

ACIDOSE TUBULAIRE RÉNALE HÉRÉDITAIRE

par

F.E. KARET*

RÔLE DU REIN DANS LE MAINTIEN DE L'ÉQUILIBRE ACIDO-BASIQUE

Le pH des liquides de l'organisme est habituellement maintenu dans un intervalle très étroit, ce qui est important pour l'activité optimale d'un grand nombre de fonctions biochimiques et métaboliques essentielles. Le rein joue un rôle déterminant dans cet équilibre, dans les circonstances normales, par sa capacité à adapter la récupération des bicarbonates et l'excrétion nette d'acides dans une large gamme.

Chez l'adulte, le rein normalement filtre et réabsorbe environ 4 500 mmol/j de bicarbonate, surtout dans le tube contourné proximal, par l'intermédiaire d'un cotransport sodium-bicarbonate. Cependant le maintien de l'équilibre acido-basique nécessite, en plus d'une fonction tubulaire proximale intacte et d'une production adéquate d'ammoniaque, la sécrétion nette d'environ 1 mmol/kg/j de H⁺ produit comme résidu acide non volatil du catabolisme normal. Bien que d'autres voies soient impliquées, cette sécrétion nette d'acide passe surtout par l'intermédiaire des cellules polarisées alpha-intercalaires du néphron distal dans un processus couplé à la récupération de quelque 100 mmol de bicarbonates [1]. Dans ces cellules, la sécrétion luminale d'ions H⁺ survient par l'intermédiaire de pompes à protons requérant de l'énergie, localisées à la membrane apicale des cellules [2], et elle est liée au transport basolatéral de bicarbonates en échange avec du chlore par l'intermédiaire d'un échangeur chlore-bicarbonate AE1 [3] (fig. 1).

* Departments of Nephrology and Medical Genetics, Wellcome Trust Centre for the Study of Molecular Mechanisms in Disease, Cambridge Institute for Medical Research, Room 4.2, Wellcome Trust/MRC Building, Addenbrooke's Hospital, Cambridge, CB2 2XY, Royaume-Uni.

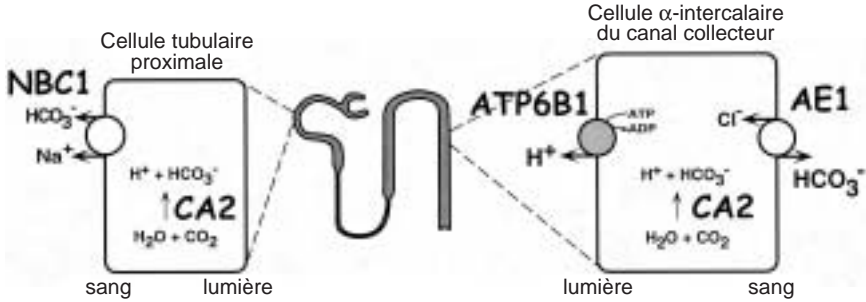
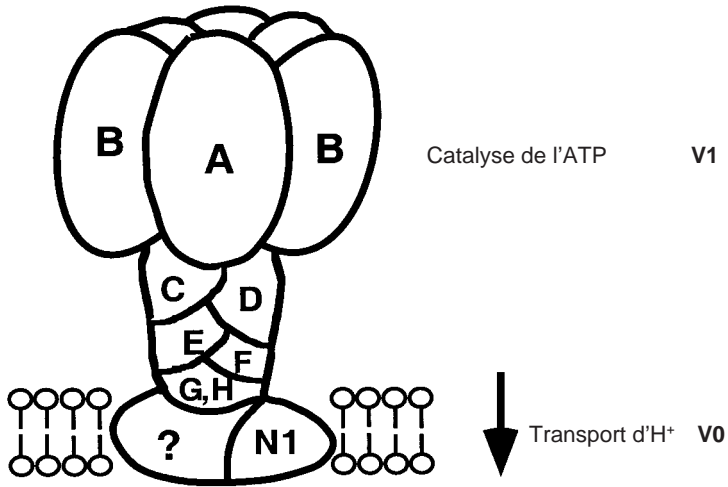


FIG. 1. — Produits des gènes dont les défauts produisent une acidose tubulaire rénale primitive. Au centre, se trouve le schéma d'un néphron. À gauche, les mutations de NBC1, codant pour le cotransporteur $\text{Na}^+ - \text{HCO}_3^-$ sont à l'origine de l'ATR proximale autosomique récessive. L'anhydrase carbonique 2 (CA2) dont les défauts conduisent à l'ATR de type 3 avec ostéopétrose, est exprimée à la fois dans les segments proximaux et distaux du néphron. À droite, AE1 est le gène responsable de l'ATR distale autosomique dominante alors que les mutations avec perte de fonction d'ATP6B1, codant pour la sous-unité B1 de la pompe apicale à protons, sont trouvées dans l'ATR distale récessive avec surdité. D'autres pompes, transporteurs et canaux liés à la membrane sont également présents.

POMPES APICALES À PROTONS

Deux pompes apicales différentes à protons ont été décrites. La première, une H^+ -ATPase, est un membre de la famille des (V-) ATPases vacuolaires [4]. Les V-ATPases ont une structure complexe faite d'au moins 10 sous-unités différentes (fig. 2) et ces pompes ont une remarquable conservation au cours de l'évolution. Par exemple, les protéines de la sous-unité B humaine ont 49 p. 100 d'identité en acides aminés avec la sous-unité B de la V-ATPase d'Archaeobactéries [5]. Parmi les V-ATPases, la molécule a 2 domaines, V1 et V0. Le domaine V1 est intracellulaire ou intravacuolaire, et comprend un hétérohexamère de 3 sous-unités A et de 3 sous-unités B, avec beaucoup d'autres sous-unités. Ce domaine catalyse l'hydrolyse de l'ATP, fournissant l'énergie nécessaire au transport actif de protons à travers le domaine membranaire V0. La structure en de multiples sous-unités est analogue à celle de la F-ATP synthase de la membrane interne mitochondriale et il existe également une forte analogie entre les familles des V- et des F-ATPases. L'ATP synthase inverse le processus de transport ionique, utilisant le mouvement passif d' H^+ à travers la membrane interne mitochondriale pour entraîner la synthèse d'ATP [6]. Les V-ATPases sont exprimées de façon ubiquitaire dans les vacuoles intracellulaires, et aussi à la membrane cellulaire à des sites nécessitant un contrôle particulier du pH, comme le néphron, les ostéoclastes de l'os et les tissus génitaux et salivaires, au moins chez le rat [7-10]. De tous les composants des V-ATPases des mammifères, seule la sous-unité B a 2 isoformes distinctes, B1 et B2 spécifiques de certains tissus, codées par différents gènes [5, 11]. Ces isoformes ont une distribution d'expression différente. Alors que l'isoforme B2 est largement distribuée à l'intérieur des vacuoles intracellulaires et est aussi trouvée à la périphérie festonnée des ostéoclastes, l'expression de l'isoforme B1 chez



B1 : rein (surface apicale des cellules α -intercalaires), placenta, poumon
B2 : vacuoles intracellulaires diffuses, ostéoclastes

FIG. 2. — Schéma de la H⁺-ATPase humaine. La « tête » catalytique (V1) est composée de 3 sous-unités A et de 3 sous-unités B. L'hydrolyse de l'ATP fournit l'énergie pour pomper les protons au travers de la « tige » et du domaine transmembranaire (V0). La plupart des études d'immunolocalisation ont utilisé des anticorps contre la sous-unité ubiquitaire 31 kDa E. À côté de la sous-unité B, il n'y a pas d'autres isoformes connues, spécifiques de certains tissus. ? = nombre inconnu de sous-unités additionnelles.

l'homme a été récemment détectée seulement dans le rein (mais aussi, à des taux plus faibles, dans le poumon et dans le placenta) où elle a été localisée avec une densité maximale à la surface apicale des cellules α -intercalaires du canal collecteur [7, 8].

Une seconde pompe apicale à protons est l'ATPase de type P où les protons et les ions K⁺ sont échangés à travers la membrane cellulaire. Cette pompe est de structure beaucoup plus simple, composée probablement de seulement 2 sous-unités (A et B) codées par des gènes localisés respectivement sur les chromosomes 19 et 13 [12]. On n'a pas décrit d'isoforme pour ces sous-unités et la contribution relative de cette pompe dans le rein humain reste à établir.

RÉCUPÉRATION BASO-LATÉRALE DES BICARBONATES

La protéine AE1 exprimée à la membrane baso-latérale (antérieurement décrite sous le nom de Bande-3), responsable de la récupération des bicarbonates dans le canal collecteur, est une protéine de membrane de 911 acides aminés [13]. On pense que cette protéine a 12 à 14 régions transmembranaires, entre les résidus 404 et 882, à travers lesquels survient l'échange d'anions [14]. Un transcrit plus long d'AE1 est aussi présent dans les globules rouges où il contribue à la structure

du cytosquelette par l'intermédiaire d'interactions de l'extrémité N-terminale avec l'ankirine et la protéine 4,2 [15]. On a identifié une grande variété de mutations dans ces domaines d'interaction, mutations à l'origine de la sphérocytose héréditaire, de l'elliptocytose et de l'ovalocytose dans le sud-est de l'Asie [15, 16].

ACIDOSES TUBULAIRES RÉNALES (ATR)

La régulation rénale de l'équilibre acido-basique peut être perturbée de nombreuses façons. Les 2 défauts principaux sont soit l'incapacité à sécréter des ions H^+ dans le néphron distal (conduisant à l'acidose tubulaire distale ou de type 1 et aussi à l'acidose de type 4), soit du fait d'une perte proximale de bicarbonates (conduisant à l'ATR proximale ou de type 2) [17].

ATR proximale de type 2

En général, l'ATR proximale survient comme conséquence secondaire d'une dysfonction cellulaire, comme au cours du syndrome de Fanconi (MIM#134600). Cependant dans une population récente, ont été étudiées 2 familles dans lesquelles les descendants atteints de parents normaux ont une ATR proximale associée à un glaucome, des cataractes et une kératopathie en bande (MIM#604278), et les auteurs ont identifié des mutations avec perte de fonction touchant le gène *SLCA4* qui code pour un cotransporteur sodium-bicarbonate présent dans le rein [18]. De façon intéressante, l'endothélium cornéen transporte normalement Na^+ et HCO_3^- du stroma cornéen à l'humeur aqueuse, probablement par l'intermédiaire de *SLCA4* qui joue probablement un rôle dans la préservation de la transparence cornéenne.

ATR mixte de type 3

L'ostéopétrose (MIM#259730), maladie autosomique récessive s'accompagne habituellement d'une ATR qui a à la fois les caractéristiques d'une acidose tubulaire proximale et distale. Le gène responsable, codant pour l'anhydrase carbonique de type 2, est présente dans les 2 segments du néphron.

ATR distale

Ce type d'acidose peut survenir de façon secondaire, par exemple dans le contexte de la toxicité de certains médicaments ou d'un hypoaldostéronisme (type 4). À l'inverse de l'ATR proximale, il y a beaucoup de publications d'ATR distale de type 1 primitive et héréditaire. Cela a fourni des outils physiologiques utiles puisque pour élucider la dysfonction en termes moléculaires, nous pouvons utiliser le modèle de la maladie spontanée humaine pour comprendre mieux la régulation physiologique. C'est pourquoi l'acidose tubulaire distale primitive s'est révélée être un champ fertile d'explorations pour cette approche.

ACIDOSE TUBULAIRE RÉNALE DISTALE PRIMITIVE

L'acidose tubulaire distale rénale primitive a été décrite pour la première fois par Lightwood et Butler et leurs collaborateurs dans les années 1930 [19, 20] et elle est caractérisée sur le plan biochimique par l'incapacité du rein à produire une urine acide de façon appropriée en présence d'une acidose métabolique systémique ou après une charge acide (par exemple par du chlorure d'ammonium). Il en résulte une acidose métabolique hyperchlorémique de gravité variable. L'ATR distale est presque toujours accompagnée d'une néphrocalcinose et/ou d'une lithiase rénale. Le dépôt anormal de calcium peut être attribué en grande partie à l'hypocitraturie trouvée dans l'ATR distale mais les mécanismes exacts pour le dépôt et les sites précis de ce dépôt restent mystérieux. Les autres anomalies biochimiques de l'acidose tubulaire distale primitive sont l'hypokaliémie et les taux normaux de calcium et de phosphore dans le sérum bien qu'une ostéomalacie ou un rachitisme puisse survenir chez les malades non traités.

Une transmission héréditaire, autosomique dominante ou autosomique récessive a été rapportée dans l'ATR distale primitive (MIM#179800, 267300, 602722). Le spectre de gravité clinique est très large, allant d'une acidose discrète compensée, sans symptôme ou de la découverte fortuite d'une calcification ou d'un calcul de l'appareil urinaire d'une part, jusqu'à des manifestations majeures chez des nourrissons, avec acidose sévère, croissance altérée et néphrocalcinose précoce conduisant éventuellement à l'insuffisance rénale. En général, bien que cela ne soit pas constant, les patients avec une ATR dominante ont un phénotype plus bénin que ceux qui ont une maladie autosomique récessive. De plus, une fraction importante des malades avec une ATR distale récessive, mais non ceux avec une forme dominante, ont une surdité bilatérale de perception progressive et irréversible (SNHL) [21]. L'apport simple d'alcalins (sous forme de citrate ou de bicarbonate pour voie orale) est suffisant pour supprimer la plupart des anomalies métaboliques et la maladie osseuse associée. Cependant bien que ce traitement prévienne les dépôts calciques ultérieurs, il ne semble pas capable soit d'améliorer, soit de prévenir la progression de l'atteinte auditive.

Lors de premières descriptions, on avait pensé que l'ATR distale était due à une rétrodiffusion des protons normalement sécrétés à travers l'épithélium tubulaire anormalement perméable. Dans les 5 décennies qui ont suivi, il a été bien établi que la sécrétion acide elle-même est anormale, du fait d'une incapacité d'un segment du canal collecteur à sécréter des ions hydrogène [22]. Cependant on ignorait si cela était un phénomène primitif ou secondaire au niveau moléculaire et jusqu'à la période récente, la physiopathologie moléculaire restait inconnue.

ACIDOSE TUBULAIRE DISTALE AUTOSOMIQUE DOMINANTE

Beaucoup d'auteurs ont fait l'hypothèse que le mécanisme sous-jacent dans l'ATR distale était probablement un défaut de fonction de la pompe apicale à protons, soit de la H^+ -ATPase, soit de la H^+/K^+ -ATPase [23]. Cependant 2 publications de cas avec à la fois une acidose tubulaire distale et une ovalocytose ou une elliptocytose ont conduit à considérer *AE1* comme un gène candidat pour

l'ATR distale [24] bien que l'étude de ces familles n'ait pas apporté la preuve de la coségrégation de ces 2 anomalies et n'ait pas comporté d'analyse de mutation.

Récemment l'exploration de l'ATR dominante par 3 groupes a conduit à identifier 10 familles dans lesquelles les sujets atteints sont hétérozygotes pour des mutations d'*AE1* [25-27]. Cela représentait la première preuve moléculaire que le transport d'un d'anion plus que celui d'un cation était fonctionnellement déficient dans une ATR distale dominante. De façon frappante, une modification d'une seule base modifie le même résidu, Arg589, chez 8 de ces 10 familles, démontrant l'importance de ce résidu dans les processus d'acification normale. Arg589 siège à la frontière intracellulaire du sixième domaine transmembranaire de la protéine, à proximité de Lys590 ; ce dernier résidu est la cible d'un inhibiteur spécifique d'*AE1*, le phényl-isothiocyanate [28]. Ces résidus basiques sont conservés dans toutes les isoformes de l'échangeur d'anions connu chez les vertébrés et on considère qu'elles forment une partie du site de liaison intracellulaire des anions [29].

On doit cependant noter que l'expression hétérologue *in vitro* de ces mutations dans des ovocytes de *Xenopus* ne semble pas produire une perte significative de fonction, suggérant que l'haploinsuffisance simple ne peut pas expliquer le phénotype ATR distale. En outre, les mutations d'*AE1* sont à l'origine de maladies dominantes touchant la morphologie des globules rouges, la sphérocytose héréditaire et l'ovalocytose. Dans celles-ci, plus de 20 mutations d'*AE1* ont été décrites, y compris des mutations qui produisent une terminaison très précoce (codon 81) ou un décalage du cadre de lecture (codon 170) [30], mutations qui probablement conduisent à une absence ou à une légère modification de la protéine codée. Ces mutations n'ont pas été jusqu'à présent associées à une acidose tubulaire distale classique. En outre, la survenue de diverses mutations touchant Arg589 dans différentes familles, aussi bien qu'une mutation de novo [27], indique que la grande prévalence de ces mutations n'est pas attribuable à une mutation fondatrice partagée par toutes ces familles. Il reste à établir si l'effet apparemment dominant négatif des mutations d'*AE1* dans l'ATR distale dominante est due à une erreur d'adressage de la protéine mutée, loin de la localisation habituelle basolatérale, ou modifie d'une façon ou d'une autre l'interaction d'*AE1* avec d'autres composants intracellulaires.

ACIDOSE TUBULAIRE DISTALE AUTOSOMIQUE RÉCESSIVE

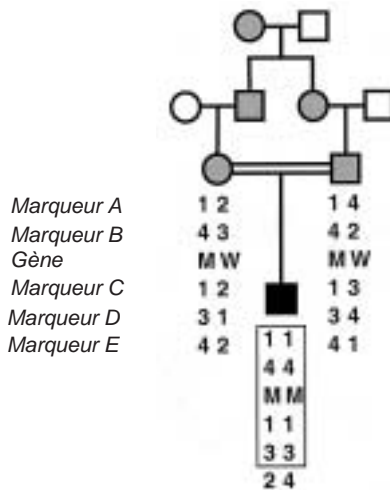
Il y a de nombreux gènes candidats pour l'ATR distale récessive, parmi lesquels a) des gènes pour toutes les sous-unités des transporteurs de protons ; b) des gènes dont les produits sont nécessaires au trafic des pompes à protons vers la membrane apicale des cellules alpha-intercalaires, sans modifier les éléments de la pompe elle-même ; c) des gènes codant pour des molécules nécessaires à la génération des protons, à l'absorption du bicarbonate, au recyclage du chlore ou au maintien du gradient électrochimique à travers les membranes apicales et basolatérales. Malheureusement beaucoup de ces candidats potentiels restent encore non identifiés, non caractérisés, ou jusqu'à présent, non localisés sur les chromosomes humains. Enfin des gènes connus pourraient avoir des isoformes nouvelles dans le rein, jusqu'à présent non identifiées.

Alors que tous les types d'ATR distale primitive sont rares, la maladie récessive (comme d'autres maladies héritées selon le mode récessif) est rencontrée plus

fréquemment dans certaines régions du monde où la consanguinité parentale est prévalente. Le recrutement de familles où les enfants atteints sont le fruit d'une union consanguine de parents non atteints nous a donc permis d'explorer plus facilement les causes génétiques de l'ATR distale, en utilisant la technique d'*homozygosity mapping* [31].

Cette technique utilise la probabilité qu'un individu atteint qui est le fruit d'une union consanguine, va hériter de copies identiques d'un gène muté à partir d'un ancêtre commun, transmis par les lignées paternelles et maternelles (fig. 3). Du fait du petit nombre de méioses le ou les séparant de l'ancêtre fondateur, il est aussi probable qu'un tel sujet aura une homozygotie à d'autres locus polymorphes encadrant le gène muté. Des études génotypiques recherchant des régions d'homozygotie dans la descendance offrent donc un outil attractif et puissant puisque l'analyse de liaison d'un seul sujet atteint né d'une union entre cousins contribue à un lod score potentiel maximal de 1,2 pour un locus lié complètement informatif.

C'est pourquoi, en étudiant les causes génétiques des ATR distales récessives, nous avons tout d'abord testé l'implication éventuelle d'AE1 (à la fois par analyse de liaison et par recherche directe de mutation). Ensuite une approche plus générale



Lod score maximal 1,2

FIG. 3. — Principe de la méthode d'*homozygosity mapping*. On assume que les descendants atteints (en noir) de parents vecteurs non atteints et étroitement apparentés, ici des cousins germains, ont hérité de copies identiques d'un allèle muté causant la maladie (M), par transmission à partir d'un ancêtre commun, situé seulement quelques générations auparavant (en gris). Le petit nombre de méioses séparant le membre fondateur du patient a comme conséquence la présence de marqueurs polymorphes flanquant identiques (allèles numérotés de A à E). Le segment d'homozygotie du fait de la transmission verticale est encadré. Si de tels marqueurs sont totalement informatifs, un individu atteint unique, comme cela est montré, peut contribuer à une lod score de 1,2 dans des études de liaison. Grâce à la coexistence de régions d'homozygotie parmi les familles, on peut donc espérer localiser des gènes causant les maladies. W = à l'état sauvage ou normal.

de liaison, employant l'*homozygosity mapping* a été utilisée pour rechercher des segments du génome où l'homozygotie était partagée par une proportion significative de ces familles.

AE1 COMME GÈNE CANDIDAT

Nous avons initialement exploré le rôle potentiel d'AE1 dans l'ATR distale récessive en étudiant des marqueurs polymorphes situés de part et d'autre de ce gène sur le chromosome 17q [27]. Dans l'analyse de liaison, faite dans 17 familles récessives, nous avons cependant trouvé un lod score maximal de seulement - 15,5 à la localisation d'AE1. En outre, l'étude de tous les 16 exons codant pour l'isoforme rénale, par SSCP (*single-strand conformation polymorphism*) n'a pas pu identifier de mutations. Ces observations ont rendu improbable l'hypothèse selon laquelle AE1 était le gène en cause dans une proportion significative de familles avec ATR distale récessive. Plus récemment, quelques familles issues de Thaïlande avec à la fois une anémie hémolytique et une acidose rénale tubulaire ont été décrites, avec une perte de fonction d'AE1 qui se manifeste dans le transport anionique in vitro chez le *Xenopus*, mais non dans les globules rouges [32, 33]. Jusqu'à présent cependant, cette combinaison phénotypique semble être confinée à la Thaïlande.

ANALYSE DE LIAISON PORTANT SUR TOUT LE GÉNOME : ATP6B1 COMME GÈNE CANDIDAT

Nous avons donc entrepris une recherche sur tout le génome pour localiser un gène ou des gènes de l'ATR distale récessive. Une première étude portant sur une cohorte de familles surtout consanguines a révélé, avec des modèles d'hétérogénéité des locus, une évidence suggérant une liaison à un segment du chromosome 2p d'un sous-groupe de familles [34]. Bien qu'aucun gène candidat sérieux ne fut connu pour siéger dans l'intervalle identifié, un candidat potentiel, le gène codant pour la sous-unité B1 de la H⁺-ATPase (symbole du gène ATP6B1) avait été localisé auparavant au chromosome 2, mais sur l'autre bras du chromosome (MIM#192132). Ce gène était d'un intérêt tout particulier parce qu'il code pour l'isoforme B1 dont nous avons parlé plus haut et qui est trouvée avec une densité maximale à la surface apicale des cellules sécrétant les ions H⁺ dans le néphron distal : c'est l'isoforme associée à la pompe sécrétant des protons dans le rein.

La détermination définitive de la localisation d'ATP6B1 par *radiation hybrid mapping* a démontré que sa localisation coïncidait en fait avec l'intervalle maximum de probabilité de l'ATR distale. Le clonage et la caractérisation de l'organisation introns-exons du locus humain a montré que la protéine est codée par 14 exons. Par la suite, la recherche de mutations dans ce gène a révélé une grande variété de mutations dans 19 des 62 familles étudiées (10 récessives et 9 sporadiques). En résumé, les 15 mutations différentes introduisent des codons de terminaison prématurée, représentent des mutations du cadre de lecture, des mutations de sites d'épissage et des substitutions faux sens non conservées. La plupart de

ces mutations altèrent probablement la structure ou suppriment la production de la protéine de la sous-unité B1 normale. Les mutations coségrègent avec l'ATR distale dans chaque famille et les sujets atteints de toutes les familles sauf une ont des mutations homozygotes. Aucune des mutations identifiées n'a été trouvée parmi 36 individus sains, non apparentés, confirmant la spécificité de ces mutations pour l'acidose tubulaire distale.

Ces résultats démontrent qu'avec une perte de fonction d'ATP6B1, et du même coup du fait de l'absence de la pompe à protons normale dans le tube distal, le pH systémique normal ne peut pas être maintenu avec un régime normal. Bien que les 2 ATPases, H⁺ et H/K⁺ aient été localisées à la membrane apicale des cellules sécrétant des protons, leurs contributions relatives à la sécrétion d'acides n'ont pas été solidement établies chez l'homme. Les données présentées indiquent que l'H⁺-ATPase apicale est essentielle à la sécrétion distale normale d'H⁺ et que sa dysfonction ne peut pas être compensée de façon adéquate par d'autres systèmes.

SURDITÉ CHEZ LES MALADES AYANT DES MUTATIONS D'ATP6B1

La prévalence de l'atteinte auditive était élevée de façon surprenante chez les malades avec des mutations d'ATP6B1, présentes chez les individus atteints de 13 sur 15 familles dans lesquelles ces mutations ont été identifiées (87 p. 100). Une surdité sévère ou profonde (de 70 à 100 dB) a été documentée chez 10 d'entre elles. Au contraire, la surdité était absente chez 29 familles sur 38 avec ATR distale chez lesquelles des mutations d'ATP6B1 n'ont pas été trouvées (χ^2 , 1 d.f. = 17,55 ; $p < 3 \times 10^{-5}$). Cette différence dans la prévalence de la surdité n'était pas expliquée par des différences dans la gravité de l'acidose systémique, l'âge au diagnostic ou l'âge lors de l'étude audiométrique d'un de ces groupes.

EXPRESSION D'ATP6B1 DANS L'OREILLE INTERNE

La coexistence de la surdité avec l'acidose tubulaire distale était d'un intérêt particulier à cause de la physiologie insolite de l'oreille interne. L'endolymphe qui baigne les cellules ciliaires de l'organe de Corti a une composition ionique particulière, riche en K⁺ (150 mM) et pauvre en Na⁺ (4 mM) [35] ; on pense que cela accroît la sensibilité de ces cellules à la mécanotransduction. Le potentiel positif endolymphatique qui en résulte doit conduire à un efflux passif d'H⁺ à partir de l'endolymphe et de ce fait à une alcalinisation. Cependant le pH de l'endolymphe est maintenu proche de 7,4 dans la cochlée et est même plus bas dans le sac endolymphatique (pH 6,6), indiquant un processus actif d'acidification [36]. On ignore le mécanisme précis de cette sécrétion d'H⁺ et sa signification physiologique.

Une explication de l'association de la mutation ATP6B1 à la surdité est que l'expression locale de la H⁺-ATPase contenant la sous-unité B1 dans l'oreille interne est nécessaire à la fonction cochléaire normale. Nous avons démontré, par analyse en RT-PCR de l'ARN messager de cochlée humaine fœtale et adulte,

l'expression de l'ATP6B1. D'autre part, l'utilisation d'anticorps spécifiques vis-à-vis de l'extrémité carboxy-terminale de la protéine codée a révélé une immunofixation de forte intensité dans la couche des cellules interdentes du limbe spiralé (qui forme une partie de l'épithélium bordant la scala media et est en contact direct avec l'endolymphe) et dans les cellules épithéliales du sac endolymphatique, dans les tissus de souris de 5 jours [34].

Des V-ATPases apicales avaient été antérieurement démontrées dans l'oreille interne du cobaye [37]. L'étude de la localisation de la sous-unité E de la H⁺-ATPase et des échangeurs Cl-HCO₃ a démontré une distribution plus étendue de la sous-unité E (reflétant le caractère ubiquitaire des V-ATPases). De façon intrigante, les cellules interdentes et du sac endolymphatique ont été les sites principaux de l'immunoréactivité à la fois apicale de la H⁺-ATPase et basolatérale de l'échangeur d'anions. Ces cellules ont donc la machinerie intracellulaire nécessaire pour la sécrétion d'acide et elles ressemblent très étroitement aux cellules alpha-intercalaires qui sécrètent les ions H⁺ dans le néphron distal.

Ces observations sont en faveur de l'implication de la sous-unité B1 dans le maintien d'une fonction auditive normale, suggérant que la perte de la fonction de la sous-unité B1 dans l'oreille interne altère l'homéostasie endolymphatique du pH, provoquant une alcalinisation de l'endolymphe et altérant la fonction des cellules ciliaires. Des études antérieures *in vitro* des cellules ciliaires soutiennent cette hypothèse puisque l'exposition à un environnement alcalin de pH 8,0 ou plus altère la réponse contractile de ces cellules à des stimulus mécaniques [38]. Le mécanisme proposé de la surdité prédit qu'une invalidation sélective de l'expression de B1 dans l'oreille interne, comme cela peut être réalisé chez l'animal, devrait résulter en une surdité, sans avoir d'effet sur le pH systémique.

Ceci peut également expliquer l'observation clinique troublante selon laquelle le traitement systémique alcalinisant, alors qu'il corrige le pH systémique, est sans effet pour prévenir la progression de la surdité chez les malades ayant une acidose tubulaire distale [21]. L'inefficacité de traitement sur la physiologie endolymphatique anormale pourrait expliquer cette progression.

ACIDOSE TUBULAIRE DISTALE RÉCESSIVE AVEC AUDITION NORMALE

Parmi notre groupe d'acidose tubulaire distale récessive, se trouvent 13 familles dans lesquelles l'étude audiométrique a été rapportée comme normale. À l'exception de leur état auditif, ces 13 familles ne semblent pas différer soit dans leur présentation, soit dans la sévérité biochimique de leur défaut métabolique, de l'ensemble de la cohorte que nous avons rapportée et qui ont des mutations d'ATP6B1. Il n'y a pas de preuve statistiquement significative pour soutenir une liaison à ATP6B1 et nous avons donc poursuivi le criblage de l'ensemble du génome. Cette étude de liaison a identifié un nouveau locus dénommé rdRTA2 [39]. Comme ATP6B1, le produit du gène rdRTA2 doit être impliqué dans la sécrétion d'acide dans le néphron distal normal. Cependant, à l'inverse d'ATP6B1, il est probable que rdRTA2 ne joue pas un rôle indispensable dans la physiologie de l'oreille interne.

LOCALISATION DE rdRTA2

L'analyse des résultats du criblage initial de 20 cM dans ce groupe a identifié 7 intervalles avec des lod scores multiples supérieurs à 1, sur les chromosomes 5, 6, 7, 8, 16 et 18. Ceci n'a rien de surprenant dans une telle analyse étant donné la distance entre les marqueurs, la sélection d'un seuil bas de lod score pour poursuivre l'investigation et la proximité des relations parentales dans ces familles. D'autres marqueurs polymorphes ont été génotypés dans chacun de ces intervalles, ce qui a conduit à réduire les lod scores maximaux à moins de 1 chez tous sauf un segment, celui localisé sur le chromosome 7q33-34. À cet endroit, une localisation plus fine, utilisant des marqueurs très proches a permis de révéler la localisation rdRTA2, avec un lod score multipoint maximal de 8,84, représentant un *odds ratio* d'environ 680 millions sur 1. Environ 70 p. 100 de nos familles sans surdité sont liées à ce locus. Comme beaucoup de ces familles dans notre groupe avaient été recrutées en Turquie, nous avons cherché un possible effet fondateur en examinant les génotypes et les haplotypes originaux dans l'intervalle rdRTA2 dans ce groupe. Néanmoins, nous n'avons pas trouvé de preuve pour un déséquilibre de liaison, indiquant soit l'absence d'effet fondateur, soit un effet fondateur plus ancien qui ne pouvait pas être détecté à l'aide des marqueurs utilisés.

UNE NOUVELLE HÉTÉROGÉNÉITÉ PARMI LES ATR DISTALES RÉCESSIVES

Des études de liaison à ATP6B1 et rdRTA2 ont montré qu'il y a probablement au moins 2 autres gènes dont les défauts causent une acidose tubulaire distale. Premièrement, nous n'avons pas trouvé de mutation d'ATP6B1 dans 5 familles avec ATR distale et surdité qui étaient informatives pour l'étude de liaison. Quatre de ces familles avaient également des lod scores négatifs pour une liaison à 2p13 (respectivement -1,57, -1,53, -0,51 et -0,25) suggérant fortement l'existence d'un second gène pour ce phénotype.

Deuxièmement, seulement 77 p. 100 environ de nos familles avec étude audiométrique normale, sont liées à rdRTA2. La liaison à rdRTA2 n'était pas apparente dans 4 familles chez lesquelles il n'y avait en plus aucune preuve en faveur d'une mutation d'ATP6B1. Cependant le nombre de familles disponibles est faible et pourrait ne pas être suffisant pour détecter d'autres locus à moins d'utiliser des marqueurs bien plus nombreux et rapprochés et/ou de disposer de familles supplémentaires.

CORRÉLATIONS GÉNOTYPE-PHÉNOTYPE

L'étude des histoires cliniques des malades avec ATR distale mettent en évidence des différences entre ceux qui ont une maladie dominante et ceux qui ont une maladie récessive et ces différences peuvent être utiles à l'avenir pour détecter d'autres patients. En général l'âge au début est beaucoup plus jeune chez les malades récessifs, le diagnostic étant posé chez le propositus dans la toute première

enfance. L'hypokaliémie est plus sévère et tous les malades récessifs que nous avons étudiés avaient un retard de croissance. Dans notre cohorte, la néphrocalcinose était une manifestation constante dans ce sous-groupe, même chez un nouveau-né. À l'inverse, les malades dominants sont souvent identifiés à un âge plus avancé et bien que présentant souvent une lithiase rénale [40], ils peuvent parfois ne pas avoir de signe radiologique évident de néphrocalcinose. Mais il existe cependant un spectre de gravité clinique, à l'intérieur même des maladies dominantes antérieurement rapportées : par exemple un de nos malades avait un retard de croissance et un rachitisme lorsque le diagnostic a été posé à l'âge de 8 ans.

La présentation clinique dans l'adolescence ou à l'âge adulte, ou une croissance normale, en l'absence de traitement, suggère fortement une maladie dominante et doit diriger la recherche vers les mutations d'AE1 de même que vers l'étude des apparentés du premier degré. L'absence d'antécédents familiaux ne doit pas faire écarter une telle recherche puisque une mutation de novo peut être trouvée [27]. Ceci s'applique également à des enfants plus âgés avec retard de croissance et rachitisme dans le contexte d'une ATR distale de type 1.

La coségrégation de la surdité avec l'acidose tubulaire distale n'a jamais été rapportée dans les formes dominantes et elle semble bien limitée au phénotype récessif. Il y a également des variations phénotypiques parmi les malades récessifs et il est notable à cet égard que la maladie récessive sans surdité a été jusqu'à présent beaucoup moins rapportée ; l'audition semble préservée chez au moins un tiers des familles que nous avons recrutées. Pour beaucoup d'autres familles, les sujets atteints sont actuellement trop jeunes pour tirer des conclusions définitives des études audiométriques.

Enfin bien que le nombre de familles non liées au locus rdRTA2 soit actuellement trop faible pour tirer des conclusions définitives, il est possible qu'elles puissent se marquer par un désordre plus sévère de l'élimination rénale du calcium, puisque, en comparaison avec les familles apparemment liées, les propositus des familles non liées, n'ont pas tendance à une perte urinaire plus importante du calcium et les 4 cas avaient eu un rachitisme.

CONCLUSION

L'identification des défauts d'ATP6B1 dans l'ATR distale récessive a été la première implication d'un membre de la famille des gènes des V-ATPases en pathologie humaine. Étant donné que le caractère ubiquitaire et l'importance centrale des F- et V-ATPases dans la physiologie cellulaire normale, on pourrait s'attendre à ce que seules des mutations des isoformes des sous-unités spécifiques de certains tissus puissent conduire à un phénotype viable. L'élucidation ultérieure de la spécificité tissulaire des autres sous-unités de la H⁺-ATPase sera donc d'un grand intérêt, à la fois dans le contexte de l'acidose tubulaire distale et d'autres processus pathologiques.

Il reste encore beaucoup de recherche à effectuer sur la physiopathologie des ATR distales primitives et sur leur relation à la physiologie rénale normale et aux autres sites concernés, comme l'os et l'oreille. L'identification de leurs causes génétiques et des études fonctionnelles ultérieures seront donc capitales ; les progrès jusqu'à présent effectués illustrent l'utilité des désordres rares pour élucider une fonction physiologique normale.

Remerciements

L'auteur est *Senior Clinical Research Fellow of the Wellcome Trust*. Elle est reconnaissante aux malades, familles et médecins pour leur participation aux études décrites ci-dessus ; ses remerciements vont également à Karin Finberg, Anita Farhi, Annabel Smith et Richard Lifton.

Informations sur la base de données électroniques

Online Mendelian Inheritance in Man (MIM) — <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/>

BIBLIOGRAPHIE

- ALPERN RJ, RECTOR FC. Renal acidification mechanisms. *In* : BM Brenner. Brenner and Rectoris The Kidney, 5th ed., Philadelphia, Saunders, 1996, 408-471.
- STONE DK, XIE XS. Proton translocating ATPases : issues in structure and function. *Kidney Int*, 1988, **33**, 767-774.
- STONE DK, SELDIN DW, KOKKO JP et al. Anion dependence of rabbit medullary collecting duct acidification. *J Clin Invest*, 1983, **71**, 1505-1508.
- STEVENS TH, FORGAC M. Structure, function and regulation of the vacuolar H(+)-ATPase. *Ann Rev Cell Dev Biol*, 1997, **13**, 779-808.
- SUDHOF TC, FRIED VA, STONE DK et al. Human endomembrane H⁺ pump strongly resembles the ATP-synthetase of Archaeobacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, **86**, 6067-6071.
- MITCHELL P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*, 1961, **191**, 144-148.
- NELSON RD, GUO XL, MASOOD K et al. Selectively amplified expression of an isoform of the vacuolar H(+)-ATPase 56-kilodalton subunit in renal intercalated cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89**, 3541-3545.
- VAN HILLE B, RICHENER H, SCHMID P et al. Heterogeneity of vacuolar H(+)-ATPase : differential expression of two human subunit B isoforms. *Biochem J*, 1994, **303**, 191-198.
- BRETON S, TYSZKOWSKI R, SABOLIC I et al. Postnatal development of H⁺ ATPase (proton-pump)-rich cells in rat epididymis. *Histochem Cell Biol*, 1999, **111**, 97-105.
- ROUSSA E, THEVENOD F. Distribution of V-ATPase in rat salivary glands. *Eur J Morphol*, 1998, **36**, 147-152.
- BERNASCONI P, RAUSCH T, STRUVE I et al. An mRNA from human brain encodes an isoform of the B subunit of the vacuolar H(+)-ATPase. *J Biol Chem*, 1990, **265**, 17428-17431.
- SONG I, YAMADA T, TRENT JM. Mapping of the gene encoding the alpha-subunit of the human H(+), K(+)-ATPase to chromosome 19q13.1 by fluorescent in situ hybridization. *Genomics*, 1992, **14**, 547-548.
- WAGNER S, VOGEL R, LIETZKE R et al. Immunochemical characterization of a band 3-like anion exchanger in collecting duct of human kidney. *Am J Physiol*, 1987, **253**, F213-F221.
- TANNER MJ, MARTIN PG, HIGH S. The complete amino acid sequence of the human erythrocyte membrane anion-transport protein deduced from the cDNA sequence. *Biochem J*, 1988, **256**, 703-712.
- LUX SE, PALEK J. *In* : RI Handin, SE Lux, TP Stossell. *Blood : principles and practice*, Philadelphia, JB Lippincott, 1995, 1701-1808.
- TANNER MJ, BRUCE L, MARTIN PG et al. Melanesian hereditary ovalocytes have a deletion in red cell band 3. *Blood*, 1991, **78**, 2785-2786.

17. BASTANI B, GLUCK SL. New insights into the pathogenesis of distal renal tubular acidosis. *Miner Electrolyte Metab*, 1996, **22**, 396-409.
18. IGARASHI T, INATOMI J, SEKINE T et al. Mutations in SLC4A4 cause permanent isolated proximal renal tubular acidosis with ocular abnormalities. *Nature Genet*, 1999, **23**, 264-266.
19. LIGHTWOOD R. Communication no. 1. *Arch Dis Child*, 1935, **10**, 205.
20. BUTLER AM, WILSON JL, FARBER S. Dehydration and acidosis with calcification at renal tubules. *J Pediatr*, 1936, **8**, 489.
21. ZAKZOUK SM, SOBKI SH, MANSOUR F et al. Hearing impairment in association with distal renal tubular acidosis among Saudi children. *J Laryngol Otol*, 1995, **109**, 930-934.
22. BATLLE D, FLORES G. Underlying defects in distal renal tubular acidosis : new understandings. *Am J Kidney Dis*, 1996, **6**, 896-915.
23. KURTZMAN NA. Disorders of distal acidification. *Kidney Int*, 1990, **38**, 720-727.
24. ANONYMOUS. Unravelling of the molecular mechanisms of kidney stones. Report of a meeting of physicians and scientists. *Lancet*, 1996, **348**, 1561-1565.
25. BRUCE LJ, COPE DL, JONES GK et al. Familial distal renal tubular acidosis is associated with mutations in the red cell anion exchanger (band 3, AE1) gene. *J Clin Invest*, 1997, **100**, 1693-1707.
26. JAROLIM P, SHAYAKUL C, PRABAKARAN D et al. Autosomal dominant distal renal tubular acidosis is associated in three families with heterozygosity for the R589H mutation in the AE1 (band 3) Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger. *J Biol Chem*, 1998, **273**, 6380-6388.
27. KARET FE, GAINZA FJ, GYORY AZ et al. Mutations in the chloride-bicarbonate exchanger gene AE1 cause autosomal dominant but not autosomal recessive distal renal tubular acidosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**, 6337-6342.
28. KEMPF C, BROCK C, SIGRIST H et al. Interaction of phenylisothiocyanate with human erythrocyte band 3 protein. II. Topology of phenylisothiocyanate binding sites and influence of p-sulfophenylisothiocyanate on phenylisothiocyanate modification. *Biochim Biophys Acta*, 1981, **641**, 88-98.
29. BROCK CJ, TANNER MJ, KEMPF C. The human erythrocyte anion-transport protein. Partial amino acid sequence, conformation and a possible molecular mechanism for anion exchange. *Biochem J*, 1983, **213**, 577-586.
30. JAROLIM P, MURRAY JL, RUBIN HL et al. Characterization of 13 novel band 3 gene defects in hereditary spherocytosis with band 3 deficiency. *Blood*, 1996, **88**, 4366-4374.
31. LANDER ES, BOTSTEIN D. Homozygosity mapping — a way to map human recessive traits with the DNA of inbred children. *Science*, 1987, **236**, 1567-1570.
32. TANPHAICHITR VS, SUMBOONANONDA A, IDEGUCHI H et al. Novel AE1 mutations in recessive distal renal tubular acidosis. Loss-of-function is rescued by glycophorin A. *J Clin Invest*, 1998, **102**, 2173-2179.
33. VASUVATTAKUI S, YENCHITSOMANUS P, VACHUANICHSANONG P et al. Autosomal recessive distal renal tubular acidosis associated with Southeast Asian ovalocytosis. *Kidney Int*, 1999, **56**, 1674-1682.
34. KARET FE, FINBERG KE, NELSON RD, et al. Mutations in the gene encoding B1 subunit of H⁺-ATPase cause renal tubular acidosis with sensorineural deafness. *Nature Genet*, 1999, **21**, 84-90.
35. STEEL KP. Perspectives : biomedicine. The benefits of recycling. *Science*, 1999, **285**, 1363-1364.
36. MISRAHY GA, HILDRETH KM, CLARK LC et al. Measurement of the pH of endolymph in the cochlea of guinea pigs. *Am J Physiol*, 1958, **194**, 393-395.
37. STANKOVIC KM, BROWN D, ALPER SL et al. Localization of pH regulating proteins H⁺-ATPase and Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger in guinea pig inner ear. *Hear Res*, 1997, **114**, 21-34.
38. CANLON B, BRUNDIR L. Mechanically induced length changes of isolated outer hair cells are metabolically dependent. *Hear Res*, 1991, **53**, 7-16.
39. KARET FE, FINBERG KE, NAYIR A et al. Localization of a gene for autosomal recessive distal renal tubular acidosis with normal hearing (rdRTA2) to 7q33-34. *Am J Hum Genet*, 1999, **65**, 1656-1665.
40. GYORY AZ, EDWARDS KD. Renal tubular acidosis. A family with an autosomal dominant genetic defect in renal hydrogen ion transport, with proximal tubular and collecting duct dysfunction and increased metabolism of citrate and ammonia. *Am J Med*, 1968, **45**, 43-62.