'ERAD versus l'EGAD chez l'homme

NKCC2 muté est présenté par des chaperonnes au complexe E3 ligase respectif soit au niveau du RE pour l'ERAD soit au niveau du golgi pour l'EGAD. Le mécanisme de rétrotranslocation se déroule et la protéine ubiquitinylée est dégradée par le protéasome. Modifié à partir des propositions de (Schmidt et al. 2019), les protéines de la levures composant l'EGAD E3 complexe ayant été remplacées par les équivalents proposés chez l'homme, sous unités de l'E3 ligase complexe Levure/homme : Ubx3/UBXD8. Dsc3/TMUB1/2. Dsc2/UBAC2. TUL1/RNF22. CdC48ATPase/P97/VCPATPase. Illustration modifiée et adaptée à NKCC2 d'après (Fonseca et Carvalho 2019).

Ce contrôle qualité n'est pas dépendant de la glycosylation du transporteur mais peut y être associé dans les cellules rénales HEK293 et OKP. La ManIA est exclusivement localisée au niveau du cis Golgi et sans toute d'une manière transitoire au niveau du trans Golgi au moins dans les cellules HEK293. La ManIA reconnaissant NKCC2 mal replié seul ou associées à

d'autres chaperonnes réoriente le cotransporteur vers les vésicules du transport antérograde. Ces vésicules incluent COP1 mais pas uniquement. Deux possibilités débouchent sur la dégradation de NKCC2 mal repliés par la voie de l'ERAD : soit les vésicules transportent NKCC2 vers l'ERGIC afin d'y être replié à nouveau par le complexe calnexine/calreticuline, soit via le mécanisme de l'EGAD les protéines sont directement conduites au protéasome pour y être dégradées. Au niveau de l'ERGIC deux possibilités se présentent : soit le transporteur nouvellement replié est acheminé via COP 2 vers le cis Golgi pour y être maturé, soit il est définitivement mal replié et orienté vers L'ERAD via le mécanisme de rétrotranslocation et l'ubiquitine E3.

NKCC2 est localisé à la fois dans le RE où il est synthétisé, dans les voies maturation et à la membrane plasmique. En présence de la ManIA, on observe une colocalisation de la calnexine avec NKCC2 qui semble augmentée et une diminution de son taux à la membrane plasmique. D'une manière similaire à nos résultats antérieurs, la ManIA montre une rétention de NKCC2 au niveau du RE et alors lorsqu'il est transfecté seul, NKCC2 est principalement membranaire (N. Zaarour et al. 2009) (Nancy Zaarour et al. 2012) (Seaayfan et al. 2016), ce qui va dans le sens d'un contrôle qualité médié par la ManIA par un transport rétrograde du Golgi vers le RE et d'un retour au contrôle qualité à ce niveau. La voie de l'ERAD semble donc privilégiée dans ce cas ce qui n'exclut pas la sollicitation en parallèle de la voie de l'EGAD.

CONCLUSION

La technique du crible double hybride nous a permis de mettre en évidence une nouvelle interaction spécifique entre la ManIA et le cotransporteur NKCC2.

La ManIA colocalise et interagit avec NKCC2 au niveau du Cis-Golgi dans les cellules rénales *in vitro*.

La ManIA favorise la dégradation de la forme sauvage de NKCC2 et des mutants de Bartter de type 1.

L'effet de la ManIA sur NKCC2 implique sa partie cytoplasmique et sa partie luminale et catalytique.

La ManIA contribue à l'ERAD de NKCC2 via une interaction protéine-protéine, en favorisant la rétention et le recyclage des protéines mal repliées au niveau du Cis-Golgi, et prévient les anomalies de conformation de NKCC2 d'une manière dépendante et indépendante de la N-glycosylation.

L'ensemble de ces résultats démontre l'existence d'un rôle crucial de la mannosidase Golgienne, alpha1,2-Mannosidase IA, ManIA et son rôle dans l'ERAD du cotransporteur NKCC2 (Figure 51).

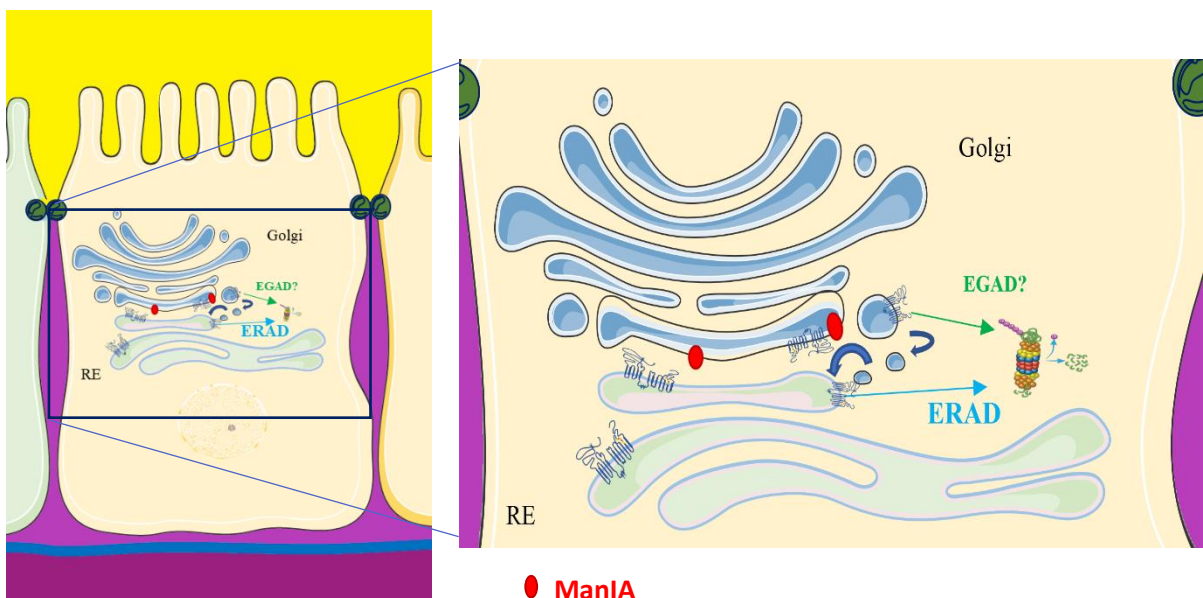


Figure 51 : Proposition de régulation de l'ERAD de NKCC2 par la ManIA

L'image de gauche est une vue d'ensemble et celle de droite un agrandissement. La voie de dégradation commence par la reconnaissance de NKCC2 sauvage mal replié ou de ses mutants par l'enzyme Golgienne. La ManIA va permettre le transport rétrograde de NKCC2 mal replié. Les mutants retournent ensuite au ERCQ puis sont dirigés vers le protéasome pour être dégradés.

PERSPECTIVES

Afin de mieux comprendre les mécanismes qui régissent l'ERAD de NKCC2, des expériences seront entreprises pour déterminer l'implication de la ManIA dans le routage du transport rétrograde de NKCC2 du Golgi vers le reticulum endoplasmique. En particulier, nous chercherons à mettre en évidence la relation du cotransporteur avec les vésicules COP1s, connues pour ce transport. COP1 est un complexe qui enrobe l'extrémité du cis-golgi et forme le manteau des vésicules. Celles-ci sont ensuite adressées au réticulum endoplasmique. Les COP1s sont constituées de sept sous-unités protéiques différentes, α , β , β' , γ , δ , ε et ζ . Il est très difficile de déterminer avec quelle sous unité NKCC2 peut interagir mais les deux sous unités décrites pour interagir avec les protéines candidates sont les sous unités COPI α -COP and β' -COP. Les protéines contenant les motifs de tri KKXX et KXXXX interagissent avec COPI afin de former ces vésicules qui sont ensuite transportées du cis-Golgi vers le RE (**Ma et Goldberg 2013**). Les motifs types KKXX ont été trouvés dans la queue cytoplasmique de plusieurs protéines transmembranaires. Ce sont de motifs de rétention et leurs mutations pourraient permettre la restauration de mutants retenus dans le RE, en empêchant le transport rétrograde via COP1. D'une manière intéressante, ces motifs existent aussi au niveau de la queue C-terminale de NKCC2. Nous chercherons donc l'éventuelle implication de ces motifs de rétention dans le transport rétrograde du cis-Golgi vers le RE qui est induit par la ManIA sur le co-transporteur .

Nous avons découvert la mannosidase Golgienne la ManIA comme nouvel acteur impliqué dans l'ERAD de NKCC2. Nous avons aussi démontré précédemment que les deux protéines OS9 et STCH sont impliquées dans le contrôle qualité et la dégradation du cotransporteur. Cela nous invite à rechercher les coopérations éventuelles entre ces chaperonnes moléculaires déjà identifiées pour mieux comprendre les mécanismes de l'ERAD de NKCC2. En particulier le knock-down simultané de ces partenaires pourrait permettre une meilleure maturation de NKCC2 et de ses mutants en limitant leur dégradation. Cela pourrait ouvrir des pistes dans la maturation des mutants de Bartter et la restauration de leur présence à la membrane cellulaire.

D'autre part, le crible double hybride a identifié d'autres protéines impliquées dans toutes les étapes de maturation, la stabilisation, la dégradation, et le recyclage à la membrane. Autant de

pistes d'étude importantes pour la compréhension du fonctionnement de ce cotransporteur associé à la régulation de la pression artérielle sensible au sel médié par le rein.

BIBLIOGRAPHIE

Ares Gustavo R., Paulo S. Caceres, et Pablo A. Ortiz. 2011a. « Molecular regulation of NKCC2 in the thick ascending limb ». *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 301 (6): F1143- 59. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00396.2011>.

———. 2011b. « Molecular regulation of NKCC2 in the thick ascending limb ». *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 301 (6): F1143- 59. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00396.2011>.

Ares Gustavo R., Mohammed Z. Haque, Eric Delpire, et Pablo A. Ortiz. 2012. « Hyperphosphorylation of Na-K-2Cl Cotransporter in Thick Ascending Limbs of Dahl Salt-Sensitive Rats ». *Hypertension* 60 (6): 1464- 70. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.112.202101>.

Ares Gustavo R., et Pablo A. Ortiz. 2012. « Dynamin2, Clathrin, and Lipid Rafts Mediate Endocytosis of the Apical Na/K/2Cl Cotransporter NKCC2 in Thick Ascending Limbs* ». *Journal of Biological Chemistry* 287 (45): 37824- 34. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.386425>.

Arvan Peter, Xiang Zhao, Jose Ramos-Castaneda, et Amy Chang. 2002. « Secretory Pathway Quality Control Operating in Golgi, Plasmalemmal, and Endosomal Systems ». *Traffic* 3 (11): 771- 80. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2002.31102.x>.

Bakhos-Douaihy Dalal, Elie Seayfan, Sylvie Demaretz, Martin Komhoff, et Kamel Laghmani. 2021. « Differential Effects of STCH and Stress-Inducible Hsp70 on the Stability and Maturation of NKCC2 ». *International Journal of Molecular Sciences* 22 (février): 2207. <https://doi.org/10.3390/ijms22042207>.

Bambola Oluwatoyin Fatai, et Youssef Ahmed. 2021. « Differential diagnosis of perinatal Bartter, Bartter and Gitelman syndromes ». *Clinical Kidney Journal* 14 (1): 36- 48. <https://doi.org/10.1093/ckj/sfaa172>.

Bartter Frederic C, Pacita Pronove, John R. Gill, et Ross C. MacCardle. 1962. « Hyperplasia of the Juxtaglomerular Complex with Hyperaldosteronism and Hypokalemic Alkalosis: A New Syndrome ». *The American Journal of Medicine* 33 (6): 811- 28. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(62\)90214-0](https://doi.org/10.1016/0002-9343(62)90214-0).

- Benziene Boubacar**, Sylvie Demaretz, Nadia Defontaine, Nancy Zaarour, Lydie Cheval, Soline Bourgeois, Christophe Klein, et al. 2007. « NKCC2 surface expression in mammalian cells: down-regulation by novel interaction with aldolase B ». *The Journal of biological chemistry* 282 (décembre): 33817- 30. <https://doi.org/10.1074/jbc.M700195200>.
- Borschewski Aljona**, Nina Himmerkus, Christin Boldt, Katharina I. Blankenstein, James A. McCormick, Rebecca Lazelle, Thomas E. Willnow, et al. 2016. « Calcineurin and Sorting-Related Receptor with A-Type Repeats Interact to Regulate the Renal Na⁺-K⁺-2Cl⁻ Cotransporter ». *Journal of the American Society of Nephrology* 27 (1): 107- 19. <https://doi.org/10.1681/ASN.2014070728>.
- Brochard Karine**, Olivia Boyer, Anne Blanchard, Chantal Loirat, Patrick Niaudet, Marie-Alice Macher, Georges Deschenes, et al. 2009. « Phenotype–genotype correlation in antenatal and neonatal variants of Bartter syndrome ». *Nephrology Dialysis Transplantation* 24 (5): 1455- 64. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfn689>.
- Caceres Paulo S.**, Mariela Mendez, et Pablo A. Ortiz. 2014. « Vesicle-Associated Membrane Protein 2 (VAMP2) but Not VAMP3 Mediates CAMP-Stimulated Trafficking of the Renal Na⁺-K⁺-2Cl⁻ Co-Transporter NKCC2 in Thick Ascending Limbs* ». *Journal of Biological Chemistry* 289 (34): 23951- 62. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.589333>.
- Monica Carmosino**, Andrea Gerbino, Geoffrey N. Hendy, Silvia Torretta, Federica Rizzo, Lucantonio Debellis, Giuseppe Procino and Maria Svelto. 2015. «NKCC2 activity is inhibited by the Bartter’s syndrome type 5 gain-of-function CaR-A843E mutant in renal cells». *Biol. Cell* (2015) **107**, 98–110 DOI: 10.1111/boc.201400069
- Carmosino Monica**, Ignacio Giménez, Michael Caplan, et Biff Forbush. 2008. « Exon Loss Accounts for Differential Sorting of Na-K-Cl Cotransporters in Polarized Epithelial Cells ». *Molecular Biology of the Cell* 19 (10): 4341- 51. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-05-0478>.
- Carmosino Monica**, Federica Rizzo, Giuseppe Procino, Davide Basco, Giovanna Valenti, Biff Forbush, Nicole Schaeren-Wiemers, Michael J. Caplan, et Maria Svelto. 2010. « MAL/VIP17, a New Player in the Regulation of NKCC2 in the Kidney ». *Molecular Biology of the Cell*, septembre. <https://doi.org/10.1091/mbc.e10-05-0456>.
- Carmosino Monica**, Federica Rizzo, Giuseppe Procino, Lello Zolla, Anna Maria Timperio, Davide Basco, Claudia Barbieri, Silvia Torretta, et Maria Svelto. 2012. « Identification of Moesin as NKCC2-Interacting Protein and Analysis of Its Functional Role in the NKCC2 Apical Trafficking ». *Biology of the Cell* 104 (11): 658- 76. <https://doi.org/10.1111/boc.201100074>.
- Carmosino Monica**, Procino* Giuseppe and Svelto Maria. 2012. « Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter type 2 trafficking and activity: The role of interacting proteins ». *Biol. Cell* (2012) **104**, 201–212 DOI: 10.1111/boc.201100049
- Castrop Hayo**, et Ina Maria Schießl. 2014. « Physiology and Pathophysiology of the Renal Na-K-2Cl Cotransporter (NKCC2) ». *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 307 (9): F991- 1002. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00432.2014>.

- Cole J. A. L. R.** Forte, W. J. Krause, et P. K. Thorne. 1989. « Clonal Sublines That Are Morphologically and Functionally Distinct from Parental OK Cells ». *The American Journal of Physiology* 256 (4 Pt 2): F672-679. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1989.256.4.F672>.
- Dathe Christin**, Anna-Lena Daigeler, Wenke Seifert, Vera Jankowski, Ralf Mrowka, Ronny Kalis, Erich Wanker, Kerim Mutig, Sebastian Bachmann, et Alexander Paliege. 2014. « Annexin A2 Mediates Apical Trafficking of Renal Na⁺-K⁺-2Cl⁻ Cotransporter* ». *Journal of Biological Chemistry* 289 (14): 9983- 97. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.540948>.
- Davies Matthew**, Scott A. Fraser, Sandra Galic, Suet-Wan Choy, Marina Katerelos, Kurt Gleich, Bruce E. Kemp, Peter F. Mount, et David A. Power. 2014. « Novel Mechanisms of Na⁺ Retention in Obesity: Phosphorylation of NKCC2 and Regulation of SPAK/OSR1 by AMPK ». *American Journal of Physiology. Renal Physiology* 307 (1): F96- 106. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00524.2013>.
- Delpire Eric**, et Kenneth B. Gagnon. 2018. « Na⁺ -K⁺ -2Cl⁻ Cotransporter (NKCC) Physiological Function in Nonpolarized Cells and Transporting Epithelia ». In *Comprehensive Physiology*, édité par Ronald Terjung, 871- 901. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/cphy.c170018>.
- Estévez Raúl**, Thomas Boettger, Valentin Stein, Ralf Birkenhäger, Edgar Otto, Friedhelm Hildebrandt, et Thomas J. Jentsch. 2001. « Barttin Is a Cl⁻ Channel β -Subunit Crucial for Renal Cl⁻ Reabsorption and Inner Ear K⁺ Secretion ». *Nature* 414 (6863): 558- 61. <https://doi.org/10.1038/35107099>.
- Fazilaty Hassan**, et Babak Behnam. 2014. « Molecular Genetics of Bartter Syndrome ». *Journal of Pediatric Nephrology* 2 (1): 6- 14. <https://doi.org/10.22037/jpn.v2i1.5610>.
- Fonseca Daniel**, et Pedro Carvalho. 2019. « EGAD! There is an ERAD doppelganger in the Golgi ». *The EMBO Journal* 38 (15): e102679. <https://doi.org/10.15252/emj.2019102679>.
- Fraser Scott A.**, Ignacio Gimenez, Natasha Cook, Ian Jennings, Marina Katerelos, Frosa Katsis, Vicki Levidiotis, Bruce E. Kemp, et David A. Power. 2007. « Regulation of the renal-specific Na⁺-K⁺-2Cl⁻ co-transporter NKCC2 by AMP-activated protein kinase (AMPK) ». *Biochemical Journal* 405 (Pt 1): 85- 93. <https://doi.org/10.1042/BJ20061850>.
- Gamba G.**, A. Miyanoshita, M. Lombardi, J. Lytton, W. S. Lee, M. A. Hediger, et S. C. Hebert. 1994. « Molecular Cloning, Primary Structure, and Characterization of Two Members of the Mammalian Electroneutral Sodium-(Potassium)-Chloride Cotransporter Family Expressed in Kidney ». *Journal of Biological Chemistry* 269 (26): 17713- 22. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)32499-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)32499-7).
- Gamba Gerardo**. 2005. « Molecular Physiology and Pathophysiology of Electroneutral Cation-Chloride Cotransporters ». *Physiological Reviews* 85 (2): 423- 93. <https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2004>.
- Giménez Ignacio**, et Biff Forbush. 2007. « The Residues Determining Differences in Ion Affinities among the Alternative Splice Variants F, A, and B of the Mammalian Renal Na-K-Cl Cotransporter (NKCC2) ». *The Journal of Biological Chemistry* 282 (9): 6540- 47. <https://doi.org/10.1074/jbc.M610780200>.

Graham F. L., J. Smiley, W. C. Russell, et R.YR 1977 Nairn. s. d. « Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5 ». *Journal of General Virology* 36 (1): 59- 72. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-36-1-59>.

Guerriero Christopher J., et Jeffrey L. Brodsky. 2012. « The Delicate Balance Between Secreted Protein Folding and Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation in Human Physiology ». *Physiological Reviews* 92 (2): 537- 76. <https://doi.org/10.1152/physrev.00027.2011>.

Herscovics Annette. 2001. « Structure and function of Class I α 1,2-mannosidases involved in glycoprotein synthesis and endoplasmic reticulum quality control ». *Biochimie* 83 (8): 757- 62. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(01\)01319-0](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(01)01319-0).

Hosokawa Nobuko, Zhipeng You, Linda O. Tremblay, Kazuhiro Nagata, et Annette Herscovics. 2007. « Stimulation of ERAD of misfolded null Hong Kong α 1-antitrypsin by Golgi α 1,2-mannosidases ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 362 (3): 626- 32. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.08.057>.

Iannotti Michael J., Lauren Figard, Anna M. Sokac, et Richard N. Sifers. 2014. « A Golgi-localized Mannosidase (MAN1B1) Plays a Non-enzymatic Gatekeeper Role in Protein Biosynthetic Quality Control ». *The Journal of Biological Chemistry* 289 (17): 11844- 58. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.552091>.

Igarashi P., G. B. Vanden Heuvel, J. A. Payne, et B. Forbush. 1995. « Cloning, embryonic expression, and alternative splicing of a murine kidney-specific Na-K-Cl cotransporter ». *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 269 (3): F405- 18. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1995.269.3.F405>.

Jaykumar Ankita Bachhawat, Paulo S. Caceres, Keyona N. King-Medina, Tang-Dong Liao, Indrani Datta, Dipak Maskey, Jürgen K. Naggert, Mariela Mendez, William H. Beierwaltes, et Pablo A. Ortiz. 2018. « Role of Alström syndrome 1 in the regulation of blood pressure and renal function ». *JCI Insight* 3 (21). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.95076>.

Jaykumar Ankita Bachhawat, Paulo S. Caceres, Ibrahim Sablaban, Bakhos A. Tannous, et Pablo A. Ortiz. 2016. « Real-Time Monitoring of NKCC2 Endocytosis by Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF) Microscopy ». *American Journal of Physiology. Renal Physiology* 310 (2): F183-191. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00104.2015>.

Kinoshita Yuka, Michiko Hori, Manabu Taguchi, Sumiyo Watanabe, et Seiji Fukumoto. 2014. « Functional Activities of Mutant Calcium-Sensing Receptors Determine Clinical Presentations in Patients With Autosomal Dominant Hypocalcemia ». *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 99 (2): E363- 68. <https://doi.org/10.1210/jc.2013-3430>.

Kömhoff Martin, et Kamel Laghmani. 2017. « Pathophysiology of Antenatal Bartter's Syndrome ». *Current opinion in nephrology and hypertension* 26 (juin). <https://doi.org/10.1097/MNH.0000000000000346>.

———. 2018. « MAGED2: A novel form of antenatal Bartter's syndrome ». *Current opinion in nephrology and hypertension* In press (avril). <https://doi.org/10.1097/MNH.0000000000000422>.

Koyama H., C. Goodpasture, M. M. Miller, R. L. Teplitz, et A. D. Riggs. 1978. « Establishment and Characterization of a Cell Line from the American Opossum (Didelphys Virginiana) ». *In Vitro* 14 (3): 239- 46. <https://doi.org/10.1007/BF02616032>.

- Laghmani Kamel**, Bodo Beck, Sung-Sen Yang, Elie Seayfan, Andrea Wenzel, Björn Reusch, Helga Vitzthum, et al. 2016. « Polyhydramnios, Transient Antenatal Bartter's Syndrome, and MAGED2 Mutations ». *New England Journal of Medicine* 374 (avril). <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1507629>.
- Leitman Julia**, Efrat Ron, Navit Ogen-Shtern, et Gerardo Z. Lederkremer. 2013. « Compartmentalization of Endoplasmic Reticulum Quality Control and ER-Associated Degradation Factors ». *DNA and Cell Biology* 32 (1): 2- 7. <https://doi.org/10.1089/dna.2012.1889>.
- Ma Wenfu**, et Jonathan Goldberg. 2013. « Rules for the recognition of dilysine retrieval motifs by coatomer ». *The EMBO Journal* 32 (7): 926- 37. <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.41>.
- Mahmood Syed S.**, Daniel Levy, Ramachandran S. Vasan, et Thomas J. Wang. 2014. « The Framingham Heart Study and the Epidemiology of Cardiovascular Disease: A Historical Perspective ». *The Lancet* 383 (9921): 999- 1008. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61752-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61752-3).
- Marcoux Andree- Anne**, Laurence E. Tremblay, Samira Slimani, Marie- Jeanne Fiola, Fabrice Mac- Way, Alexandre P. Garneau, et Paul Isenring. 2021. « Molecular characteristics and physiological roles of Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransporter 2 ». *Journal of Cellular Physiology* 236 (3): 1712- 29. <https://doi.org/10.1002/jcp.29997>.
- Mehrtash Adrian B.**, et Mark Hochstrasser. 2019. « Ubiquitin-Dependent Protein Degradation at the Endoplasmic Reticulum and Nuclear Envelope ». *Seminars in Cell & Developmental Biology* 93 (septembre): 111- 24. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2018.09.013>.
- Moremen Kelley**. 2014. « Mannosidase, alpha, class 1 (MAN1A1 (Golgi α -mannosidase IA), Man1A2 (Golgi α -mannosidase IB), MAN1B1(ER α -mannosidase I), MAN1C1 (Golgi α -mannosidase IC) ». In *Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes, Second Edition*, 1297- 1312. https://doi.org/10.1007/978-4-431-54240-7_84.
- Mount David B.** 2006. « Membrane trafficking and the regulation of NKCC2 ». *Am J Physiol Renal Physiol* 290: F606-F607, 2006; doi:10.1152/ajprenal.00410.2005.
- Mutig Kerim**. 2017. « Trafficking and regulation of the NKCC2 cotransporter in the thick ascending limb ». *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 26 (5): 392- 97. <https://doi.org/10.1097/MNH.0000000000000351>.
- Mutig Kerim**, Tordis Borowski, Christin Boldt, Aljona Borschewski, Alexander Paliege, Elena Popova, Michael Bader, et Sebastian Bachmann. 2016. « Demonstration of the functional impact of vasopressin signaling in the thick ascending limb by a targeted transgenic rat approach ». *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 311 (2): F411- 23. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00126.2016>.
- Needham Patrick G.**, et Jeffrey L. Brodsky. 2013. « How Early Studies on Secreted and Membrane Protein Quality Control Gave Rise to the ER Associated Degradation (ERAD) Pathway: The Early History of ERAD ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, Functional and structural diversity of the endoplasmic reticulum, 1833 (11): 2447- 57. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.03.018>.

Ogen-Shtern Navit, Edward Avezov, Marina Shenkman, Ron Benyair, et Gerardo Z. Lederkremer. 2016. « Mannosidase IA Is in Quality Control Vesicles and Participates in Glycoprotein Targeting to ERAD ». *Journal of Molecular Biology* 428 (16): 3194- 3205. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.04.020>.

Olivari Silvia, et Maurizio Molinari. 2007. « Glycoprotein Folding and the Role of EDEM1, EDEM2 and EDEM3 in Degradation of Folding-Defective Glycoproteins ». *FEBS Letters* 581 (19): 3658- 64. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.04.070>.

Oppermann Mona, Diane Mizel, Soo Mi Kim, Limeng Chen, Robert Faulhaber-Walter, Yuning Huang, Cuiling Li, et al. 2007. « Renal Function in Mice with Targeted Disruption of the A Isoform of the Na-K-2Cl Co-Transporter ». *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 18 (2): 440- 48. <https://doi.org/10.1681/ASN.2006091070>.

Pan Shujuan, Xiaoyun Cheng, et Richard N. Sifers. 2013. « Golgi-situated endoplasmic reticulum α -1, 2-mannosidase contributes to the retrieval of ERAD substrates through a direct interaction with γ -COP ». *Molecular Biology of the Cell* 24 (8): 1111- 21. <https://doi.org/10.1091/mbc.E12-12-0886>.

Pan Shujuan, Shufang Wang, Budi Utama, Lu Huang, Neil Blok, Mary K. Estes, Kelley W. Moremen, et Richard N. Sifers. 2011. « Golgi localization of ERManI defines spatial separation of the mammalian glycoprotein quality control system ». *Molecular Biology of the Cell* 22 (16): 2810- 22. <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-02-0118>.

Paredes Anahí, Plata Consuelo, Rivera Manuel, Moreno Erika, Va'zquez Norma, Muñoz-Clares Rosario, Steven C., and Gerardo Gamba. 2006. « Activity of the renal Na-K-2Cl cotransporter is reduced by mutagenesis of N-glycosylation sites: role for protein surface charge in Cl₋ transport ». *Am J Physiol Renal Physiol* 290: F1094–F1102, 2006. First published November 15, 2005; doi:10.1152/ajprenal.00071.2005.

Piechotta Kerstin, Jianming Lu, et Eric Delpire. 2002. « Cation Chloride Cotransporters Interact with the Stress-Related Kinases Ste20-Related Proline-Alanine-Rich Kinase (SPAK) and Oxidative Stress Response 1 (OSR1) ». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (52): 50812- 19. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208108200>.

Ponce-Coria José, Pedro San-Cristobal, Kristopher T. Kahle, Norma Vazquez, Diana Pacheco-Alvarez, Paola de los Heros, Patricia Juárez, et al. 2008. « Regulation of NKCC2 by a chloride-sensing mechanism involving the WNK3 and SPAK kinases ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (24): 8458- 63.

Printsev Ignat, Daniel Curiel, et Kermit L. Carraway. 2017. « Membrane Protein Quantity Control at the Endoplasmic Reticulum ». *The Journal of Membrane Biology* 250 (4): 379- 92. <https://doi.org/10.1007/s00232-016-9931-0>.

Rangarajan Erumbi S., HaJeung Park, Emanuelle Fortin, Jurgen Sygusch, et Tina Izard. 2010. « Mechanism of Aldolase Control of Sorting Nexin 9 Function in Endocytosis* ». *Journal of Biological Chemistry* 285 (16): 11983- 90. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.092049>.

Richardson Ciaran, Kei Sakamoto, Paola de los Heros, Maria Deak, David G. Campbell, Alan R. Prescott, et Dario R. Alessi. 2011. « Regulation of the NKCC2 ion cotransporter by

SPAK-OSR1-dependent and -independent pathways ». *Journal of Cell Science* 124 (5): 789- 800. <https://doi.org/10.1242/jcs.077230>.

Ron Efrat, Marina Shenkman, Bella Groisman, Yana Izenshtein, Julia Leitman, et Gerardo Z. Lederkremer. 2011. « Bypass of glycan-dependent glycoprotein delivery to ERAD by up-regulated EDEM1 ». *Molecular Biology of the Cell* 22 (21): 3945- 54. <https://doi.org/10.1091/mbc.e10-12-0944>.

Satoh Tadashi, Yang Chen, Dan Hu, Shinya Hanashima, Kazuo Yamamoto, et Yoshiki Yamaguchi. 2010. « Structural Basis for Oligosaccharide Recognition of Misfolded Glycoproteins by OS-9 in ER-Associated Degradation ». *Molecular Cell* 40 (6): 905- 16. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.11.017>.

Schmidt Oliver, Yannick Weyer, Verena Baumann, Michael A Widerin, Sebastian Eising, Mihaela Angelova, Alexander Schleiffer, et al. 2019. « Endosome and Golgi-associated degradation (EGAD) of membrane proteins regulates sphingolipid metabolism ». *The EMBO Journal* 38 (15): e101433. <https://doi.org/10.15252/embj.2018101433>.

Schwartz Alan L., et Aaron Ciechanover. 2009. « Targeting Proteins for Destruction by the Ubiquitin System: Implications for Human Pathobiology ». *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 49: 73- 96. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.051208.165340>.

Seaayfan Elie, Nadia Defontaine, Sylvie Demaretz, Nancy Zaarour, et Kamel Laghmani. 2016. « OS9 Protein Interacts with Na-K-2Cl Co-transporter (NKCC2) and Targets Its Immature Form for the Endoplasmic Reticulum-associated Degradation Pathway ». *The Journal of Biological Chemistry* 291 (9): 4487- 4502. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.702514>.

Shaukat Irfan, Dalal Bakhos-Douaihy, Yingying Zhu, Elie Seaayfan, Sylvie Demaretz, Nadia Frachon, Stefanie Weber, Martin Kömhoff, Rosa Vargas-Poussou, et Kamel Laghmani. 2021. « New Insights into the Role of Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation in Bartter Syndrome Type 1 ». *Human Mutation* 42 (8): 947- 68. <https://doi.org/10.1002/humu.24217>.

Simon David B., Fiona E. Karet, Jahed M. Hamdan, Antonio Di Pietro, Sami A. Sanjad, et Richard P. Lifton. 1996. « Bartter's Syndrome, Hypokalaemic Alkalosis with Hypercalciuria, Is Caused by Mutations in the Na-K-2Cl Cotransporter NKCC2 ». *Nature Genetics* 13 (2): 183. <https://doi.org/10.1038/ng0696-183>.

Szathmary Reka, Regula Biemann, Mihai Nita-Lazar, Patricie Burda, et Claude A. Jakob. 2005. « Yos9 Protein Is Essential for Degradation of Misfolded Glycoproteins and May Function as Lectin in ERAD ». *Molecular Cell* 19 (6): 765- 75. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.08.015>.

Tabas I., et S. Kornfeld. 1979. « Purification and Characterization of a Rat Liver Golgi Alpha-Mannosidase Capable of Processing Asparagine-Linked Oligosaccharides. » *Journal of Biological Chemistry* 254 (22): 11655- 63. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)86534-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)86534-1).

Takahashi Nobuyuki, Daniel R. Chernavsky, R. Ariel Gomez, Peter Igarashi, Hillel J. Gitelman, et Oliver Smithies. 2000. « Uncompensated Polyuria in a Mouse Model of Bartter's Syndrome ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (10): 5434- 39. <https://doi.org/10.1073/pnas.090091297>.

Vargas-Poussou Rosa, Delphine Feldmann, Martin Vollmer, Martin Konrad, Lisa Kelly, Lambertus P. W. J. van den Heuvel, Lamia Tebourbi, et al. 1998. « Novel Molecular Variants of the Na-K-2Cl Cotransporter Gene Are Responsible for Antenatal Bartter Syndrome ». *The American Journal of Human Genetics* 62 (6): 1332- 40. <https://doi.org/10.1086/301872>.

Vitale Alessandro and Denecke Jürgen. 1999. « The Endoplasmic Reticulum—Gateway of the Secretory Pathway ». *The Plant Cell*, Vol. 11, 615–628, April 1999.

Welker Pia, Alexandra Böhlick, Kerim Mutig, Michele Salanova, Thomas Kahl, Hartmut Schlüter, Dieter Blottner, Jose Ponce-Coria, Gerardo Gamba, et Sebastian Bachmann. 2008. « Renal Na⁺-K⁺-Cl⁻ Cotransporter Activity and Vasopressin-Induced Trafficking Are Lipid Raft-Dependent ». *American Journal of Physiology. Renal Physiology* 295 (3): F789-802. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.90227.2008>.

Yu Ming-Jiun, Trairak Pisitkun, Guanghui Wang, Juan F. Aranda, Patricia A. Gonzales, Dmitry Tchapyjnikov, Rong-Fong Shen, Miguel A. Alonso, et Mark A. Knepper. 2008. « Large-Scale Quantitative LC-MS/MS Analysis of Detergent-Resistant Membrane Proteins from Rat Renal Collecting Duct ». *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 295 (3): C661-678. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.90650.2007>.

Zaarour N., S. Demaretz, N. Defontaine, D. Mordasini, et K. Laghmani. 2009 « A Highly Conserved Motif at the COOH Terminus Dictates Endoplasmic Reticulum Exit and Cell Surface Expression of NKCC2 ». *Journal of Biological Chemistry* 284 (32): 21752- 64.

Zaarour Nancy, Nadia Defontaine, Sylvie Demaretz, Anie Azroyan, Lydie Cheval, et Kamel Laghmani. 2011. « Secretory Carrier Membrane Protein 2 Regulates Exocytic Insertion of NKCC2 into the Cell Membrane ». *The Journal of biological chemistry* 286 (mars): 9489- 9502. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.166546>.

Zaarour Nancy, Sylvie Demaretz, Nadia Defontaine, Yingying Zhu, et Kamel Laghmani. 2012. « Multiple Evolutionarily Conserved Di-Leucine Like Motifs in the Carboxyl Terminus Control the Anterograde Trafficking of NKCC2. » *The Journal of biological chemistry* 287 (octobre). <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.399162>.

Zhang Litian, Lukman O. Afolabi, Xiaochun Wan, Yang Li, et Liang Chen. 2020. « Emerging Roles of Tripartite Motif-Containing Family Proteins (TRIMs) in Eliminating Misfolded Proteins ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00802>.

Annexe 1

Comparaison des séquences de la ManIA de souris et humaine.

P33908 MA1A1_HUMAN 1 MPVGGLLPLF SSPAGGVLGG GLGGG*GG*RKG SGPAALRLTE

P45700 MA1A1_MOUSE 1 MPVGGLLPLF SSPGGGLGS GLGGGLGGGRKG SGPAAFRLTE

KFVLLLVFSA FITLCFGAIF FLPDSSKLLS GVLFHSSPAL QPAADHKPGP GARAEDAAEG
 KFVLLLVFSA FITLCFGAIF FLPDSSKLLS GVLFHSNPAL QP**PAEHK**PGL GARAEDAAEG

RARRREGAP GDPEAALEDN LARIRENHER ALREAKETLQ KLPEEIQRDI LLEKKKVAQD
VRHREGAP G**DPGAG**LEDN LARIRENHER ALREAKETLQ KLPEEIQRDI LLEK**EK**VAQD

QLRDKAPFRG LPPVDFVPPI GVESREPADA AIREKRAKIK EMMKHAWNNY KGYAWGLNEL
 QLRDK**DL**FRG LPKVDF**LPPV** G**VEN**REPADA **T**IREKRAKIK EMM**TH**AWNNY **KRY**AWGLNEL

KPISKGGHSS SLFGNIKAT IVDALDTLFI MEMKHEFEEA KSWVEENLDF NVNAEISVFE
 KPISK**EG**HSS SLFGNIKAT IVDALDTLFI **MGMKTEFQ**EA KSW**IKKY**LDF NVNAE**V**SVFE

VNIRFVGGLL SAYYLSGEEI FRKKAVELGV KLLPAFHTPS GIPWALLNMK SGIGRNWPWA
 VNIRFVGGLL SAYYLSGEEI FRKKAVELGV KLLPAFHTPS GIPWALLNMK SGIGRNWPWA

SGGSSILAEF GTLHLEFMHL SHLSGNPIFA EKVMNIRTVL NKLEKPQGLY PNYLNPSSGQ
 SGGSSILAEF GTLHLEFMHL SHLSG**DPV**FA EKVMKIRTVL NK**LDPK**EGLY PNYLNPSSGQ

WGQHHVSVGG LGDSFYEYLL KAWLMSDKTD LEAKKMYFDA VQAIETHLIR KSSSGLTYIA
 WGQHHVSVGG LGDSFYEYLL KAWLMSDKTD LEAKKMYFDA VQAIETHLIR KSSSGLTYIA

EWKGGLLEHK MGHLTCFAGG MFALGADAAP EGMAQHYLEL GAEIARTCHE SYNRTFMKLG
 EWKGGLLEHK MGHLTCFAGG MFALGAD**G**AP **E**AR**A**QHYLEL GAEIARTCHE SYNRT**YV**KLG

PEAFRFDGGV EAIATRQNEK YYILRPEVME TYMYMWRLTH DPKYRKWAVE AVEALENHCR
PEAFRFDGGV EAIATRQNEK YYILRPEVIE TYMYMWRLTH DPKYRTWAVE AVEALESHCR

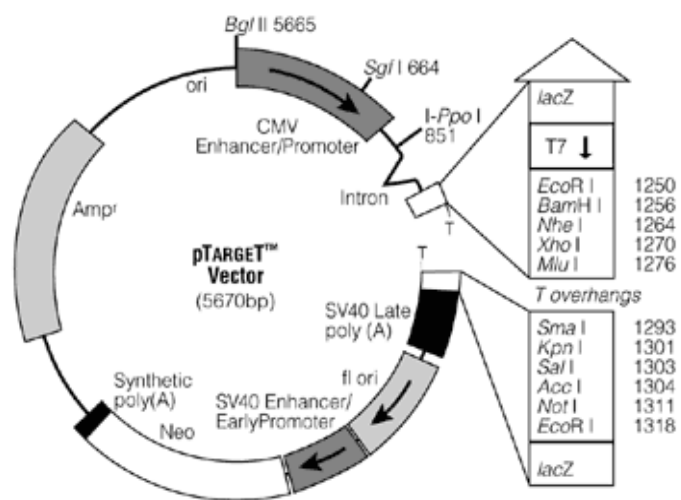
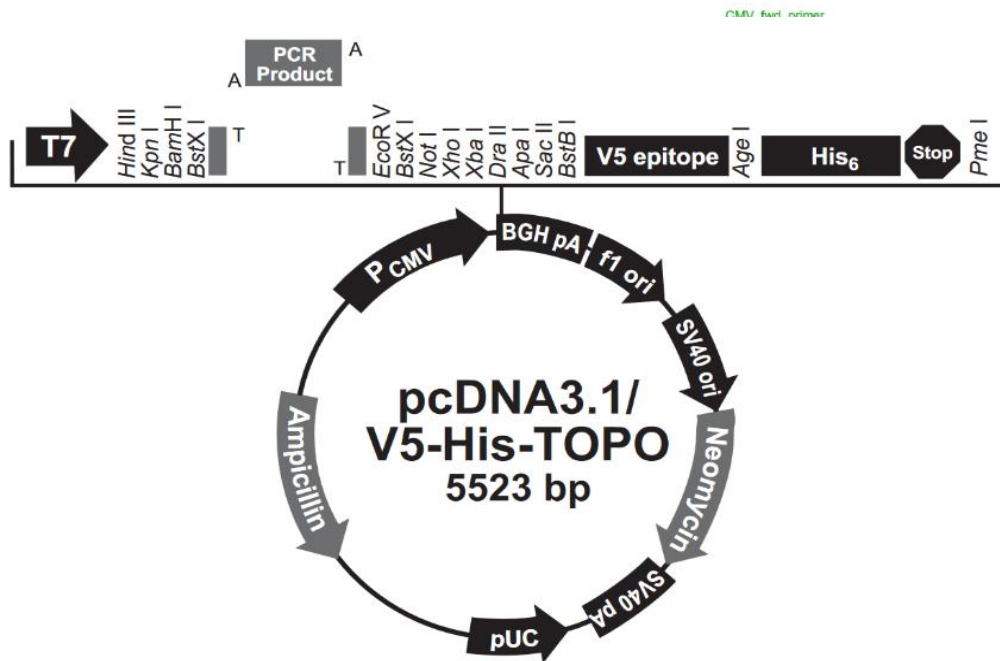
VNGGYSGLRD VYLLHESYDD VQQSFFLAET LKYLYLIFSD DDLLPLEHWI FNSEAHLLPI
VNGGYSGLRD VYIARESYDD VQQSFFLAET LKYLYLIFSD DDLLPLEHWI FNTEAHPFPI

LPKDKKEVEI REE 653aa
LREQKKEIDG KEK 655aa

53 aa chez la souris sont différents entre la souris et l'homme ce qui représente 92% d'homologie entre les deux espèces.

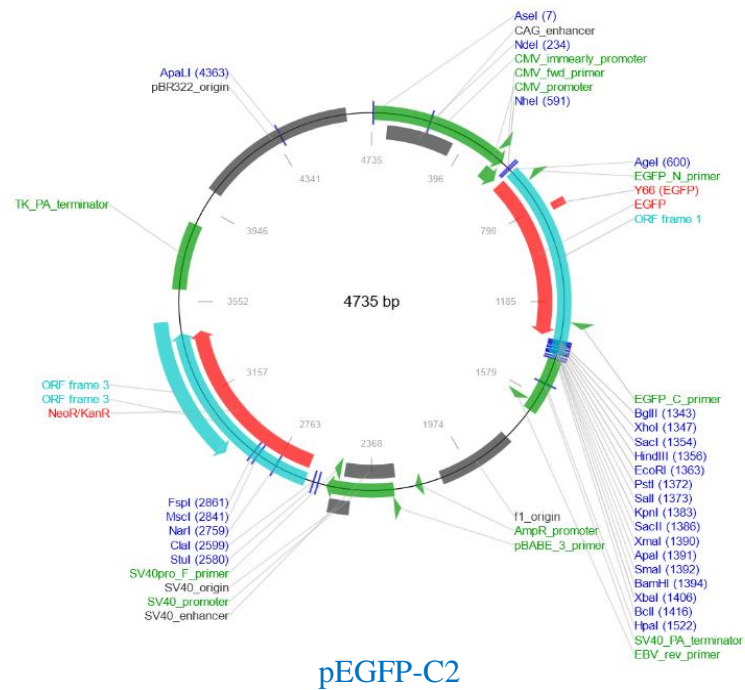
Annexe 2

les trois principaux plasmides utilisés. Le tag Myc est toujours placé en N-terminal. Le tag V5 se trouve aussi en C-terminal. L'insertion de NKCC2 est réalisée entre Sal1/EcoR1



Annexe 3

Ci-dessous : présentation du plasmide EGP. utilisé pour construire le NKCC21090-EGFP. EGFP est placé en N-terminal de NKCC2.



Le co-transporteur apical $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ (NKCC2), spécifique du rein, joue un rôle essentiel dans l'homéostasie hydroélectrolytique de l'organisme. Des mutations dans le gène du cotransporteur sont à l'origine du syndrome de Bartter anténatal de type 1 (BS1), un trouble héréditaire rare, dont le pronostic vital peut être engagé en l'absence de traitement précoce. Le BS1 est caractérisé par une hypotension artérielle et un désordre électrolytique.

Nos travaux antérieurs ont démontré que la vaste majorité des protéines NKCC2 nouvellement synthétisées dans le réticulum endoplasmique (RE) sont dégradées par le système ERAD, suggérant ainsi que le transit de NKCC2 dans le RE est une étape limitante dans le trafic du cotransporteur vers la membrane plasmique. Cependant, à ce jour, les déterminants moléculaires régulant l'ERAD de NKCC2 sont très peu connus. Dans cette étude, nous avons identifié, grâce au système double hybride dans la levure, la mannosidase Golgienne alpha classe 1A membre 1 (ManIA) comme nouveau partenaire protéique de NKCC2. La ManIA est une hydrolase impliquée aussi bien dans la maturation que dans l'ERAD des protéines de la voie de sécrétion.

Les expériences de coimmunoprécipitation et d'immunofluorescence dans les cellules rénales en culture ont révélé que la ManIA interagit uniquement avec la forme immature de NKCC2, et que cette interaction se produit au niveau du Cis-Golgi. L'augmentation des taux de la ManIA a diminué massivement l'abondance totale de la protéine NKCC2 alors que son knock-down a produit l'effet opposé. D'une manière intéressante, l'action de la ManIA s'est avérée plus prononcée sur certains mutants de NKCC2. Les expériences de cycloheximide-chase ont démontré que la réduction de NKCC2 par la ManIA est secondaire à l'augmentation de la dégradation de sa forme immature. L'effet de la ManIA sur NKCC2 a été aboli à la suite de l'inhibition du protéasome par MG132, alors que l'inhibition du lysosome par la chloroquine n'a produit aucun résultat. La kifunensine, inhibiteur des mannosidase alpha 1,2, prévient également massivement l'effet de la ManIA sur NKCC2 démontrant ainsi que la N-glycosylation est nécessaire à l'action de l'enzyme sur le cotransporteur. En conclusion, nos résultats démontrent l'existence d'une implication de la ManIA dans le système ERAD de NKCC2. Nous postulons, qu'en conditions du stress du RE, la ManIA joue un rôle crucial dans la rétention au niveau du Golgi, le transport rétrograde et la dégradation par le protéasome des protéines NKCC2 mal-repliées qui ont échappé au contrôle de qualité du RE, révélant ainsi un nouveau mode de régulation du cotransporteur.