



HAL
open science

Caractérisation fonctionnelle de canaux chlorure de la famille des ClC

Sandra Schmieder

► **To cite this version:**

Sandra Schmieder. Caractérisation fonctionnelle de canaux chlorure de la famille des ClC. Physiologie [q-bio.TO]. Université Nice Sophia Antipolis, 2000. Français. NNT: . tel-00012007

HAL Id: tel-00012007

<https://theses.hal.science/tel-00012007>

Submitted on 22 Mar 2006

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.

**UNIVERSITE DE NICE-SOPHIA ANTIPOLIS
FACULTE DES SCIENCES**

**Laboratoire de Physiologie des Membranes Cellulaires
(Bâtiment Jean Maetz)
Université de Nice-Sophia Antipolis
CNRS ERS 1253
LRC 16V
Villefranche sur Mer**

THESE

**présentée pour obtenir le titre de
Docteur en SCIENCES DE LA VIE**

**par
Sandra SCHMIEDER**

**Caractérisation fonctionnelle
de canaux chlorure de la famille
des ClC**

**Soutenue le 25 février 2000,
après rapports de M. Christophe Maurel et M. Jacques Teulon
devant la commission d'examen composée de**

**Monsieur le Professeur Jordi Ehrenfeld
Monsieur le Docteur Christophe Maurel
Monsieur le Docteur Jacques Teulon
Monsieur le Docteur Michael Pusch
Monsieur le Docteur Bernard Rossi**

**Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur**

A mes parents, ma famille.

Remerciements

Je tiens à exprimer ma sincère reconnaissance à mon Directeur de thèse et Directeur du Laboratoire, Monsieur Jordi Ehrenfeld, pour m'avoir accueillie au sein de son équipe, proposé ce sujet intéressant et formée au métier de chercheur. Je lui suis reconnaissante de m'avoir dirigé et soutenu dans mon travail. J'ai tout particulièrement apprécié la confiance qu'il m'a témoigné en m'accordant une grande liberté d'action.

Je remercie Monsieur Gérard Leblanc, précédent Directeur du Laboratoire, pour son accueil, ses conseils et son appui auprès du Commissariat à l'Energie Atomique, que je remercie pour son soutien financier qui m'a permis de mener à bien ce travail.

Au sein de notre équipe, je remercie Corinne Cousin pour sa grande disponibilité et son aide technique précieuse, Sabine Lindenthal pour sa collaboration et pour nos discussions scientifiques. Mon travail a également bénéficié de l'aide technique de Stéphanie Bogliolo et du travail de Umberto Banderali et de Nathalie Hélix, et je les en remercie.

J'ai pris beaucoup de plaisir à travailler durant ces quatre dernières années dans la bonne humeur et la bonne entente qui règne au Laboratoire. J'adresse un grand merci à tous les membres du laboratoire pour leur aide, leurs conseils et leur gentillesse. Je remercie toutes les personnes qui m'ont aidé, un jour ou l'autre, dans mon travail, en particulier le personnel du Centre Commun de Microscopie Appliquée de la Faculté des Sciences de Nice.

Je souhaite également faire part à Monsieur Jacques Teulon et Monsieur Christophe Maurel de toute ma reconnaissance pour avoir consacré un peu de leur temps précieux pour juger mon travail, rédiger un rapport et faire partie du jury de thèse. Je remercie également Monsieur Michael Pusch et Monsieur Bernard Rossi d'avoir accepté d'examiner mon travail et de participer au jury de thèse.

Enfin, je voudrais dire un immense Merci à ma famille et à mes amis pour la confiance, l'amitié et le soutien moral précieux qu'ils m'ont accordé.

SOMMAIRE

SOMMAIRE.....	1
ABREVIATIONS	5
INTRODUCTION	7
A. L'ion chlorure dans l'homéostasie.....	8
1. Principaux mécanismes de transport ionique.....	8
2. A la découverte des canaux chlorure.....	10
B. Rôles physiologiques des canaux chlorure.....	11
I- Stabilisation du potentiel de membrane.....	11
1. Cellules nerveuses	11
2. L'organe électrique du poisson torpille	12
3. Cellules musculaires.....	13
3.1. Caractérisation fonctionnelle de canaux chlorure musculaires.....	13
3.2. Caractérisation moléculaire d'un canal chlorure musculaire: le ClC-1.....	14
4. Cellules non-excitables.....	15
II- Transports transépithéliaux.....	16
1. Rôles physiologiques des épithélia.....	16
2. Mécanismes de transport ionique impliqués.....	16
3. Canaux chlorure impliqués dans la sécrétion gastrique.....	19
4. Canaux chlorure impliqués dans la fonction rénale.....	20
III- Régulation du volume cellulaire.....	22
1. Origine des variations de volume.....	22
2. Mécanismes de régulation du volume.....	23
3. Caractéristiques du courant chlorure sensible au volume: $I_{Cl\ swell}$ ou $I_{Cl\ vol}$	24
4. Nature moléculaire du canal chlorure sensible au volume.....	25
4.1. pICln.....	25
4.2. p-glycoprotéine et autres transporteurs ABC.....	26
4.3. Phospholemman.....	27
4.4. ClC-2	28
4.5. ClC-3	28
5. Cas particulier des cellules stomatiques.....	29
IV- Régulation du pH des organelles intracellulaires.....	29
1. Mécanismes de transport impliqués au niveau des endomembranes.....	30
2. Nature moléculaire des canaux chlorure	30
2.1. Les canaux chlorure de la famille VDAC	30
2.2. p64	31
2.3. NCC27.....	31
2.4. CFTR.....	32
2.5. Protéines de la famille des ClC.....	32
C. Présentation de la thématique et des objectifs	33
1. Modèle d'étude: la lignée cellulaire A6.....	33
2. Thématique de recherche	34
3. Stratégie de clonage.....	35
4. Présentation du travail de thèse.....	36

MATERIEL & METHODES	38
1. Culture cellulaire.....	39
2. Constructions plasmidiques utilisées.....	39
3. Expression fonctionnelle dans l'ovocyte de xénope: l'approche électrophysiologique.....	41
3.1. Transcription <i>in vitro</i>	41
3.2. Prélèvement et traitement des ovocytes.....	41
3.3. Injection des ovocytes.....	42
3.4. Voltage-clamp en double micro-électrodes.....	42
3.5. Substances pharmacologiques.....	43
3.6. Composition des milieux.....	44
4. Expression dans la lignée cellulaire HEK.....	45
5. Traduction <i>in vitro</i>	46
6. Immunodétection par Western blot.....	46
6.1. Les anticorps primaires et leur purification.....	46
6.2. L'anticorps secondaire.....	47
6.3. Préparation des fractions membranaires.....	47
6.4. SDS-PAGE.....	48
6.5. Electrotransfert sur membrane de nitrocellulose.....	49
6.6. Immunodétection.....	49
7. Etude de la glycosylation des protéines.....	50
7.1. Déglycosylations enzymatiques.....	50
7.2. Inhibition de la glycosylation par la tunicamycine.....	51
8. Immunocytochimie.....	52
8.1. Fixation et perméabilisation des cellules.....	52
8.2. Immunomarquage.....	52
9. Microscopie.....	53
 RESULTATS ET DISCUSSION.....	 55
A. Caractérisation fonctionnelle et distribution du xCIC-5.....	55
1. Caractéristiques moléculaires du xCIC-5.....	56
2. Expression fonctionnelle du xCIC-5 dans l'ovocyte de xénope Caractéristiques électrophysiologiques et pharmacologiques.....	57
2.1. Injection de l'ARNc du xCIC-5 avec les régions non-codantes natives.....	57
2.2. Injection de l'ARNc du xCIC-5 avec les régions non-codantes de la β -globine.....	59
2.3. Etude comparative du $I_{Cl\text{ swell}}$	61
2.4. Traduction <i>in vitro</i> des constructions plasmidiques.....	62
2.5. Immunodétection du xCIC-5 dans l'ovocyte de xénope.....	63
2.6. Discussion.....	64
3. Identification des différentes glycoformes du xCIC-5.....	67
3.1. Déglycosylation par traitement enzymatique.....	67
3.2. Inhibition de la glycosylation par la tunicamycine.....	67
3.3. Discussion.....	69
4. Etude de voies de signalisation.....	71
4.1. AMPc et Ca^{2+} intracellulaires. Voies protéines kinases A et C.....	71
4.2. Voies tyrosine protéines kinases.....	71
4.2.1 Effet inhibiteur de la génistéine.....	72
4.2.2. Autres inhibiteurs de tyrosine protéines kinases et phosphatases.....	72
4.2.3. Discussion.....	73
5. Inhibition par les ions métalliques.....	75
5.1. Résultats.....	75
5.2. Discussion.....	75

6. Sensibilité au pH	77
6.1. pH extracellulaire	77
6.2. pH intracellulaire	77
6.3. Discussion	78
7. Distribution tissulaire et localisation cellulaire du CIC-5	82
7.1. Spécificité des anticorps anti-xCIC-5	82
7.2. Distribution tissulaire du CIC-5	83
7.3. Localisation cellulaire	84
7.4. Discussion	85
8. Vers un modèle fonctionnel du CIC-5	87
8.1. CIC-5 et pathologies rénales	87
8.2. Apports de la caractérisation fonctionnelle du CIC-5	88
8.3. Apports des études de localisation tissulaire et cellulaire	88
8.4. Apports des modèles animaux transgéniques	89
B. Expression et distribution du CIC-3	91
1. Caractéristiques moléculaires du xCIC-3	92
2. Expression (fonctionnelle?) du xCIC-3	93
2.1. Approche électrophysiologique	93
2.2. Traduction <i>in vitro</i> des constructions plasmidiques	93
2.3. Immunodétection du xCIC-3 dans l'ovocyte de xénope	94
2.4. Mise en évidence de différentes glycoformes de xCIC-3	95
2.5. Expression du xCIC-3 dans la lignée cellulaire HEK 293	96
2.6. Discussion	97
3. Distribution tissulaire et localisation cellulaire du CIC-3	100
3.1. Spécificité des anticorps anti-CIC-3	100
3.2. Étude du CIC-3 chez la souris	102
4. Discussion générale	105
4.1. Le CIC-3 est-il impliqué dans la régulation du volume?	105
4.2. Le CIC-3 constitue-t-il un canal intracellulaire?	106
RESUME & PERSPECTIVES	109
1. Variété fonctionnelle des canaux chlorure	110
2. Variété moléculaire des canaux chlorure	110
3. Apports de notre étude	111
4. Perspectives	112
4.1. Perspectives concernant l'étude du CIC-5	112
4.2. Perspectives concernant l'étude du CIC-3	114
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	116

ABBREVIATIONS

9-AC: anthracène- 9 -carboxylate
ADH: hormone antidiurétique
ADNc: acide déoxyribonucléique complémentaire
AMPc: adénosine monophosphate cyclique
ARNc: acide ribonucléique complémentaire
ARNm: acide ribonucléique messenger
ATP: adénosine triphosphate
AVP: arginine vasopressine
AVT: arginine vasotocine
BSA: albumine de sérum bovin
DDFSK: 1, 9 -didéoxyforskoline
DIDS: acide 4, 4' -dinitrostilbène- 2, 2' -disulfonique
DPC: acide diphénylamine- 2 -carboxylique
EDTA: éthylène diamine tétraacétate
HEPES: N-[2 -hydroxyléthyl] piperazine-N'-[acide 2 -éthane sulfonique]
IAA-94: 2-[(2-cyclopyntyl-6,7-dichloro-2,3-dihydro-2-méthyl-1-oxo-1H-inden-5-yl)oxy]acetic acid
MES: acide 2- (N-morpholino) éthane sulfonique
MOPS: acide 3- (N-morpholino) propane sulfonique
NPPB: acide 5 -nitro- 2 -(3-phénylpropylamino) benzoïque
PBS: phosphate buffered saline
PCR: polymerase chain reaction
RACE: rapid amplification of cDNA ends
SITS: acide 4 -acétamido- 4' -isothiocyano-stilbène- 2, 2' -disulfonique
TBS: tris buffered saline
TEMED: N,N,N',N'- tétraméthyléthylène diamine

INTRODUCTION

A. L'ion chlorure dans l'homéostasie

Les organismes vivants tendent naturellement à maintenir leurs paramètres biologiques constants face aux variations du milieu extérieur. Ce concept a été énoncé pour la première fois en 1857 par le physiologiste français, Claude Bernard (Bernard, 1857). En 1929, Cannon définit l'*Homéostasie* comme l'ensemble des processus physiologiques coordonnés, visant à maintenir les composantes physico-chimiques du milieu intérieur constants (Cannon, 1929,1939). Les processus physiologiques apparaissent hautement coordonnés et font l'objet d'une régulation précise, pour limiter les variations des paramètres cellulaires, tels que le volume ou le pH, dans une gamme physiologique étroite.

Le maintien de l'électroneutralité des milieux intra- et extracellulaire représente un exemple de constance cellulaire. Il s'agit de la compensation mutuelle des charges positives et négatives présentes dans un compartiment donné. Plus de la moitié des anions de la cellule sont des anions organiques non diffusibles et de ce fait, leur rôle en tant que régulateurs de l'électroneutralité est limité. Par contre, l'*ion chlorure*, anion diffusible le plus abondant dans le règne animal ou végétal, représente l'un des principaux acteurs impliqués dans l'électroneutralité et plus généralement dans l'homéostasie cellulaire.

Les échanges d'ions chlorure à travers les membranes cellulaires (y compris les membranes des compartiments intracellulaires) sont impliqués dans de nombreux aspects de la vie cellulaire tels que la stabilisation du potentiel de membrane, la régulation du volume, la régulation du pH ou les transports transépithéliaux. Pour traverser la membrane, les ions chlorure sont pris en charge par diverses protéines de transport.

1. Principaux mécanismes de transport ionique

Les concentrations intracellulaires des différentes espèces ioniques sont maintenues à des valeurs spécifiques du type cellulaire et dans des limites restreintes (homéostasie cellulaire). Généralement, la répartition des ions est asymétrique de part et d'autre de la membrane. Cette distribution résulte de l'activité des mécanismes de transport ionique. On distingue les transports actifs, qui établissent des gradients électrochimiques, et les transports passifs, qui les dissipent. La répartition asymétrique des ions est maintenue par la coordination des mécanismes actifs d'accumulation intracellulaire et des mécanismes passifs de dissipation du gradient électrochimique.

Parmi les transports actifs, on distingue les transports actifs primaires et secondaires. On les distingue selon la nature de l'énergie qu'ils consomment. Les transports actifs primaires consomment de l'énergie métabolique, généralement celle libérée par l'hydrolyse de l'ATP: on parle d'ATPase (ou de "pompe"). Les transports actifs secondaires ne consomment pas

directement l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP. Ils utilisent l'énergie des gradients chimiques établis par les transports actifs primaires. La majorité des cellules possèdent une Na^+/K^+ ATPase, qui échange 2 K^+ (accumulation) contre 3 Na^+ (extrusion). Ce transport électrogénique consomme 30 à 70% de l'énergie dépensée selon le type cellulaire. Il contribue au potentiel intracellulaire négatif et établit des gradients chimiques pour les ions sodium et potassium. La cellule possède également des calcium-ATPases et des proton-ATPases dont la localisation est définie au niveau cellulaire selon leur rôles physiologiques. En revanche, il n'existe aucune ATPase transportant des ions chlorure chez les cellules de mammifère (Gerencser, 1988).

Cependant, les ions chlorure ne sont généralement pas distribués passivement de part et d'autre de la membrane plasmique. En effet, l'équilibre de Nernst (Nernst, 1888) fixerait la concentration intracellulaire des ions chlorure à 10 mM pour une cellule dont le potentiel de repos serait de -60 mV avec une concentration en chlorure extracellulaire de 100 mM. Or, la concentration en chlorure intracellulaire généralement rencontrée dans ces conditions est proche de 30 mM. Les ions chlorure sont donc accumulés au dessus de leur potentiel électrochimique. Au repos, le gradient électrochimique est donc sortant, mais il reste relativement faible, car le potentiel d'équilibre des ions chlorure ($-65 \text{ mV} > E_{\text{Cl}} > -35 \text{ mV}$, selon les types cellulaires) est proche du potentiel de repos de la membrane (V_m). Le gradient des ions chlorure est généré par le fonctionnement de transporteurs actifs secondaires tels que les co-transporteurs électroneutres $\text{Na}^+/\text{K}^+ / 2\text{Cl}^-$, Na^+/Cl^- et $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$. Les deux premiers de ces co-transporteurs fonctionnent grâce à l'énergie fournie par le gradient électrochimique des ions sodium.

Les voies de perméabilité passives sont constituées de différents *canaux chlorure* qui co-existent dans les membranes cellulaires et ce, probablement, chez toutes les espèces. Ces canaux, généralement silencieux, s'activent suite à une stimulation. Très efficaces, ils laissent diffuser environ 10 millions d'ions par seconde et par canal, ce qui génère un courant de quelques picoampères (pA) à chaque ouverture de canal. De ce fait, ils sont moins représentés (quelques milliers de canaux par cellule) que les mécanismes de transport actifs dont les capacités de transport sont environ 1000 fois moindres. Comme le potentiel d'équilibre des ions chlorure est généralement proche du potentiel de membrane, l'ouverture de canaux chlorure provoquera un flux passif, dont l'incidence sur le potentiel de membrane sera limitée en ampleur.

Cette étude étant consacrée à la caractérisation fonctionnelle de deux canaux chlorure, je voudrais utiliser cette introduction pour illustrer l'importance physiologique des canaux chlorure à travers les principales fonctions qu'ils assurent. Dans ce cadre, je décrirai brièvement les caractéristiques des différents canaux chlorure identifiés au niveau moléculaire.

2. A la découverte des canaux chlorure

L'implication des ions chlorure dans des fonctions physiologiques ou cellulaires est apparue assez lentement, car les techniques initialement utilisées pour étudier les voies de perméabilité membranaires (traceurs isotopiques, électrophysiologie macroscopique) se prêtaient plus difficilement à l'étude des conductances aux ions chlorure. Ainsi, les physiologistes ont concentré leurs efforts sur l'étude des mouvements cationiques, en particulier les transports de sodium et de potassium. Par exemple, les mesures de courant de court-circuit en chambre de Ussing dans les années 50 ont permis de mettre en évidence le transport actif d'ions sodium à travers la peau de grenouille (Ussing and Zerahn, 1951). Ce modèle est encore d'actualité et a été généralisé à de nombreux épithelia.

Dans les années 60, le transport actif de sodium était considéré comme le principal mécanisme responsable des transports transépithéliaux d'électrolytes (Ussing and Windhager, 1964). A cette époque, le rôle secondaire des ions chlorure dans le potentiel transépithélial (peau de grenouille, glande salivaire) (Lundberg, 1957) ou encore dans l'acidification stomacale (Hogben, 1955; Heinz and Durbin, 1959) était décrit, mais les mécanismes de transport impliqués n'étaient pas encore identifiés.

Ultérieurement, des études menées à l'aide de microélectrodes sélectives et de sondes fluorescentes sensibles aux électrolytes profitaient encore largement à l'étude des conductances cationiques. De plus, l'étude des voies anioniques et des transporteurs d'ions chlorure était rendue délicate par l'absence d'une pharmacologie spécifique. Bien que le concept des canaux ioniques soit apparu dès le début des années 50 (Hodgkin et Huxley, 1952), c'est seulement en 1976 que leur existence a pu être démontrée grâce à l'avènement du "patch-clamp" (Neher and Sakmann, 1976). Cette avancée technologique a enfin permis de mettre en évidence l'existence des canaux chlorure (Hamill, 1981) et l'analyse électrophysiologique a montré leur diversité fonctionnelle.

Depuis une douzaine d'années, la biologie moléculaire a confirmé la diversité des canaux chlorure au niveau moléculaire, avec l'identification de plusieurs familles de gènes. L'enjeu actuel reste la détermination des rôles physiologiques de la plupart de ces canaux clonés et la poursuite de l'identification moléculaire de nouveaux canaux chlorure, appartenant notamment à de nouvelles familles de gènes.

B. Rôles physiologiques des canaux chlorure

Les canaux chlorure sont impliqués dans divers processus indispensables à la vie cellulaire, généralement de concert avec d'autres mécanismes de transport ioniques et de solutés organiques. Pour réaliser ces fonctions variées, ubiquitaires ou spécifiques à un type cellulaire, les cellules possèdent des canaux chlorure très variés par leurs caractéristiques structurales et fonctionnelles.

I- Stabilisation du potentiel de membrane

Un flux net d'ions à travers une membrane génère un potentiel électrique. De ce fait, le déséquilibre des concentrations ioniques se traduit par une différence de potentiel de part et d'autre de la membrane. Au repos, le potentiel de membrane, V_m , est la résultante des différentes conductances membranaires aux anions et cations (**Figure 1**). Dans la plupart des cellules, la conductance dominante au repos est la conductance aux ions potassium. Par conséquent, le potentiel de repos de nombreuses cellules est proche du potentiel d'équilibre des ions potassium, qui se situe en moyenne aux alentours de -90 mV. L'ouverture d'une conductance aux ions chlorure va déplacer le potentiel de membrane vers le potentiel d'équilibre des ions chlorure, c'est à dire dépolariser la membrane. Par contre, si la membrane est dépolarisée (généralement par un flux entrant d'ions sodium ou calcium), alors une augmentation de la conductance aux ions chlorure aura un effet hyperpolarisant (ou repolarisant). Dans tous les cas de figure, l'ouverture de canaux chlorure aura pour effet de stabiliser le potentiel de membrane près du potentiel d'équilibre des ions chlorure, qui n'est généralement pas très loin du potentiel de repos. De manière générale, les canaux chlorure interviennent donc dans le contrôle du potentiel de membrane et de l'excitabilité membranaire.

1. Cellules nerveuses

La conduction nerveuse correspond à une vague d'activation de canaux sodium qui se déplace le long de l'axone. L'influx d'ions sodium dépolarise la membrane ce qui active des canaux potassium, puis des canaux chlorure, dépendants du voltage. La sortie d'ions potassium qui en résulte est responsable de la repolarisation de la membrane qui permet l'inactivation des canaux sodium. L'augmentation de la perméabilité aux ions chlorure en fin de repolarisation (du fait d'une cinétique d'activation plus lente des canaux chlorure) contribue au retour au potentiel de repos.

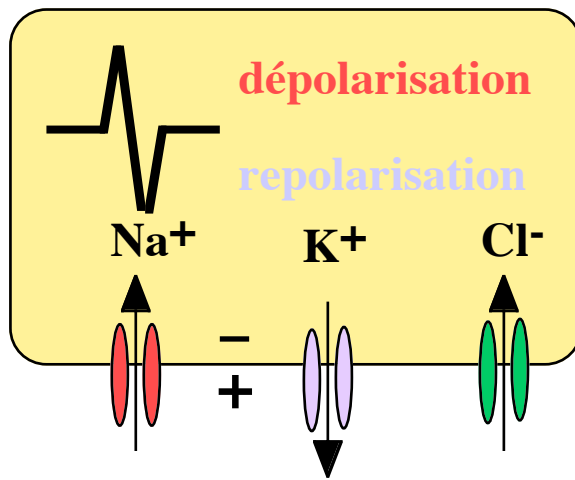


Figure 1: Illustration du rôle des canaux chlorure dans la stabilisation du potentiel de membrane, V_m . Le potentiel de membrane dépend des conductances membranaires relatives aux anions et cations. Il est défini par l'équation de Goldman-Hodgkin-Katz.

Au niveau synaptique, l'activation de canaux chlorure joue un rôle inhibiteur sur le déclenchement du potentiel d'action. En effet, l'augmentation de la perméabilité aux ions chlorure diminue l'effet dépolarisant de l'influx sodique à l'origine du potentiel d'action. L'activation de ces canaux chlorure dépend de la liaison des neurotransmetteurs inhibiteurs GABA (acide gamma-aminobutyrique) ou glycine (**Figure 2**). La nature moléculaire des ces canaux chlorure-récepteurs est connue (pour revue, Burt, 1994, Betz et al., 1999). Ils appartiennent à la même superfamille de canaux ionique-récepteurs que les récepteurs à l'acétylcholine et à la sérotonine (neurotransmetteurs excitateurs) qui sont des canaux cationiques. Ces canaux possèdent une structure pentamérique. Chaque sous-unité possède une masse moléculaire d'environ 50-60 kDa et présente quatre domaines potentiellement transmembranaires. Pour les récepteurs GABA_A, il existe au moins 19 sous-unités différentes, classées en 6 types. Les différentes combinaison de ces sous-unités permettent de générer la diversité des récepteurs GABA_A aux propriétés biophysiques variés (Darlison and Harvey, 1996). Les dysfonctionnements des récepteurs GABA_A et glycine, qu'ils soient héréditaires ou acquis, sont impliqués dans divers troubles neurologiques et psychiatriques (Darlison and Harvey, 1996) tels que l'épilepsie (Meldrum, 1989; Tasker and Dudek, 1991), l'hyperekplexie (Shiang et al., 1993; Brune et al., 1996) et la spasmophilie (Ryan et al., 1994; Mülhardt et al., 1994).

Un petit nombre d'études a permis de mettre en évidence d'autres conductances aux ions chlorure dans les cellules nerveuses (Hughes et al., 1987; Franciolini and Nonner, 1987; Franciolini and Petris, 1988; Blatz, 1991). Ces courants chlorure peu caractérisés sont distincts de ceux liés aux récepteurs GABA_A ou glycine. La nature moléculaire des canaux responsables de ces courants et leur rôle physiologique n'ont pas encore été déterminés.

2. L'organe électrique du poisson torpille

L'électroplaque de *Torpedo* est une structure spécialisée composée de cellules excitables, les électrocytes. Lors d'une stimulation, ces cellules sont capables de générer des potentiels transcellulaires, qui se cumulent grâce à l'empilement des cellules. Ainsi, l'électroplaque de la torpille fonctionne comme un accumulateur, capable de délivrer des décharges électriques qui peuvent atteindre 100 V. Au niveau cellulaire, le potentiel transcellulaire est produit par l'action simultanée de canaux sodium (récepteurs nicotiques) sur la membrane innervée et de canaux chlorure sur la membrane non-innervée. Sous l'effet d'une stimulation, la libération d'acétylcholine provoque l'influx d'ions sodium qui va dépolariser la membrane innervée, alors que le potentiel de la membrane opposée sera stabilisé à une valeur proche du potentiel de repos par l'influx des ions chlorure. Ce dernier est assuré par un canal chlorure fortement exprimé au niveau des électrocytes et dont l'activité est stimulée par la dépolarisation. Ainsi, l'organe électrique du poisson torpille a constitué le matériel de départ pour le clonage par expression de ce canal dépendant du voltage et a permis l'identification moléculaire du premier membre de la famille des CIC (Jentsch, 1994; Jentsch et al., 1993, 1995 et 1999) (**Figure 3**): le CIC-0 (Jentsch

et al., 1990). Le profile d'hydropathie de l'ADNc isolé montre que la protéine de 805 acides aminés possède 13 domaines potentiellement transmembranaires. Cependant, la topologie des canaux ClC a fait l'objet de plusieurs études qui favorisent une organisation en seulement 10 à 12 domaines transmembranaires effectifs (Gründer et al., 1992; Kieferle et al., 1994, Schmidt-Rose and Jentsch, 1997). L'expression fonctionnelle du ClC-0 dans l'ovocyte de xénope a donné lieu à des courants anioniques identiques à ceux observés lors de la reconstitution du canal dans des bicouches lipidiques, y compris son comportement en "double canon" (*double-barreled*), suggérant que le ClC-0 ne nécessite pas d'autre protéine associée pour être fonctionnel (Bauer et al., 1991). Le courant induit par le ClC-0 est de type rectifié sortant avec une sélectivité anionique de type $Cl^- > I^-$. Il nécessite une hyperpolarisation pour être activé et présente une sensibilité aux inhibiteurs des canaux chlorure 9-AC, DIDS et DPC. L'étude de la distribution du ClC-0 montre que chez la torpille il est également présent dans le muscle squelettique et le cerveau (Jentsch et al., 1990). Dans l'organe électrique, la protéine a été localisée sur la face non-innervée des électrocytes (Jentsch et al., 1993), ce qui est accord avec la fonction qu'il exerce.

3. Cellules musculaires

Les cellules du muscle squelettique sont aussi des cellules excitables dans lesquelles le fonctionnement des canaux chlorure intervient au repos et au moment du potentiel d'action. Au repos, les myocytes ont une conductance aux ions chlorure particulièrement élevée (Bretag, 1987). Elle représente 70-80% de la conductance membranaire totale, ce qui en fait l'élément déterminant pour le potentiel de repos, à la place de la conductance aux ions potassium qui joue habituellement ce rôle. Pendant le potentiel d'action, l'influx d'ions sodium produit une dépolarisation. Cette dépolarisation active des canaux potassium et chlorure dépendants du voltage et produit un effet repolarisant sur la membrane plasmique des myocytes. Le défaut de cet effet repolarisant, qu'il soit d'origine génétique ou pharmacologique, permet aux canaux sodium d'induire des trains de potentiels d'action. Ce phénomène d'hyperexcitabilité est à l'origine de l'absence de la relaxation musculaire observée dans diverses formes de myopathie (Adrian and Bryant, 1974).

3.1. Caractérisation fonctionnelle de canaux chlorure musculaires

Par des études de patch-clamp, on a pu démontrer l'existence de différents courants anioniques dans les cellules du muscle squelettique chez les invertébrés et les vertébrés (Bretag, 1987). Chez les mammifères, trois types de canaux chlorure ont pu être identifiés dans des cellules musculaires en culture. Le premier canal chlorure qui a pu être mis en évidence est un canal de type *mégacanal*, qui se caractérise par sa très forte conductance unitaire (> 400 pS) (Blatz and Magleby, 1983). Les deux autres canaux chlorure identifiés dans des cellules musculaires ont des conductances intermédiaires de 45 pS et 60 pS et ont été désignés comme

Figure 2: Les canaux chlorure dépendants d'un ligand, les récepteurs GABA_A et glycine.

Ces canaux chlorure sont des récepteurs aux neurotransmetteurs GABA (acide gamma-aminobutyrique) et glycine.

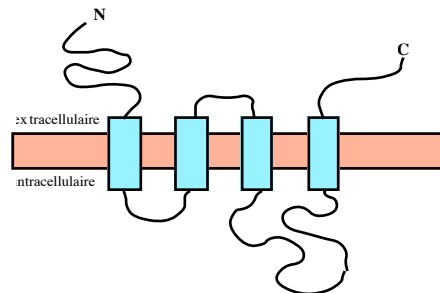
Caractéristiques moléculaires

Récepteurs GABA_A: il existe au moins 19 sous-unités différentes, d'environ 50 à 60 kDa, classées en α , β , γ , δ , ρ et π . Il existerait aussi des variantes obtenues par épissage alternatif.

Récepteurs glycine: il existe des sous-unités de type α et β , ainsi que des variantes d'épissage alternatif.

Organisation structurale

Ces protéines possèdent une structure pentamérique, composée de sous-unités de différents types avec des stoechiométries variées (parfois non déterminées). Chaque sous-unité possède quatre domaines transmembranaires. Les extrémités N- et C-terminales seraient localisées à l'extérieur de la cellule. Le modèle topologique d'une sous-unité est représenté ci-dessous.



Caractéristiques fonctionnelles

Agonistes

GABA_A: isoguvacine, muscimol
GABA_B: L-baclofen
glycine: β -alanine, taurine

Antagonistes

GABA_A: bicuculline
GABA_B: 2- hydroxy-s-(-)- saclofen
glycine: strychnine, picrotoxine

Distribution tissulaire

Système nerveux central et périphérique

Pathologies associées

Troubles neurologiques et psychiatriques (épilepsie, hyperekplexie, spasmophilie)

Figure 3: Les canaux chlorure dépendants du voltage: la famille des ClC.

Le clonage par expression du ClC-0, à partir de l'électroplaque de *Torpedo marmorata* (Jentsch et al., 1990), a donné un formidable élan à l'identification moléculaire d'autres canaux chlorure dépendants du voltage par des clonages par homologie. A présent, des canaux chlorure de la famille des ClC ont été identifiés chez des organismes eucaryotes (règnes végétal et animal), même primitifs (*Saccharomyces cerevisiae*) et chez certains organismes procaryotes (*Escherichia coli*) (pour revue voir Jentsch et al., 1999). Actuellement, au moins neuf membres de la famille des ClC ont pu être isolés chez une même espèce mammalienne. L'expression fonctionnelle dans des systèmes cellulaires de plusieurs membres de la famille a permis d'observer des courants chlorure (Steinmeyer et al., 1991; Thiemann et al., 1992; Kawasaki et al., 1994 et 1995; Steinmeyer et al., 1995; Sakamoto et al., 1996; Duan et al., 1997 et 1999; Schmieder et al., 1998; Mo et al., 1999; Friedrich et al., 1999) et la reconstitution dans des liposomes du ClC-0 purifié a démontré que le ClC-0 constitue un canal chlorure fonctionnel (Middleton et al., 1994). D'après l'ensemble de ces études, il semble maintenant établi que les gènes de la famille des ClC codent pour des canaux chlorure.

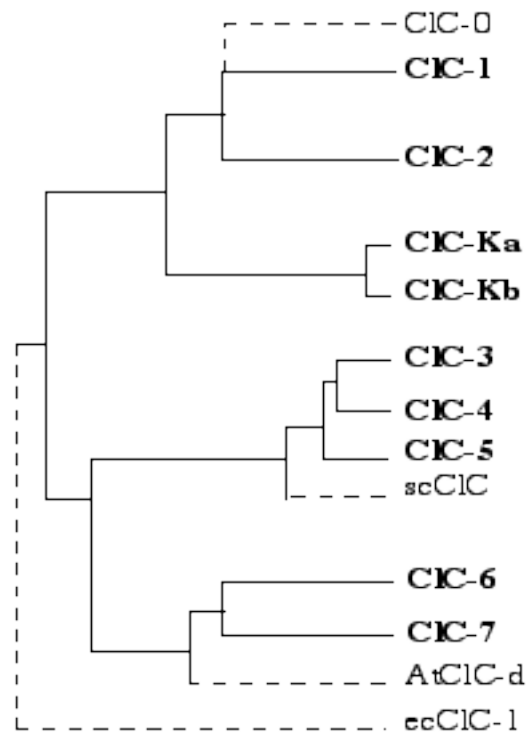
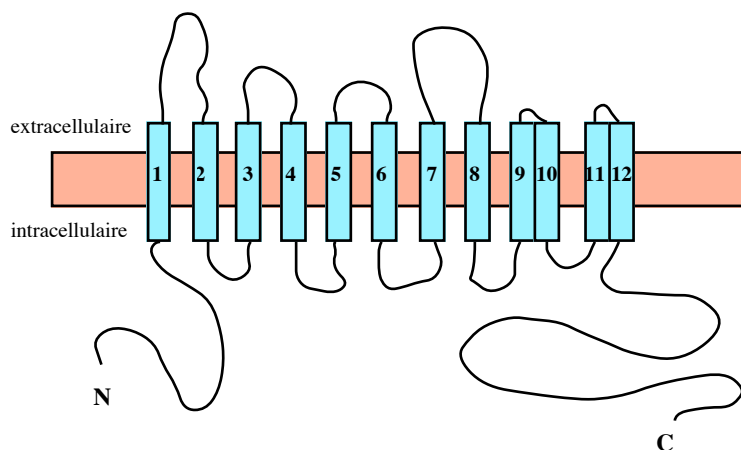


Figure 3 (suite)

Caractéristiques moléculaires / Organisation structurale

Les CIC sont des protéines d'environ 680 à 910 acides aminés (70 à 95 kDa). Ils possèdent 13 domaines hydrophobes qui s'organisent en hélice α , mais seulement 10 à 12 domaines seraient effectivement transmembranaires. Les CIC s'organiseraient en homo- ou hétéromultimères (par 2 ou par 4) pour former un canal fonctionnel. Le modèle topologique proposé est représenté ci-dessous.



Caractéristiques fonctionnelles et localisation de quelques CIC

	CIC-0	CIC-1	CIC-2	CIC-K1/a	CIC-K2/b
Pharmacologie	9-AC, DPC DIDS	9-AC	9-AC, DPC	DIDS, 9-AC	n.d.
Conductance	linéaire 10 pS	IR ($V_m > 0$) 1-2 pS	IR 3-5 pS	OR	n.d.
Sélectivité	Cl ⁻ > I ⁻	Cl ⁻ > I ⁻	Cl ⁻ > I ⁻	Cl ⁻ > I ⁻	n.d.
Distribution	électroplaque	muscle squelettique	ubiquitaire	partie médullaire anse de Henle	partie corticale anse de Henle
Pathologies associées	myotonies de Becker et Thomsen			diabète insipide néphrogénique	syndrome de Bratter et Gittelman

des canaux chlorure rapides (*fast*) et lents (*slow*), respectivement (Blatz and Magleby, 1985). Le rôle physiologique et la nature moléculaire de ces canaux n'ont pas encore été élucidés.

3.2. Caractérisation moléculaire d'un canal chlorure musculaire: le CIC-1

Après avoir cloné par expression le CIC-0, l'équipe de Jentsch a tenté d'identifier le canal chlorure impliqué dans la stabilisation du potentiel de membrane dans le muscle squelettique. Sachant que l'organe électrique dérive du muscle squelettique, il était raisonnable d'espérer identifier le canal chlorure en question par une stratégie de clonage par homologie avec le CIC-0. En 1991, l'équipe de Jentsch a donc isolé un ADNc homologue, appelé CIC-1 à partir du muscle squelettique de rat (Steinmeyer et al., 1991) (**Figure 3**). Le CIC-1 possède l'organisation en 10-12 domaines trans-membranaires commune aux canaux chlorure de la famille des CIC. Sa caractérisation électrophysiologique a montré qu'il est activé par la dépolarisation (Steinmeyer et al., 1991) et qu'il présente une sensibilité aux pH intra- et extracellulaire (Fahlke et al., 1996; Rychkov et al., 1996 et 1997). Le courant lié au CIC-1 est sensible au 9-AC (Steinmeyer et al., 1991), ainsi qu'aux ions cadmium (Cd^{2+}) (Rychkov et al., 1997). L'effet de ces inhibiteurs est dépendant du pH extracellulaire (Rychkov et al., 1997). De plus, sa courbe courant-voltage est rectifiée entrant dans les voltages positifs (Steinmeyer et al., 1991), sa sélectivité anionique est de type $\text{Cl}^- > \text{I}^-$ (Steinmeyer et al., 1994) et sa conductance unitaire est de 1-2 pS (Pusch et al., 1994). Cette faible conductance unitaire a été déterminée par une technique d'analyse de bruit. L'analyse par la technique classique de patch-clamp n'a pas une résolution suffisante pour détecter des courants dont la conductance est aussi faible, ce qui explique certainement le fait qu'aucune des études réalisées auparavant n'ait fait la description de ce courant dans les cellules musculaires. Néanmoins, les caractéristiques macroscopiques de ce courant correspondent à celles déterminées sur des fibres musculaires intactes (Palade and Barchi, 1977; Bretag, 1987). De plus, chez le rat l'expression du CIC-1 est prédominante dans le muscle squelettique et augmente durant les trois premières semaines post-natales (Steinmeyer et al., 1991), simultanément à la conductance au chlorure (Conte Camerino et al., 1989). Aussi, l'expression du CIC-1 dépend de l'innervation des cellules musculaires (Klocke et al., 1994). Enfin, des mutations dans le gène codant pour le CIC-1 ont été mises en évidence chez des modèles animaux myotoniques (Steinmeyer et al., 1991), ainsi que chez des patients atteints d'un type particulier de myotonie, appelé *myotonia congenita* (Koch et al., 1992; Steinmeyer et al., 1994; Pusch et al., 1995). L'ensemble de ces données identifie le CIC-1 comme le canal chlorure fonctionnellement majoritaire du muscle squelettique.

Diverses mutations du gène codant pour le CIC-1 ont été identifiées dans les formes récessives (myotonie de Becker) et dominantes (myotonie de Thomsen) de cette maladie (Koch et al., 1992; Steinmeyer et al., 1994; Pusch et al., 1995). Les mutations responsables de la forme récessive sont des mutations qui abolissent totalement le fonctionnement du canal, tandis que des mutations ponctuelles qui modifient les caractéristiques fonctionnelles du canal sont à l'origine

de sa forme dominante. Ceci s'explique par le fait que le fonctionnement du canal s'effectue sous une forme multimérique dont le nombre exact de sous-unités est encore controversé (Steinmeyer et al., 1994; Fahlke et al., 1997 et 1998; Jentsch et al., 1999).

L'implication du CIC-1 dans la myotonie a facilité l'identification de sa fonction dans les cellules musculaires. Aujourd'hui, il fait parti des canaux chlorure les mieux caractérisés, en particulier grâce à un nombre important d'études structure-fonction.

4. Cellules non-excitables

Dans les cellules non-excitables, un certain nombre d'événements font également intervenir des canaux chlorure dépendants du voltage pour contrôler le potentiel de membrane. C'est le cas de nombreux événements cellulaires qui dépendent d'un signal calcium, comme la fécondation, la division cellulaire ou la sécrétion. La dégranulation des mastocytes en fournit un exemple (Penner et al., 1988; Romanin et al., 1991). Le stimulus initial de la dégranulation est la liaison d'antigènes sur des récepteurs membranaires. Ces récepteurs s'agrègent et induisent une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire responsable de l'exocytose des granules. Le signal calcique est produit par un influx de Ca^{2+} extracellulaire, qui dépolarise la membrane. Or, la dépolarisation réduit la force électromotrice favorable à l'influx du Ca^{2+} . La repolarisation de la membrane est alors nécessaire pour prolonger l'influx calcique. En présence d'une faible densité de canaux potassium, c'est la perméabilité aux ions chlorure qui va définir le potentiel de membrane des mastocytes. Une augmentation de l'AMPc intracellulaire active des canaux chlorure et l'influx d'ions chlorure rétablit un potentiel intracellulaire négatif prolongeant l'influx calcique. L'utilisation d'inhibiteurs du courant chlorure permet par conséquent d'empêcher la dégranulation des mastocytes. Les canaux chlorure en question sont sensibles au NPPB et au cromolyn (Romanin et al., 1991). Le cromolyn est couramment utilisé pour bloquer la libération de sérotonine par les mastocytes dans le traitement prophylactique de l'asthme d'origine allergique (Cox, 1967; Cox et al., 1970).

De manière similaire, le contrôle du potentiel de membrane exercé par les canaux chlorure intervient dans la cytotoxicité des lymphocytes T et des cellules NK (*natural killer*) (Gray and Russel, 1986; Prochazka et al. 1988). En effet, l'activité de canaux chlorure est nécessaire au signal calcium menant de la stimulation antigénique à la réponse cytotoxique. Comme dans les mastocytes, l'activité des canaux chlorure autoriserait l'influx calcique en maintenant un potentiel intracellulaire suffisamment négatif.

II- Transports transépithéiaux

1. Rôles physiologiques des épithélia

Les structures épithéliales constituent des barrières séparant différents compartiments dont certains correspondent au milieu extérieur aérien ou aquatique. Les cellules épithéliales s'organisent généralement en une ou plusieurs couches et sont de hauts lieux d'échange de substances diverses. Pour assurer des échanges directionnels, les cellules épithéliales adoptent une structure polarisée. La polarité repose sur la distribution asymétrique des protéines, dû à un adressage différentiel vers des domaines membranaires distincts (apical ou baso-latéral).

Les transports transépithéiaux de sels sont impliqués dans l'élaboration de diverses sécrétions, telles que les sécrétions muqueuses (des voies aériennes, gastrique, intestinales...), les sécrétions glandulaires (glandes salivaires, glandes lacrimales, glandes sudoripares...) et les sécrétions de fluides corporels (endolymphe et périlymphe de la cochlée, liquide céphalo-rachidien...). En réalisant des transports transépithéiaux d'ions, les épithélia jouent également un rôle physiologique important dans le maintien de la balance hydrominérale et dans l'osmorégulation. En effet, les transports ioniques s'accompagnent de flux d'eau osmotique, qui interviennent dans l'équilibre hydrique de l'organisme.

Les problèmes d'osmorégulation qui se posent aux organismes dépendent de la nature de leur environnement immédiat. Les organismes les plus exposés à des conditions de pression osmotique éloignée de valeurs physiologiques sont les organismes aquatiques ou semi-aquatiques (poissons, crustacés, amphibiens...). Au cours de l'évolution, ces organismes se sont adaptés à des milieux hostiles, dont la pression osmotique est comprise entre quasiment 0 et 3000 mOsm. Chez ces espèces, certains types cellulaires (cellules à chlorure, cellules riches en mitochondries...) ou même des organes entiers (branchies, rein, glande à sel ou glande nasale, glande rectale...) se sont spécialisés dans la sécrétion ou l'absorption de sels, à des fins d'osmorégulation (Krogh, 1939). Selon les espèces d'autres organes jouent un rôle dans l'osmorégulation: l'épithélium gastro-intestinal, la peau, la vessie ou encore les glandes sudoripares.

2. Mécanismes de transport ionique impliqués

Le transport transépithélial d'une molécule est réalisé par l'activité coordonnée (*cross-talk*) d'un transport actif situé sur une membrane et d'un transport passif localisé sur la membrane opposée. Le sel le plus couramment transporté au niveau des épithélia est le chlorure de sodium, dû à l'abondance physiologique de ces deux espèces ioniques. De nombreuses études ont été réalisées pour caractériser les mécanismes de transport engagés. Il s'est avéré que les mécanismes mis en œuvre varient avec les structures et les espèces. Parmi les transporteurs

sollicités, on peut citer l'échangeur $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ dépendant du Na^+ , le co-transporteur $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ et le co-transporteur Na^+/Cl^- . Tous profitent d'un gradient électrochimique de Na^+ favorable, établi par la Na^+/K^+ ATPase baso-latérale.

Pour ce qui est de la sécrétion de chlorure de sodium, le modèle présenté dans la **Figure 4** (empruntée à Frizzell et al., 1979) prédomine depuis une vingtaine d'années. Dans ce modèle, le chlorure est co-transporté avec des ions sodium et potassium sur la face baso-latérale des cellules sécrétrices par le co-transporteur $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$. Les ions sodium sont recyclés par la Na^+/K^+ ATPase baso-latérale, et les ions potassium par des canaux situés sur cette même membrane. Les ions chlorure, accumulés au dessus de leur équilibre électrochimique, quittent la cellule de manière contrôlée par des canaux chlorure apicaux. L'efflux d'ions chlorure a pour effet de générer un potentiel transépithélial (face muqueuse négative par rapport à la face séreuse). L'efflux de potassium par la membrane baso-latérale contribue à ce potentiel transépithélial, qui joue le rôle de force motrice permettant la sécrétion des ions sodium par la voie paracellulaire. La sécrétion électroneutre de NaCl s'accompagne d'un mouvement d'eau par osmose.

L'importance de la sécrétion de NaCl dépend de la perméabilité au chlorure de la membrane apicale, ainsi que de la perméabilité au potassium de la membrane baso-latérale. Les canaux chlorure apicaux possèdent des caractéristiques diverses, ce qui laisse présumer que différentes entités moléculaires sont mises en jeu dans ces transports d'ions chlorure (Frizzell and Morris, 1994). Les deux conductances principales sont activées par des agonistes de la sécrétion, par l'intermédiaire de second messagers intracellulaires (AMPc et Ca^{2+}).

Conductance chlorure dépendante du l'AMPc

La première voie de conductance est activée par une phosphorylation par la protéine kinase A sous l'effet d'une augmentation de l'AMPc intracellulaire. Cette augmentation résulte de la stimulation de l'adénylate cyclase par un agoniste tel que le VIP (*vasoactif intestinal peptide*), les agonistes β -adrénergiques, les prostaglandines ou l'adénosine. L'activation de cette conductance produit une sécrétion soutenue dans le temps.

La nature moléculaire de cette conductance régulée par l'AMPc a été identifiée: il s'agit du CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) (Riordan et al., 1989; Rommens et al., 1989) (pour revue, Welsh et al., 1994; Fong and Jentsch, 1995; Gadsby et al., 1995; Foskett, 1998). Le CFTR appartient à la famille des transporteurs ABC (*ATP-binding cassette*) (**Figure 5**). Il s'organise en deux régions à six domaines potentiellement transmembranaires, deux domaines de liaison de nucléotides et un domaine régulateur. Sa conductance (6-10 pS) est indépendante du voltage et sa séquence de sélectivité est $\text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{I}^-$. Le CFTR est exprimé sur la membrane apicale de nombreuses cellules épithéliales, ainsi que sur des cellules non-épithéliales et son rôle dans la sécrétion de chlorure est clairement illustré dans la mucoviscidose (Boat et al., 1989). La mucoviscidose est la maladie monogénétique la plus fréquente (1 naissance sur 2500) dans la population caucasienne. Le défaut génétique

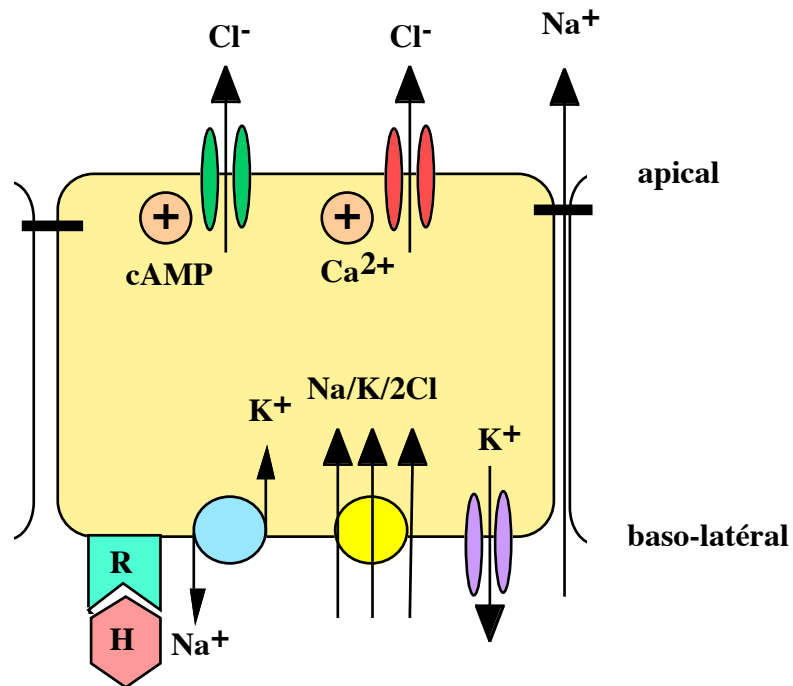


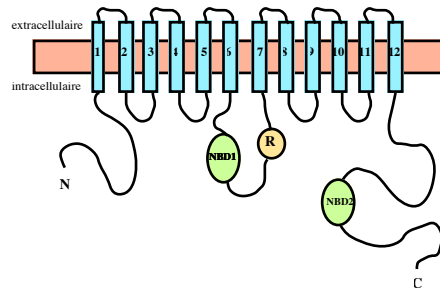
Figure 4: Modèle de la sécrétion de chlorure à travers une cellule épithéliale. La Na/K ATPase, des canaux K⁺ et le co-transporteur Na⁺/K⁺/2Cl⁻ sont présents sur la membrane baso-latérale. Sur la membrane apicale, on trouve des canaux chlorure activés par le calcium intracellulaire ou par l'AMPC intracellulaire. R représente un récepteur pour l'hormone H. Des détails sur les hormones concernées sont donnés dans le texte. Il existe une voie paracellulaire pour le Na⁺. D'après Frizzell et al., 1979.

Figure 5: Les canaux chlorure (putatifs) de la famille des transporteurs ABC.

Plusieurs protéines de cette famille ont été associées à des courants chlorure. Le rôle de canal chlorure a pu être montré pour la protéine CFTR. De plus, le CFTR jouerait le rôle de régulateur pour d'autres canaux chlorure. Les protéines MDR (*multidrug-resistance-protein*, ou p-glycoprotéine) et MRP (*multidrug-resistance-associated protein*) sont connues pour leur rôle de détoxification cellulaire. Elles ont été proposées en tant que canaux chlorure, mais actuellement on privilégie un rôle de régulateur de canaux chlorure.

Caractéristiques moléculaires / Organisation structurale

Les protéines de la famille des transporteurs ABC (*ATP binding cassette*) possèdent une masse moléculaire d'environ 170 kDa. Elles s'organisent en deux régions, possédant chacune 6 domaines transmembranaires (α hélices), deux domaines de liaison nucléotidiques (NBD1 et NBD2) et un domaine régulateur (R). Le modèle topologique proposé est représenté ci-dessous.



Caractéristiques fonctionnelles et localisation du CFTR

Pharmacologie	activé par l'AMPc
Conductance	linéaire, 6-10 pS
Sélectivité	Br ⁻ > Cl ⁻ > I ⁻
Distribution	cellules épithéliales (membrane apicale) + quelques cellules non épithéliales
Pathologie associée	mucoviscidose (<i>cystic fibrosis</i>)

Caractéristiques du courant associé à la MDR (p-glycoprotéine)

Cette conductance anionique possède certaines caractéristiques de ICl_{swell}.

Pharmacologie	tamoxifen, acide niflumique, vérapamil, nifédipine, DDFSK, quinidine
Conductance	rectification sortante
Sélectivité	I ⁻ > Br ⁻ > Cl ⁻

responsable de la maladie correspond à des mutations sur le gène codant pour le CFTR (Welsh and Smith, 1993). Il en résulte un dysfonctionnement au niveau de la sécrétion de NaCl par un manque de perméabilité au chlorure. Chez les patients atteints de mucoviscidose cela se traduit essentiellement par la production d'un mucus peu abondant et très épais au niveau des épithéliales pulmonaire et pancréatique, ainsi que par une concentration en NaCl élevée dans la sueur (McIntosh and Cutting, 1992). L'obstruction des voies aériennes et du conduit pancréatique favorise les infections, qui conduisent à la destruction des tissus responsable d'une diminution importante de l'espérance de vie.

Conductance chlorure dépendante du Ca^{2+} intracellulaire

La seconde voie de conductance apicale des cellules épithéliales est activée par une augmentation de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} . Cette voie de signalisation est déclenchée par d'autres agonistes de la sécrétion tels que l'histamine, les agonistes muscariniques, la neurotensine ou la bradykinine. La sécrétion résultant de ce type de stimulation est transitoire. Cette conductance se caractérise par ses profils d'activation et d'inactivation avec le temps (dépendants du voltage), sa sélectivité anionique de type $I^- > Br^- > Cl^- > F^-$, sa conductance unitaire d'environ 15 pS (indépendante du voltage) et sa sensibilité au DIDS.

Récemment une nouvelle famille de gènes codant pour des canaux chlorure activés par le calcium a été identifiée (**Figure 6**). Cinq membres ont été isolés à partir de cellules endothéliales ou de cellules épithéliales de mammifère: Lu-ECAM-1 (Elble et al., 1997), bCLCA1 (Cunningham et al., 1995), mCLCA1 (Gandhi et al., 1998), hCLCA1 (Gruber et al., 1998a) et hCLCA2 (Gruber et al., 1999). Les analyses biochimiques réalisées sur ces protéines ont montré que leur synthèse passe par l'intermédiaire d'un précurseur d'environ 130 kDa qui est clivé en deux polypeptides. Selon les protéines, le fragment N-terminal a une masse de 86-90 kDa et le fragment C-terminal de 32-41 kDa. Les fragments sont abondamment glycosylés et possèdent des sites potentiels de phosphorylation. Leur topologie n'est pas encore clairement définie, mais une structure en cinq domaines transmembranaires a été suggérée (Gruber et al., 1999). Trois domaines transmembranaires seraient présents dans le fragment N-terminal et deux dans le fragment C-terminal. L'expression fonctionnelle de ces protéines dans des systèmes hétérologues a donné lieu à une conductance chlorure activée par le calcium. Cette conductance se caractérise également par sa sensibilité aux inhibiteurs de canaux chlorure DIDS, acide niflumique et tamoxifen. Les courants possèdent une rectification sortante, une sélectivité $I^- > Cl^-$ et une conductance unitaire d'environ 21 pS (Cunningham et al., 1995). Ces caractéristiques sont similaires à celles déterminées pour la conductance chlorure activée par le calcium de cellules épithéliales de la trachée (Ran et al., 1992; Fuller et al., 1994). L'étude présentée par Ji et al. (1998) montre que le fragment N-terminal seul est capable d'induire la conductance au chlorure. Les protéines de cette famille possèdent également un rôle dans l'adhésion cellulaire comme le montrent les travaux de Elble et al. (1997) réalisés sur Lu-ECAM-1, mais le lien entre cette

fonction et l'activité canal de ces protéines n'est pas encore compris. La distribution tissulaire de ces canaux chlorure activés par le calcium peut être large ou bien limitée à un tissu particulier. L'expression de Lu-ECAM-1 se limite aux endothéliaux vasculaires (Elble et al., 1997), celle de bCLCA1 à la trachée (Cunningham et al., 1995) et celle de hCLCA1 à l'épithélium intestinal (Gruber et al., 1998a). Par contre, l'analyse par Northern blot a montré la présence d'ARNm de hCLCA2 dans le poumon, la trachée et les glandes mammaires (Gruber et al., 1999) et une étude immunohistochimique a montré la présence de la protéine mCLCA1 (également appelé mCa-CC) au niveau de différents épithéliaux sécréteurs, tels que le poumon, l'intestin, le rein et la glande mammaire (Gruber et al., 1998b). Les rôles physiologiques, en particulier l'implication dans la sécrétion de chlorure, des différents membres de cette nouvelle famille de canaux restent à être déterminés.

Conductance chlorure à rectification sortante

Une autre conductance chlorure, appelée ORCC (*outwardly rectified chloride conductance*), a été décrite au niveau de la membrane apicale de cellules épithéliales. C'est une conductance de 40 pS, présentant une sélectivité anionique de type $I^- > Br^- > Cl^- > F^-$, une rectification sortante et une sensibilité à de nombreux inhibiteurs (NPPB, IAA-94, DIDS) (Halm et Frizzell, 1992). Le rôle physiologique et la nature moléculaire de cette conductance ne sont pas encore déterminés.

3. Canaux chlorure impliqués dans la sécrétion gastrique

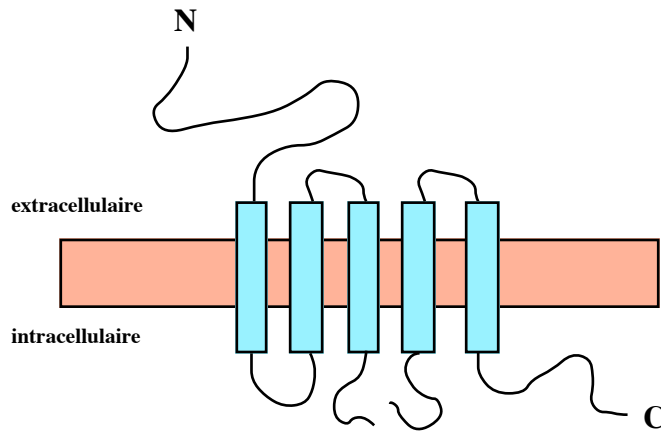
La sécrétion gastrique est une sécrétion d'un sel de chlorure particulier: le chlorure d'hydrogène (HCl). La muqueuse gastrique produit de grands volumes de suc gastrique dont la concentration en HCl peut atteindre 160 mM, soit un pH de 0,8. Cette concentration extrême des ions chlorure et des protons dans le suc gastrique est réalisée par les cellules pariétales de l'estomac, grâce à l'activité coordonnée d'une ATPase protonique (H^+/K^+ ATPase), d'un canal potassium et d'un canal chlorure. Des études électrophysiologiques ont montré que la conductance aux ions chlorure se caractérise par son activité à faible pH extracellulaire et sa sensibilité à la protéine kinase A (Reenstra and Forte, 1990; Saccomani et al., 1991; Cuppoletti et al., 1993). Un clonage par homologie a permis d'isoler un membre de la famille des ClC à partir d'une banque d'ADNc gastrique (Malinowska et al., 1995). Étant donné son homologie avec le ClC-2 (voir détails plus loin et **Figure 3**), le nouveau canal est appelé ClC-2G (G pour gastrique). L'expression fonctionnelle de ce clone dans l'ovocyte de xénope induit une conductance au chlorure, dont les propriétés correspondent à celles du canal chlorure gastrique et qui diffèrent de celles du canal ClC-2. Les auteurs de cette étude suggèrent que le ClC-2G est le canal impliqué dans la sécrétion d'acide chlorhydrique et qu'il s'agit probablement d'une variante de ClC-2 obtenue par épissage alternatif (Malinowska et al., 1995). Par la suite, l'hypothèse de l'épissage alternatif s'est révélée exacte (Chu et al., 1996, Chu and Zeitlin, 1997):

Figure 6: Les canaux chlorure activés par le Ca²⁺: la famille des CLCA.

Cinq membres de cette famille ont été clonés: Lu-ECAM-1, bCLCA1, mCLCA1, hCLCA1 et hCLCA2. L'expression fonctionnelle de ces protéines dans des systèmes hétérologues a donné lieu à des conductances anioniques activées par les ions calcium. Un rôle dans l'adhésion cellulaire a également été montré pour la protéine Lu-ECAM.

Caractéristiques moléculaires / Organisation structurale

La synthèse protéique se fait à partir d'un précurseur de 130 kDa qui est clivé en deux polypeptides. Le polypeptide N-terminal d'environ 86-90 kDa possède 3 domaines hydrophobes qui s'organiseraient en hélice α pour traverser la membrane. Le polypeptide C-terminal de 32-41 kDa franchirait deux fois la membrane cellulaire. Le modèle topologique proposé est représenté ci-dessous.



Caractéristiques fonctionnelles et distribution

La conductance anionique est activée par une augmentation du calcium libre intracellulaire.

Pharmacologie	DIDS, acide niflumique, tamoxifen
Conductance	environ 21 pS, rectification sortante
Sélectivité	I ⁻ > Cl ⁻
Distribution	cellules épithéliales et endothéliales

dans la variante CIC-2G, un fragment de la partie C-terminale a été supprimé. Cependant, les caractéristiques électro-physiologiques de la variante CIC-2G et l'hypothèse de son implication dans l'acidification stomacale ont été controversées par Jordt et Jentsch (voir Jentsch et al., 1999). Dans leur mains, l'expression fonctionnelle de la variante CIC-2G donne lieu à des courants similaires à ceux induits par la protéine complète.

4. Canaux chlorure impliqués dans la fonction rénale

Le tubule rénal est segmenté en plusieurs parties morphologiquement et fonctionnellement distinctes (**Figure 7**). Au niveau du tubule proximal, on assiste à une réabsorption massive d'un grand nombre de solutés, tels que le glucose, les acides aminés, les phosphates, les bicarbonates et les ions sodium, potassium et chlorure. Cette réabsorption n'est pas très sélective et il existe une voie paracellulaire non négligeable pour les ions sodium et chlorure (Frömter and Diamond, 1972; Stoner et al., 1974; Hanley and Kokko, 1978). A ce stade, plus de la moitié des ions chlorure filtrés ont déjà été réabsorbés. L'anse de Henle est responsable de la concentration de l'urine. Au cours de ce processus, près de 25% des ions chlorure filtrés sont réabsorbés, en parallèle avec les ions sodium. Enfin, au niveau distal, seulement 5% du chlorure filtré est réabsorbé, mais de manière finement régulé par des hormones en fonction des besoins de l'équilibre hydrominéral de l'organisme. Ainsi, la quasi-totalité du Cl⁻ filtré au niveau du glomérule est réabsorbé (environ 18 moles de Cl⁻ par jour chez l'homme) et seulement 1% est excrété. Les mécanismes de transport de chlorure diffèrent selon les types cellulaires et les espèces. On rencontre aussi bien des transporteurs que des canaux chlorure. De nombreuses études ont porté sur la caractérisation de ces voies de transport passives et il existe plusieurs revues excellentes sur ce sujet (Reeves and Andreoli, 1992; Schwiebert et al., 1994). Parmi les canaux chlorure identifiés au niveau moléculaire, plusieurs sont exprimés dans le rein, mais la fonction n'a pu être déterminé que pour certains de ces canaux.

Mis à part le CIC-1 qui est spécifique du muscle squelettique (Steinmeyer et al., 1991), tous les membres de la famille des CIC clonés à partir de mammifères sont exprimés dans le rein (pour revue, Sasaki et al., 1994; Uchida et al., 1996). Les rôles physiologiques de la plupart de ces canaux sont encore inconnus.

Deux membres de la famille des CIC hautement homologues (90% d'identité) et spécifiquement exprimés dans le rein ont été clonés chez le rat: le CIC-K1 et le CIC-K2 (Uchida et al., 1993; Adachi et al., 1994), chez l'homme: le CIC-Ka et le CIC-Kb (Kieferle et al., 1994) et le lapin: le rbCIC-Ka et le rbCIC-Kb (Zimniak et al., 1995) (**Figure 3**). L'homologie de séquence entre les deux clones d'une même espèce est plus importante que la conservation des séquences au cours de l'évolution. Initialement, il n'a donc pas été possible de définir la correspondance des clones entre les espèces. Par la suite, il est apparu que le CIC-K1 correspondrait fonctionnellement au CIC-Ka. Des études d'immunohistochimie, utilisant

différents anticorps, ont permis de localiser le ClC-K1 dans la partie médullaire ascendante de la anse de Henle (MTAL). Uchida et al. (1995) décrivent une localisation dans les membranes apicales et baso-latérales, tandis que dans les études réalisées par Vandewalle et al. (1997) et par Winters et al. (1997), le ClC-K1 et le rbClC-Ka ne sont détectés que sur les membranes baso-latérales. Quoi qu'il en soit, fonctionnellement, cette partie du tubule rénal est la partie la plus perméable aux ions chlorure. Cette perméabilité élevée joue un rôle dans le mécanisme de concentration de l'urine. Afin d'examiner le rôle fonctionnel du ClC-K1 au niveau de la portion large de la branche ascendante de l'anse de Henle, en particulier son implication éventuelle dans l'élaboration de l'urine hyper-osmotique, plusieurs études ont été réalisées. L'expression fonctionnelle du ClC-K1 a échoué dans différents groupes (Kieferle et al., 1994; Zimniak et al., 1996). Par contre, Uchida et al. (1993 et 1995) rapportent l'expression et la caractérisation fonctionnelle du ClC-K1 dans l'ovocyte de xénope. Globalement, les caractéristiques observées correspondent à celles du courant chlorure de la membrane baso-latérale des cellules de la partie ascendante de l'anse de Henle. Parmi les similitudes, on peut citer la sélectivité anionique ($\text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{I}^-$), l'inhibition par un pH extracellulaire acide, la dépendance vis-à-vis du calcium et la pharmacologie. Aussi, des anticorps fonctionnels ont été développés contre le rbClC-K1. Ces anticorps ont pu inhiber l'activité de canaux chlorure baso-latéraux de la partie MTAL reconstitués dans des bicouches lipidiques ou bien dans des segments MTAL intacts (Winters et al., 1997). De plus, il a été montré que chez le rat déshydraté l'expression du ClC-K1 est augmenté (Uchida et al., 1993; Vandewalle et al., 1997). Ces résultats et la mise en évidence du diabète insipide néphrogénique (*diabetes insipidus*) chez des souris transgéniques déficientes en ClC-K1 (souris *knock-out*) récemment développées (Matsumura et al., 1999) ont permis de conclure sur le rôle fonctionnel du ClC-K1 dans le rein. Il s'agit bien du canal chlorure baso-latéral dans la partie médullaire ascendante de l'anse de Henle indispensable à la réabsorption de chlorure, participant à la concentration de l'urine.

Le rôle fonctionnel du ClC-K2 (**Figure 3**) a également fait l'objet d'un certain nombre d'études. L'expression du ClC-K2 est moins restreinte que celle du ClC-K1. Il est exprimé au niveau cortical, en particulier dans l'anse ascendante de Henle (CTAL) et dans les tubules distal, connecteur et collecteur (Adachi et al., 1994; Takeuchi et al., 1995; Vandewalle et al., 1997; Yoshikawa et al., 1999). Des mutations sur le gène codant pour le ClC-Kb (homologue humain du ClC-K2) ont été identifiées chez des patients présentant le syndrome de Bratter (Simon et al., 1997). Les syndromes de Bratter et de Gittelman sont des pathologies rénales héréditaires, qui ne sont pas monogénétiques dans la mesure où les mutations responsables des syndromes affectent les gènes codant pour différentes protéines de transport (Rodriguez-Soriano, 1998; Karolyi et al., 1998). A côté du ClC-Kb, les protéines de transport qui peuvent être mutées dans ces syndromes sont le transporteur $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$, le co-transporteur Na^+/Cl^- et le canal potassium ROMK. Symptomatiquement, ces pathologies se caractérisent au niveau rénal par une perte massive de sels. Actuellement, on suppose que le ClC-Kb est impliqué dans la réabsorption de

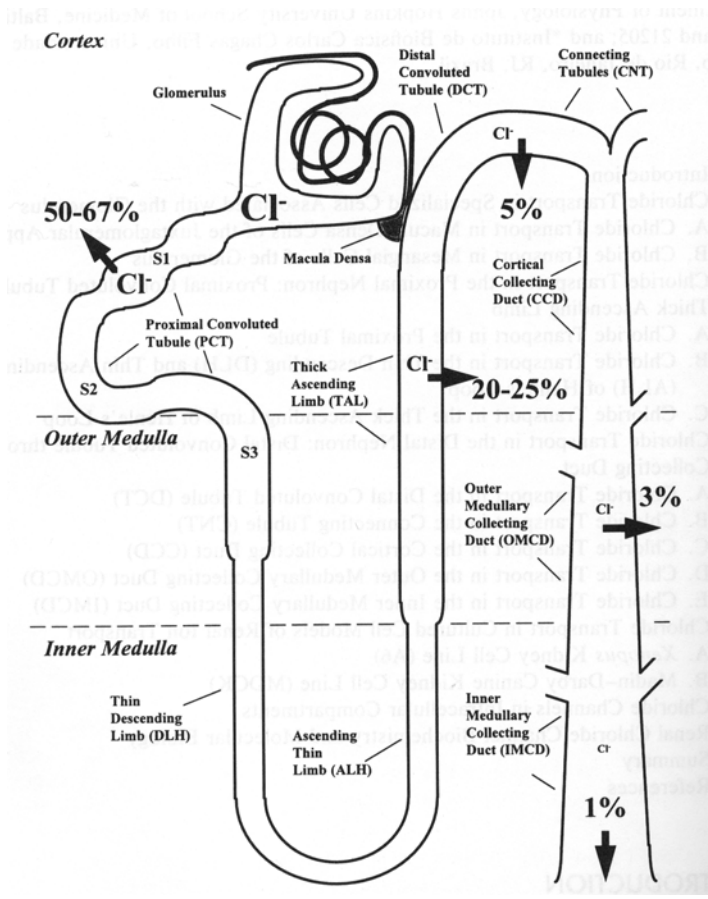


Figure 7: Illustration de la réabsorption des ions chlorure dans les différents segments du néphron. D'après Schwiebert et al., 1994.

chlorure, essentiellement au niveau CTAL et tubule distal (Jentsch et al., 1999), mais il n'y a pas encore de données électrophysiologiques disponibles qui appuieraient cette hypothèse.

Un autre canal chlorure identifié au niveau moléculaire qui est exprimé dans le rein est le CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) (**Figure 5**). Le CFTR est un canal chlorure exprimé dans les cellules épithéliales ainsi que dans certaines cellules non-épithéliales (pour revue, Welsh et al., 1994). On a pu montrer que le CFTR est adressé à la membrane apicale des cellules épithéliales et qu'il est impliqué dans divers processus de sécrétion de chlorure. Le dysfonctionnement du CFTR, pour des raisons génétiques, est à l'origine de la mucoviscidose (*cystic fibrosis*) (pour revue, Welsh and Smith, 1993). Dans cette pathologie, la sécrétion de chlorure est défailante au niveau des épithélia sécréteurs, ce qui se traduit par une multitude de symptômes (pour revue, McIntosh and Cutting, 1992). Curieusement, aucun dysfonctionnement rénal n'a été observé chez les personnes atteintes de mucoviscidose. Pour le moment, le rôle physiologique du CFTR dans le rein n'a pas encore été élucidé.

III- Régulation du volume cellulaire

1. Origine des variations de volume

Dans des conditions iso-osmotiques, la présence d'un excès de macromolécules imperméables et chargées dans le cytoplasme des cellules, par rapport au fluide extracellulaire, se traduit par une force osmotique qui s'applique sur la membrane plasmique. De plus, selon l'équilibre de Donnan, les ions diffusibles se distribuent de part et d'autre de la membrane de manière à contribuer à une pression osmotique favorable au gonflement cellulaire. Pour contrebalancer l'effet osmotique lié à la présence des macromolécules et à l'équilibre de Donnan, les cellules utilisent des mécanismes de transport ioniques pour maintenir une pression osmotique intracellulaire à l'équilibre avec celle du milieu extracellulaire. Le rôle de la Na^+/K^+ ATPase est prédominant dans cet état stationnaire dit de "pompe et fuite" (*pump and leak steady-state*) qui a été décrit il y a plus de 40 ans (Leaf, 1959; Tosteson and Hoffman, 1960).

Les cellules sont fréquemment soumises à des situations de déséquilibre de la pression osmotique intracellulaire. Le métabolisme cellulaire (protéolyse, glycolyse,...) modifie le contenu en osmolytes cytoplasmiques et perturbe le volume cellulaire. C'est le cas pendant l'activité musculaire. Un autre exemple est celui de la division cellulaire. Différentes études ont mis en évidence le rôle des conductances aux ions potassium (Dubois and Rouzaire-Dubois, 1993; Nilius and Droogmans, 1994) et chlorure (Block and Moody, 1990; Bubien et al., 1990; Voets et al. 1995) en tant que mécanismes de régulation du volume dans la mitogenèse. Dans le cas particulier des épithélia, la réalisation de transports ioniques transépithéliaux (absorptions ou sécrétions) soumet également les cellules à des variations de volume.

Alternativement, leur volume peut être perturbé sous l'effet d'une variation de la pression osmotique du milieu extracellulaire. C'est la situation normale pour les cellules épithéliales de l'intestin ou de la médulla du rein, qui sont confrontées à des milieux hypo- ou hyperosmotiques en permanence. Enfin, il existe de nombreuses situations pathologiques qui ont des incidences sur le volume cellulaire, comme par exemple l'hypo- ou l'hypermnatrémie, l'ischémie, l'hypoxie, l'acidose et le diabète (McManus et al., 1995).

2. Mécanismes de régulation du volume cellulaire

Les cellules sont capables de détecter de faibles variations de leur volume et de réguler leur volume dans une gamme physiologique étroite. Le maintien d'un volume cellulaire constant est nécessaire à leur intégrité physico-chimique et biochimique. En effet, toute variation du contenu en eau cellulaire se répercute directement sur la concentration des différents composants cytoplasmiques.

Les cellules régulent leur volume en modulant l'activité de divers mécanismes de transport membranaires ou le métabolisme de solutés osmotiquement actifs. Il en résulte la perte ou le gain d'osmolytes inorganiques et organiques. Ces mouvements d'osmolytes s'accompagnent d'un flux d'eau permettant, respectivement, la diminution du volume (*regulatory volume decrease* ou *RVD*) ou bien l'augmentation du volume (*regulatory volume increase* ou *RVI*).

Mécanismes de RVI

Les cellules luttent contre la perte d'eau par l'accumulation de sels. Les mécanismes de transport impliqués peuvent être les échangeurs Na^+/H^+ et $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (Cala, 1983) ou encore le co-transporteur $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ (Hoffman et al., 1983). Dans les cas d'hypertonie prolongée, un effet génomique peut intervenir en plusieurs heures et stimuler l'expression de transporteurs d'osmolytes organiques, ainsi que de leurs enzymes de synthèse (pour revue voir Burg, 1995). Les canaux chlorure n'interviennent pas dans ce type de régulation du volume.

Mécanismes de RVD

Généralement, les cellules font face à un gonflement en stimulant les mécanismes de transport impliquant les ions potassium et chlorure. La perte électroneutre de KCl entraîne une sortie d'eau, ce qui a pour effet de rétablir le volume cellulaire. L'utilisation de ces espèces ioniques se justifie par l'existence de gradients électrochimiques favorables et donc par un faible coût énergétique.

Les mécanismes de transport impliqués varient avec les types cellulaires (**Figure 8**). La plupart des structures épithéliales activent des canaux Cl^- et K^+ sensibles au volume (pour revue, voir Nilius et al., 1996, Okada, 1997). Dans le globule rouge de différentes espèces, l'activation d'autres mécanismes de transport ont été décrits (McCarty and O'Neil, 1992). Parmi ces

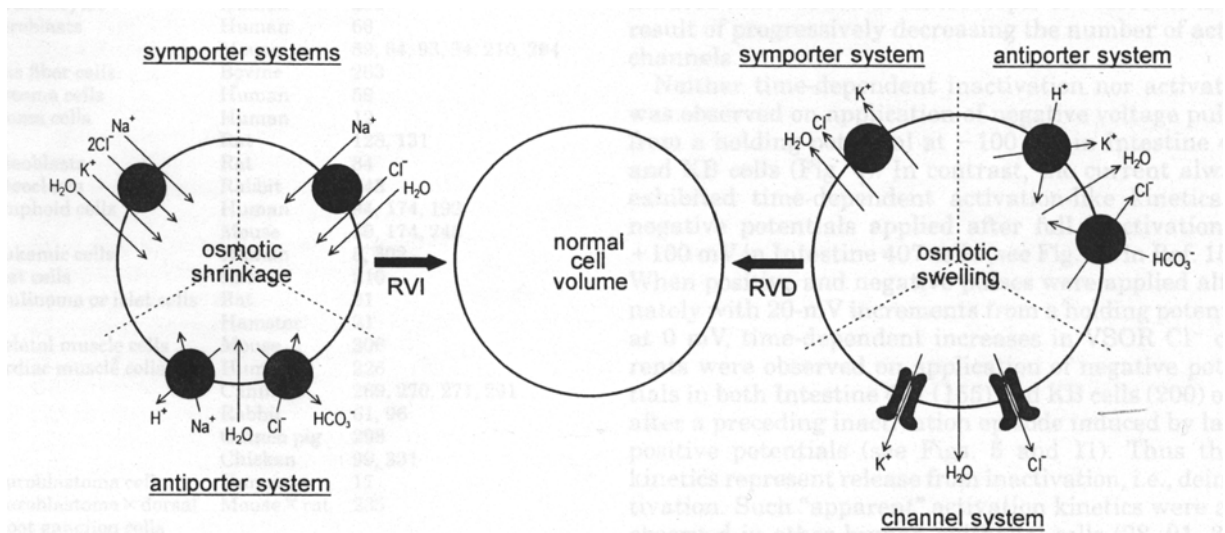


Figure 8: Les différents mécanismes de transport ionique impliqués dans la régulation du volume. A gauche: illustration des systèmes d'antiport et de symport utilisés par différents types cellulaires pour accomplir le RVI (*regulatory volume increase*) à la suite d'une diminution du volume cellulaire. A droite: illustration des systèmes de symport et d'antiport, et des canaux chlorure utilisés dans le RVD (*regulatory volume decrease*) à la suite d'un gonflement cellulaire. D'après Okada, 1997.

mécanismes, on trouve le co-transporteur K^+/Cl^- (Lauf, 1982; Guizouarn et al., 1993) et l'échangeur K^+/H^+ couplé à l'échangeur Cl^-/HCO_3^- (Cala, 1980 et 1983). Aussi, une diminution de l'activité du co-transporteur $Na^+/K^+/2Cl^-$ peut intervenir (Clemo et al., 1992), ainsi qu'une perte d'osmolytes organiques (voir par exemple, Uchida et al., 1991; Jackson and Strange, 1993 et 1995; Burg, 1995). En effet, les cellules accumulent divers osmolytes organiques dans leur cytoplasme, à des concentrations qui peuvent atteindre 10-100 mM. Ces solutés peuvent être des polyols (sorbitol, myo-inositol), des méthylamines (bétaine, glycerophosphocholine) ou bien des acides aminés ou leur dérivés (taurine, alanine, proline).

3. Caractéristiques du courant chlorure sensible au volume: $I_{Cl\ swell}$ ou $I_{Cl\ vol}$

La caractérisation du courant chlorure sensible au volume cellulaire, $I_{Cl\ swell}$ ou $I_{Cl\ vol}$, a été l'objet d'un grand nombre d'études. Plusieurs articles de révision récapitulent de manière très complète et détaillée ces caractéristiques que je résumerai dans ce paragraphe (Strange et al., 1996; Nilius et al., 1996; Okada, 1997).

L'utilisation de protocoles de voltage-clamp a montré que le courant chlorure sensible au volume possède une rectification sortante. Les canaux correspondants seraient donc de type "outward rectifier". De plus, les courants s'inactivent avec le temps lorsqu'on applique des voltages positifs, autrement dit lorsqu'on dépolarise la cellule. Les conductances unitaires mesurées sont intermédiaires, avec des valeurs comprises entre 10 et 100 pS, et la sélectivité anionique est de type $I^- > Cl^-$. L'activation du courant nécessite la présence d'ATP intracellulaire, alors que l'ATP extracellulaire agit comme un inhibiteur du courant. Le courant apparaît insensible aux messagers intracellulaires AMPc et calcium libre, qui ne semblent pas être impliqués directement dans la régulation de l'activité des canaux correspondants. Parmi les inhibiteurs classiques des canaux chlorure, plusieurs ont un effet inhibiteur sur le courant: SITS, DIDS, NPPB, DPC, 9-AC, acide niflumique et acide flufénamique. Plusieurs substances pharmacologiques (tamoxifen, vérapamil, nifédipine, DDFSK, quinidine) se sont révélées capables d'inhiber le courant associé à la p-glycoprotéine. Ces agents ont des effets variables sur le courant chlorure sensible au volume. Seul le tamoxifen inhibe ce courant dans la majorité des cellules. Les autres substances ont des effets variables en fonction du type cellulaire et du moment de l'application.

Cependant, selon les types cellulaires étudiés, une hétérogénéité dans les caractéristiques électrophysiologiques et pharmacologiques des courants a été observée. Cette hétérogénéité peut également être présente à l'intérieur d'un même type cellulaire (Banderali and Ehrenfeld, 1996). Les voies de signalisation impliquées dans la régulation des canaux varient également avec le type cellulaire.

En outre, il est intéressant de noter que le canal chlorure sensible au volume constituerait également la voie de passage pour les osmolytes organiques, tels que la taurine (Kirk et al., 1992; Jackson and Strange, 1993; Sanchez Olea et al., 1993; Kirk and Kirk, 1993; Strange and

Jackson, 1995). Banderali et Roy (1992b) ont réalisé la première étude en ce sens, par la technique de patch-clamp. Ils ont pu observer des courants générés par la taurine lors de son passage dans le canal anionique. D'autres études montrent que l'efflux d'osmolytes organiques, consécutif à un gonflement cellulaire, possède des caractéristiques électrophysiologiques et pharmacologiques très proches de celles du courant chlorure sensible au volume. Ceci suggère indirectement que le gonflement cellulaire pourrait activer un mécanisme de transport unique pour les ions chlorure et les osmolytes organiques. Ce "canal" a été appelé VSOAC pour *volume-sensitive organic osmolyte anion channel* (Strange and Jackson, 1995). Pourtant, les travaux de différentes équipes suggèrent qu'il existe diverses voies de conductances pour les osmolytes organiques (Fievet et al., 1995; Stutzin et al., 1999).

4. Nature moléculaire du canal chlorure sensible au volume

Dans la mesure où le gonflement cellulaire active un courant chlorure dont les caractéristiques varient avec le type cellulaire, il est vraisemblable qu'il existe plusieurs entités moléculaires qui forment des canaux chlorure distincts. Au cours de la dernière décennie, les techniques évoluées de la biologie moléculaire ont permis l'identification d'un certain nombre de gènes, dont l'expression dans des systèmes cellulaires a donné lieu à des courants chlorure sensibles aux changements d'osmolarité du milieu. L'identification du canal (ou des canaux) impliqué(s) dans la régulation du volume est extrêmement recherchée. Au cours de la dernière décennie, on a pu assister à un grand nombre de spéculations étayées par des approches expérimentales, qui ont amené à une certaine confusion non dissipée à ce jour.

4.1. pICln

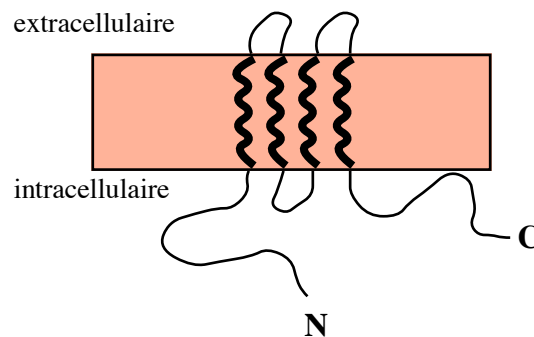
Un clonage par expression dans l'ovocyte de xénope a permis d'isoler l'ADNc du pICln (**Figure 9**), protéine de 235 acides aminés (Paulmichl et al. 1992). L'expression de cette protéine dans l'ovocyte de xénope donne lieu à un courant chlorure dont les caractéristiques sont proches de celles de $I_{Cl\ swell}$. Ce courant perd sa sensibilité aux nucléotides extracellulaires lorsque le site potentiel de liaison aux nucléotides est muté. Cette mutation altère également sa dépendance du voltage et lui confère une sensibilité au Ca^{2+} externe. Comme le profil hydrophatique de la protéine ne montre aucun motif structural en hélice alpha, mais quatre feuillets β antiparallèles, Paulmichl et al. (1992) proposent que la protéine clonée forme un canal chlorure sous la forme d'un dimère, dans lequel la mise en commun des quatre feuillets β de chaque monomère permettrait la formation du pore du canal. L'hypothèse selon laquelle le pICln forme un canal chlorure, en particulier le canal activé lors d'un gonflement cellulaire, est étayée par l'observation de Gschwenter et al. (1995), qui empêchent l'activation du $I_{Cl\ swell}$ par l'introduction d'oligonucléotides anti-pICln. Cette hypothèse est controversée par Krapivinsky et al. (1994), qui inhibent le courant $I_{Cl\ swell}$ par des anticorps anti-pICln, mais immunolocalisent le pICln dans

Figure 9: La protéine pICln: canal chlorure ou régulateur?

Cette protéine a été clonée par expression dans l'ovocyte de xénope pour sa capacité à induire une conductance anionique sensible au volume et inhibé par les nucléotides extracellulaires. Elle a été proposée en tant que canal chlorure responsable de $I_{Cl\text{ swell}}$, ce qui a été largement controversé par la suite.

Caractéristiques moléculaires / Organisation structurale

La protéine possède 235 acides aminés et s'organiserait en quatre feuillets β qui lui permettraient de franchir la membrane cellulaire. La protéine s'associerait en homodimères, mettant en commun huit feuillets β , pour constituer un canal fonctionnel. Le modèle topologique proposé est représenté ci-dessous.



Caractéristiques fonctionnelles et distribution

Pharmacologie	nucléotides extracellulaires
Conductance	rectification sortante
Sélectivité	I ⁻ > Cl ⁻
Distribution	ubiquitaire

le cytosol, associée à l'actine. Ces auteurs suggèrent alors que le pICln n'est pas le canal, mais le régulateur du canal responsable de $I_{Cl\ swell}$. Par la suite, l'hypothèse du "pICln régulateur" est reprise par Coca-Prados et al. (1996) alors que Strange et al. (1996) proposent un modèle compatible avec l'hypothèse du "pICln canal": le pICln serait une protéine canal ancrée sur le cytosquelette sous-membranaire. Sous l'effet d'un gonflement cellulaire, le pICln serait libéré pour venir s'insérer réversiblement dans la membrane, à la manière des porines. Plusieurs études vont dans le sens de ce modèle, montrant la transposition du pICln de la fraction cytosolique vers la fraction membranaire lors d'un choc hypo-osmotique (Laich et al., 1996; Musch et al., 1997; Goldstein et al., 1997). Mais la localisation membranaire reste controversée par des expériences d'immunofluorescence (Buyse et al., 1997; Emma et al., 1998). Finalement, l'implication du pICln dans la régulation du volume est remise en cause en se basant essentiellement sur trois arguments. D'abord, le courant induit lors de l'expression du pICln présente des caractéristiques finalement différentes de celles du $I_{Cl\ swell}$ (Voets et al., 1996). Ensuite, l'interaction du pICln avec des éléments du cytosquelette a été montré dans plusieurs études (Krapivinsky et al., 1994; Sanchez-Olea et al., 1997; Schwartz et al., 1997) et peut être le reflet d'un simple ancrage sur le cytosquelette sous-membranaire sans impliquer une insertion dans la bicouche lipidique. Enfin, la reconstitution du pICln dans des bicouches artificielles a donné lieu à des courants potassium et non pas des courants chlorure (Li et al., 1998). Actuellement, la fonction très controversée du pICln n'est toujours pas résolue (voir aussi Strange, 1998).

4.2. p-glycoprotéine et autres transporteurs ABC

La p-glycoprotéine (**Figure 5**) est codée par le gène MDR1 (*multi-drug resistance*) et appartient à la famille des transporteurs ABC (*ATP-binding cassette*). Elle possède deux régions hydrophobes présentant chacune six domaines transmembranaires par lesquels la protéine s'insère dans les membranes cellulaires. Initialement, la p-glycoprotéine était connue comme une pompe dépendante de l'ATP, qui permet aux cellules de rejeter des substances hydrophobes cytotoxiques (Gottesman and Pastan, 1993). Puis, il a été suggéré qu'elle fonctionnerait également comme un canal chlorure, car son expression hétérologue faisait apparaître un courant chlorure sensible au volume possédant les caractéristiques électrophysiologiques et pharmacologiques de $I_{Cl\ swell}$ (Valverde et al., 1992; Gill et al., 1992; Diaz et al., 1993). Au moins une dizaine d'études ont porté sur cette hypothèse, mais les résultats obtenus ne confortent pas l'idée que la p-glycoprotéine constitue le canal chlorure responsable de $I_{Cl\ swell}$ (voir par exemple: Rasola et al., 1994; De Greef et al. 1995; Tominaga et al., 1995; Morin et al., 1995). Au cours de la controverse, on attribue à la p-glycoprotéine le rôle de régulateur du canal chlorure sensible au volume (Han et al., 1994; Hardy et al., 1995), comme pour le pICln. L'implication de la p-glycoprotéine dans la régulation du volume, comme canal ou régulateur de canal, est finalement discréditée (Higgins, 1995; Wine and Luckie, 1996). Selon

Wine et Luckie (1996), l'implication de la p-glycoprotéine dans la régulation du volume serait purement incidente.

Des observations similaires ont été obtenues avec deux autres protéines de la famille des transporteurs ABC. La première protéine est la MRP, qui confère un phénotype de résistance aux substances cytotoxiques. Comme la p-glycoprotéine, elle induit un courant chlorure sensible au volume dont les caractéristiques se confondent avec celles du $I_{Cl\ swell}$ (Jirsch et al., 1993; Hainsworth et al., 1996). La deuxième protéine est le CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), dont les mutations sont liées à la mucoviscidose (Boat et al., 1989). La fonction canal chlorure a été établie pour le CFTR (Riordan et al., 1989; Rommens et al., 1989; Welsh and Smith, 1993), mais il a également été suggéré qu'il puisse réguler d'autres canaux chlorure, dont le canal chlorure sensible au volume (Kunzelman et al., 1994a et 1994b; Valverde et al., 1995; Kunzelman and Schreiber, 1999).

4.3. Phospholemman

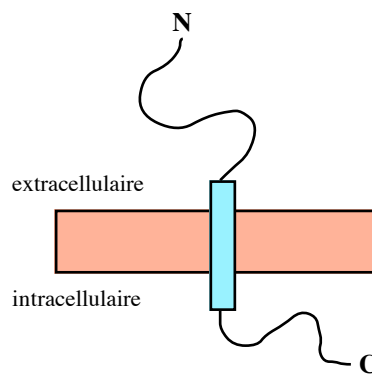
Le phospholemman (**Figure 10**) est une petite protéine de 72 acides aminés (8 kDa), qui présente un seul domaine transmembranaire. Pourtant l'expression de cette protéine dans l'ovocyte de xénope donne lieu à des courants chlorure activés par une hyperpolarisation (Moorman et al., 1992). Des mutations de la protéine se traduisent par une modification de la cinétique d'activation, ce qui incita les auteurs à conclure que le phospholemman constitue un canal chlorure. Cette conclusion a été remise en question par la découverte d'un courant chlorure activé par l'hyperpolarisation endogène à l'ovocyte (Kowdley et al., 1994). Ces auteurs proposent alors une autre interprétation selon laquelle le phospholemman jouerait le rôle du régulateur du canal endogène. La fonction canal du phospholemman fut ensuite appuyée par la reconstitution de la protéine dans des bicouches lipidiques artificielles (Moorman et al., 1995). Cette étude montre que le phospholemman induit l'apparition de courants chlorure et transporte la taurine. En parallèle, ces auteurs montrent que la perméabilité à la taurine est augmentée dans les ovocytes exprimant le phospholemman (Moorman et al., 1995). D'après ces résultats, les auteurs postulent que le phospholemman est impliqué dans le transport de taurine et pourrait, par conséquent, jouer un rôle dans la régulation du volume. Cependant, les caractéristiques du courant induit dans les bicouches artificielles diffèrent de celles observées sur l'ovocyte. De plus, la reconstitution dans des bicouches artificielles d'un certain nombre de protéines ne possédant aucune activité canal a donné lieu à des enregistrements de courants. Enfin, l'expression dans l'ovocyte d'une autre petite protéine (I_{sk}), à un domaine transmembranaire, a pu induire le même courant chlorure activé par l'hyperpolarisation que le phospholemman (Attali et al., 1993). Considérant l'ensemble de ces observations, il semble qu'il faudra réaliser d'autres expériences avant de pouvoir conclure sur la fonction "canal" ou "régulateur" de cette petite protéine.

Figure 10: La protéine phospholemman: canal chlorure ou régulateur?

L'expression fonctionnelle du phospholemman a donné lieu à une voie de conductance anionique nouvelle, activée par l'hyperpolarisation, qui transporte également la taurine. Pour cette raison, le phospholemman a été proposé en tant que canal chlorure responsable de $I_{Cl\text{ swell}}$. Cette hypothèse a été contredite par la mise en évidence d'une conductance similaire, endogène à l'ovocyte et par la découverte de la capacité d'une autre protéine (Isk) à induire la même voie de conductance.

Caractéristiques moléculaires / Organisation structurale

La protéine possède seulement 72 acides aminés (8 kDa) et possède un seul domaine potentiellement transmembranaire. Le modèle topologique proposé est présenté ci-dessous.



Caractéristiques fonctionnelles

Pharmacologie	9-AC
Conductance	rectification entrante
Sélectivité	$Cl^- > Br^- > F^-$

4.4. CIC-2

Le CIC-2 appartient à la famille des canaux chlorure dépendants du voltage, les CIC (**Figure 3**). Il possède 907 acides aminés qui s'organisent en une structure avec 10-12 domaines transmembranaires, commune aux différents membres de la famille. Le CIC-2 possède une distribution tissulaire très large et donne lieu à des courants chlorure activés par une forte hyperpolarisation, un pH extracellulaire acide ou encore par un gonflement cellulaire (Thiemann et al., 1992; Gründer et al., 1992). Sa sensibilité au volume cellulaire et son ubiquité ont appuyé l'hypothèse d'une implication dans la régulation du volume (Gründer et al., 1992). Cependant, le courant induit par le CIC-2 ne possède ni les mêmes caractéristiques électrophysiologiques (rectification entrante, sélectivité anionique: $\text{Cl}^- > \text{I}^-$), ni la même pharmacologie que le $I_{\text{Cl swell}}$ (Takeuchi and Irimajiri, 1996; Galletta et al., 1997; Bond et al., 1998). Strange et al. (1996) suggèrent un rôle dans les gonflements provoqués par une augmentation de la concentration en chlorure intracellulaire, par opposition à un gonflement en conditions hypo-osmotiques. Ces auteurs appuient leur hypothèse sur une étude réalisée par Dinudom et al. (1993) sur des cellules de la glande salivaire, qui montre un courant chlorure possédant les mêmes caractéristiques que le CIC-2 et une sensibilité au chlorure intracellulaire. Selon cette hypothèse, le CIC-2 jouerait le rôle de senseur de la concentration intracellulaire des ions chlorure. En rapport avec la sensibilité au chlorure intracellulaire, un autre rôle physiologique a été proposé: au niveau de neurones, le CIC-2 se comporterait comme un "capteur", qui régulerait la concentration intracellulaire du chlorure (Smith et al., 1995; Staley et al., 1996; Clayton et al., 1998). Enfin, le CIC-2 a été mis en cause dans la sécrétion de HCl au niveau stomacal (Malinowska et al., 1995; Sherry et al., 1997), mais cette hypothèse doit être confirmée expérimentalement. Actuellement, le rôle physiologique du CIC-2 est toujours inconnu.

4.5. CIC-3

Le CIC-3 fait parti de l'embranchement CIC-3/4/5 de la famille des CIC (**Figure 3**). Il possède 760 acides aminés et un profil d'hydropathie semblable à celui des autres CIC, laissant présumer d'une structure en 10 à 12 domaines transmembranaires (Kawasaki et al., 1994; Borsani et al., 1995). Deux équipes ont présenté des résultats d'expression fonctionnelle du CIC-3. Les courants caractérisées lors de ces études sont ressemblants au niveau de leur sélectivité anionique ($\text{I}^- > \text{Cl}^-$), leur rectification sortante et leur sensibilité aux esters de phorbol, inhibiteurs de la protéine kinase C (Kawasaki et al., 1994 et 1995; Duan et al., 1997). Comme le courant décrit par Duan et al. (1997) peut être stimulé par un choc hypo-osmotique, ces auteurs ont postulé que le CIC-3 représente le canal chlorure sensible au volume cellulaire. Le point fort de l'étude présentée par ces auteurs réside dans le fait que l'introduction d'une mutation ponctuelle dans la protéine est capable d'affecter les courants associés à son expression. Cependant, l'incapacité de différents groupes à reproduire l'expression fonctionnelle du CIC-3

ajoute à la confusion qui règne sur l'identification moléculaire du canal chlorure sensible au volume. D'autres expériences restent nécessaires afin de déterminer la fonction du ClC-3. C'est dans ce contexte que nous avons réalisée notre étude du ClC-3, dont les résultats sont exposés dans ce manuscrit.

5. Cas particulier des cellules stomatiques

Certains végétaux terrestres ont développé des structures particulières pour contrôler leurs échanges de CO₂ et de H₂O avec l'atmosphère environnante. Il s'agit de valves, appelées stomates, situées au niveau de l'épiderme extérieur des feuilles et des tiges. Au centre d'un couple de cellules stomatiques (cellules de garde), les parois cellulaires se sont spécialisées, de manière à former le pore stomatique lors de la turgescence des deux cellules adjacentes (**Figure 11**). En effet, les cellules stomatiques produisent des variations de volume volontaires pour contrôler l'ouverture du pore en fonction de leurs besoins. Ces changements de volume intentionnels sont occasionnés par des mouvements de sels de potassium, tels que le chlorure de potassium ou le malate de potassium (K₂malate). L'accumulation cytoplasmique de ces sels provoque un gonflement cellulaire et l'ouverture du pore. Inversement, la sortie de ces sels permet la diminution du volume cellulaire et la fermeture du pore.

Une conductance anionique, appelée GCAC1 (*guard cell anion channel*), a été décrite fonctionnellement sur les cellules de garde (pour revue voir Hedrich, 1994). Cette conductance est dépendante du voltage, possède une conductance unitaire de 38 pS et une sélectivité anionique de type $I^- > Cl^-$, mais sa nature moléculaire est encore inconnue. L'implication du GCAC1 dans la régulation du volume a été suggérée, mais son rôle exact reste à être défini.

IV- Régulation du pH des organelles intracellulaires

Les acidoses ou alcaloses, qu'elles soient d'origine métabolique ou respiratoire, peuvent causer des troubles au niveau cellulaire et parfois des dégâts irréversibles. En effet, la plupart des réactions biochimiques qui se produisent au sein des cellules dépendent du pH. Par exemple, l'activité catalytique de la phosphofructokinase, enzyme impliquée dans la glycolyse, varie d'un facteur 20 entre les pH 7,1 et 7,2.

Le pH intérieur des différents compartiments intracellulaires, tels que le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi, les mitochondries et les vésicules intracellulaires (endosomes, lysosomes, vésicules synaptiques ou autres vésicules de sécrétion) est régulé à une valeur déterminé (généralement plus acide que le cytoplasme), indispensable au bon fonctionnement des activités enzymatiques propres aux différents compartiments. Dans les

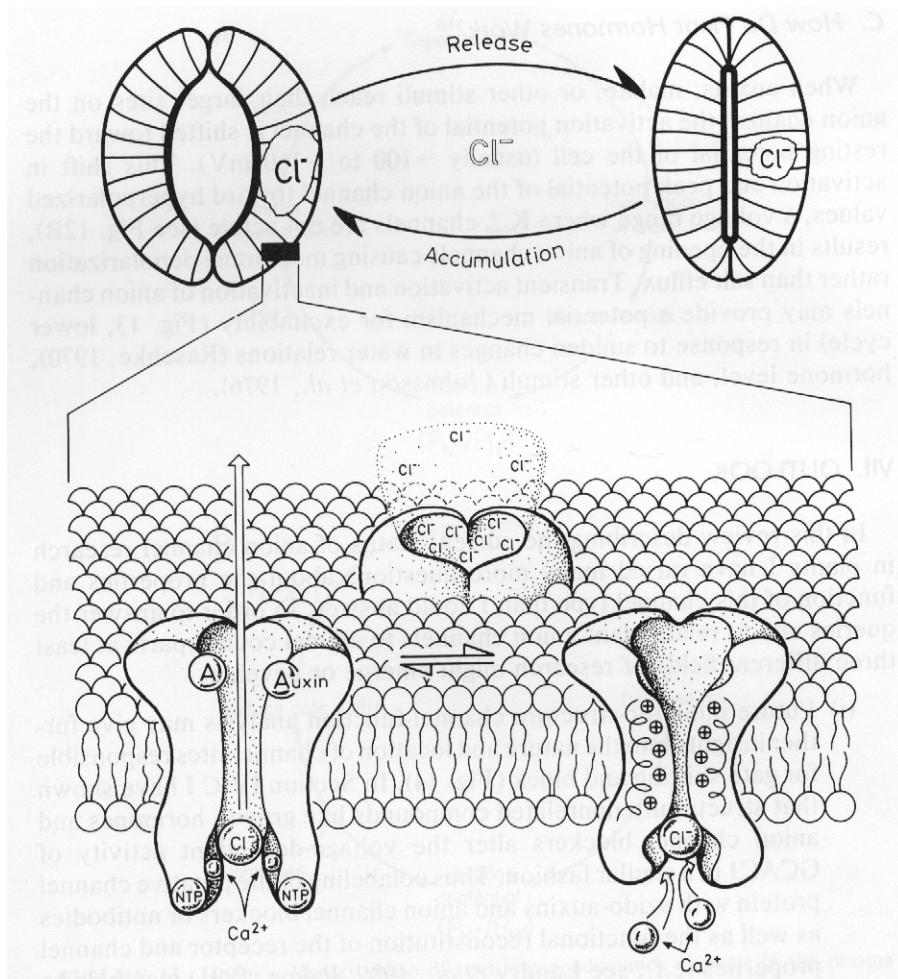


Figure 11: Représentation schématique de la régulation du canal chlorure GCAC1 par le calcium, les nucléotides et le voltage. La partie supérieure illustre un couple de cellules stomatiques et le mouvements de chlorure. La partie inférieure montre le canal GCAC1 localisé dans la bicouche lipidique. Le canal GCAC1 est supposé être un homodimère. Le canal est représenté dans l'état ouvert (à gauche) et fermé (à droite). L'ouverture du canal nécessite la liaison de calcium et de nucléotides sur des sites de liaison cytosoliques (NTP). L'ouverture du canal permet un efflux d'ions chlorure. Des sites de liaison de modulateurs tels que l'auxine ou le malate sont localisés sur la face extracellulaire de la protéine. Pour plus de clarté, le filtre de sélectivité putatif, formé par les hélices alpha chargées positivement n'a été représenté que sur le canal fermé (à droite). D'après Hedrich, 1994.

vésicules d'endocytose, la dissociation d'un ligand de son récepteur nécessite aussi un pH particulier.

De plus, certaines organelles constituent des compartiments acides tampons (β organelles). Ces compartiments modulent les transports de protons à travers leurs membranes en fonction de l'équilibre acido-basique de la cellule.

1. Mécanismes de transport impliqués au niveau des endomembranes

L'*homéostasie du pH* fait appel à divers mécanismes de transport de solutés, qui visent à maintenir le pH des divers compartiments cellulaires constant. Ces protéines de transport réalisent des mouvements de protons ou d'autres ions impliqués dans les systèmes tampons du pH (pour revue voir Rudnick, 1985). Les principaux transporteurs de la membrane plasmique impliqués dans la régulation du pH sont les différentes ATPases H^+ , l'échangeur Na^+/H^+ et les échangeurs Cl^-/HCO_3^- (Na^+ dépendant et Na^+ indépendant). Lorsqu'un compartiment intracellulaire est acidifié par une ATPase à protons (les endosomes par exemple), les mouvements de protons seront généralement accompagnés par des flux passifs d'ions chlorure, principaux anions diffusibles de la cellule (**Figure 12**). Dans un souci d'électroneutralité des compartiments, l'ion chlorure joue le rôle de contre-ion pour le proton. Il est généralement admis que certains canaux chlorure, co-localisés avec les pompes à protons, peuvent représenter le "court-circuit" électrique (*shunt*) permettant le passage électroneutre de HCl. L'activité coordonnée de ces deux protéines de transport permet à la cellule de contrôler le gradient de pH, ainsi que le potentiel de membrane de ces compartiments.

2. Nature moléculaire des canaux chlorure

Diverses conductances aux ions chlorure ont été mises en évidence sur différentes endomembranes par la technique de patch-clamp (Hilden et al., 1988; Schmid et al., 1989; Bae and Verkman, 1990). Ces auteurs décrivent des caractéristiques très divergentes au niveau des canaux unitaires, ce qui laisse supposer l'existence de plusieurs canaux chlorure intracellulaires, assurant probablement des rôles physiologiques différents (Al-Awqati, 1995). La nature moléculaire des canaux chlorure impliqués dans la régulation du pH n'est pas élucidée pour le moment. Plusieurs protéines clonées ont été proposées comme étant des canaux chlorure intracellulaires.

2.1. Les canaux chlorure de la famille VDAC

Les canaux chlorure intracellulaires les mieux connus sont ceux de la famille des VDAC (*voltage dependent anion-selective channel*) (**Figure 13**) (pour revue voir Colombini, 1994). Depuis 1975, ces protéines sont reconstituées dans des bicouches lipidiques planes (Schein et

al., 1976) et leur fonction et leur structure sont étudiées par des techniques diverses. Naturellement, ces protéines de 30-32 kDa constituent des "pores" dans la membrane extérieure des mitochondries. En effet, pour traverser la membrane mitochondriale ces protéines monomériques adoptent une structure en feuillets β à la manière des porines (Manella, 1992). Elles possèdent une conductance large (4,0 à 4,5 nS en 1M KCl), une légère dépendance du voltage et une faible préférence pour les anions par rapport aux cations. La taille du pore a été estimée par différentes techniques à 1,2-1,5 nm de diamètre ce qui permettrait le passage de métabolites de la taille de l'ATP. Le rôle physiologique des protéines VDAC n'est pas encore totalement élucidé, mais il semble qu'elles interviennent dans le métabolisme mitochondrial. A priori, elles ne jouent pas de rôle dans la régulation du pH mitochondrial, car leur activité n'est modulée par le pH que pour des valeurs supérieures à pH 10 ou inférieures à pH 4 (Bowen et al., 1985).

2.2. p64

En 1989, Landry et al. ont réalisé la purification et la reconstitution d'un canal chlorure "vacuolaire", qu'ils nomment p64 à cause de son poids moléculaire apparent de 64 kDa sur gel SDS-PAGE (**Figure 14**). Ces mêmes auteurs ont développé des anticorps fonctionnels et spécifiques de la protéine, permettant l'identification d'un clone exprimant la protéine à partir d'une banque de cortex rénal. Par RT-PCR, l'ADNc de p64 a été isolé, puis séquencé (Landry et al. 1993). Cette étude montre que p64 est formé de 437 acides aminés, ce qui lui vaut un poids moléculaire théorique de 49 kDa. Les auteurs suggèrent que la glycosylation de la protéine est responsable de la migration à 64 kDa. L'étude de sa distribution montre que c'est une protéine ubiquitaire, présentant deux localisations particulières au niveau cellulaire; p64 a été localisé au niveau périnucléaire, ainsi que dans la membrane apicale de différentes lignées cellulaires épithéliales (Landry et al., 1993; Duncan et al., 1997; Redhead et al., 1997). Le rôle physiologique de p64 n'a pas encore été déterminé. Pour une revue sur l'ensemble de ces travaux voir Al-Awqati (1994).

2.3. NCC27

En 1997, Valenzuela et al. ont isolé un nouvel ADNc, le NCC27 (**Figure 14**), codant pour une protéine de 241 acides aminés, qui partage une grande homologie de séquence avec p64. Les séquences d'acides aminés des deux protéines sont identiques à 57% et similaires à 72%. L'expression hétérologue de NCC27 dans les cellules CHO s'accompagne d'une conductance anionique accrue dans la membrane plasmique et la membrane nucléaire. La protéine possède une masse moléculaire d'environ 27 kDa et se localise au niveau de la membrane nucléaire et du nucléoplasme, ce qui lui a valu le nom de NCC27 (*nuclear chloride channel-27*). L'examen des ARNm, par Northern blot, montre que leur taille diffère dans les

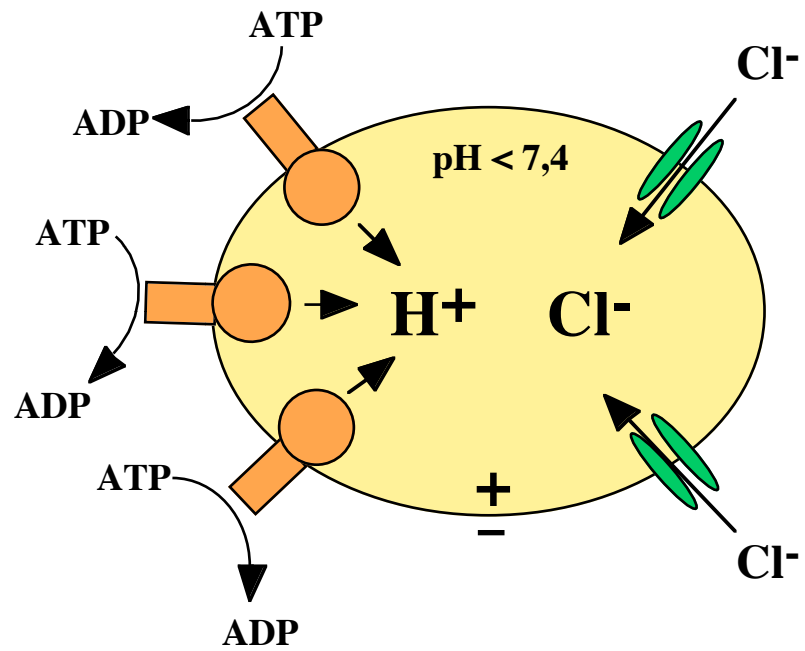


Figure 12: Modèle fonctionnel de l'acidification d'un compartiment intracellulaire. L'acidification est accomplie par les activités coordonnées d'une ATPase protonique et d'un canal chlorure.

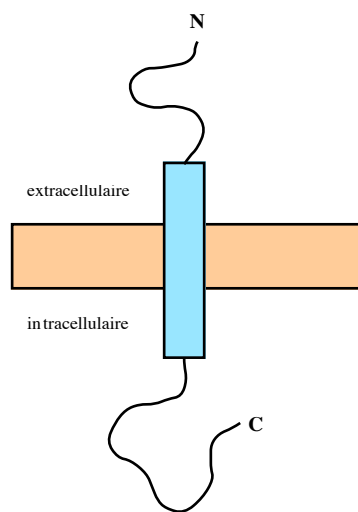
Figure 14: Les protéines p64 et NCC27: canaux chlorure intracellulaires.

La protéine p64 était le premier canal intracellulaire étudié. Avant d'être cloné, p64 était étudié sous une forme purifiée et reconstituée dans des bicouches lipidiques artificielles. Plus tard, le clonage de NCC27 a montré qu'il existe une forte homologie de ce canal chlorure de la membrane nucléaire et la protéine p64. Ces deux protéines ne seraient pas des homologues de deux espèces différentes, mais elles formeraient une nouvelle famille de canaux chlorure, probablement intracellulaires.

Caractéristiques moléculaires / Organisation structurale

p64: protéine constituée de 437 acides aminés, de masse moléculaire théorique de 49 kDa. Sa masse moléculaire apparente de 64 kDa (qui lui a valu son nom) s'expliquerait par un fort degré de glycosylation.

NCC27: protéine de 241 acides aminés et de masse moléculaire théorique et apparente de 27 kDa. La protéine ne serait pas glycosylée. Le modèle topologique proposé est représenté ci-dessous.



Caractéristiques fonctionnelles et localisation

	p64	NCC27
Pharmacologie	IAA-94	
Conductance		22-33 pS
Sélectivité		Cl ⁻ > I ⁻
Localisation	ubiquitaire, périnucléaire apical dans les cellules épithéliales	membrane nucléaire nucléoplasme

deux cas et suggère que NCC27 n'est pas l'homologue humain du p64 bovin. Par contre, les deux protéines constitueraient une nouvelle famille de gènes de canaux chlorure. Le rôle physiologique du NCC27 au niveau de la membrane nucléaire n'est pas encore élucidé.

2.4. CFTR

La protéine CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) (**Figure 5**) a été identifiée comme un canal chlorure présent à la membrane apicale des cellules épithéliales, où elle joue un rôle déterminant dans les transports transépithéliaux de chlorure (Welsh and Smith, 1993). Il est apparu que le CFTR est également présent dans l'appareil de Golgi, où il interviendrait dans l'acidification de la lumière du Golgi (Barasch et al., 1991).

2.5. Protéines de la famille des CIC

Récemment, plusieurs membres de la famille des CIC ont été proposés comme canaux intracellulaires. Les protéines en question sont le ScCIC, le NtCIC-1 et le CIC-5 (**Figure 3**). Ici, je ne développerai pas plus la question de la localisation intracellulaire de ces protéines, car cette question sera largement abordée dans les chapitres discutant des fonctions des protéines étudiées (chapitre 8. de la partie A et chapitre 4. de la partie B).

C. Présentation de la thématique et des objectifs

1. Modèle d'étude: la lignée cellulaire A6

La lignée cellulaire A6 est originaire du tubule distal de *Xenopus laevis* (Rafferty, 1969). Cultivées sur un support perméable, les cellules A6 se multiplient jusqu'à former une monocouche, puis se différencient morphologiquement et fonctionnellement en une structure épithéliale hautement polarisée (**Figure 15**). Les cellules A6 adoptent une forme cuboïdale d'environ 10 μm de hauteur et développent des jonctions serrées (*tight*) responsables de leur résistance élevée (3-10 $\text{k}\Omega/\text{cm}^2$) et de leur polarité membranaire. La membrane apicale porte un cil vibratile et peu de microvillosités.

Sur le plan fonctionnel, les cellules A6 réalisent le transport transépithélial de sodium de la face apicale vers la face baso-latérale (**Figure 16 A**). Cette absorption repose sur le modèle bien établi du fonctionnement de canaux Na^+ apicaux, sensibles à l'amiloride, qui permettent l'entrée passive du sodium dans la cellule, et de la Na^+/K^+ ATPase baso-latérale, qui rejette activement le sodium de la cellule (Koefoed-Johnsen and Ussing, 1958). Le courant de court-circuit mesuré à travers une monocouche de cellules A6, montée en chambre de Ussing, correspond donc au flux net de sodium transépithélial et est entièrement sensible à l'amiloride (Perkins and Handler, 1981). Le mouvement transépithélial de sodium s'accompagne d'un flux net de chlorure, qui s'effectue passivement, essentiellement par la voie transcellulaire du fait de la résistance élevée de la voie paracellulaire. Cette absorption de chlorure de sodium est sous régulation hormonale: la conductance sodium des membranes apicales est limitante et est stimulée par les hormones antidiurétiques (ADH, AVP, AVT), l'aldostérone et l'insuline (Lang et al., 1985; Sariban-Sohraby and Benos, 1986; Blazer-Yost et al. 1989).

La membrane apicale des cellules A6 comporte plusieurs conductances aux ions chlorure (Nelson et al., 1984; Marunaka and Eaton, 1990). Une des conductances apicales est stimulée par l'AMPc et possède une conductance unitaire de 8 pS. Ces caractéristiques sont celles du CFTR, qui a été localisé dans la membrane apicale des cellules A6 (Ling et al., 1997, Banderali et al., 1999). En absence de transport de sodium (en présence d'amiloride du côté apical), une application apicale d'adénosine, de forskoline ou d'hormone antidiurétique (ADH ou AVP), induit un courant transitoire, qui correspond à la sécrétion de chlorure induite par stimulation hormonale (Yanase and Handler, 1986; Keeler et al., 1986; Chalfant et al., 1993; Verrey, 1994; Casavola et al., 1996; Banderali et al., 1999). Cette sécrétion de chlorure passe par le fonctionnement du co-transporteur $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ baso-latéral qui est stimulé dans ces conditions et accumule le Cl^- dans la cellule, au-dessus de son équilibre électrochimique, permettant ainsi sa sortie passive lors de l'ouverture de canaux apicaux (**Figure 16 B**).

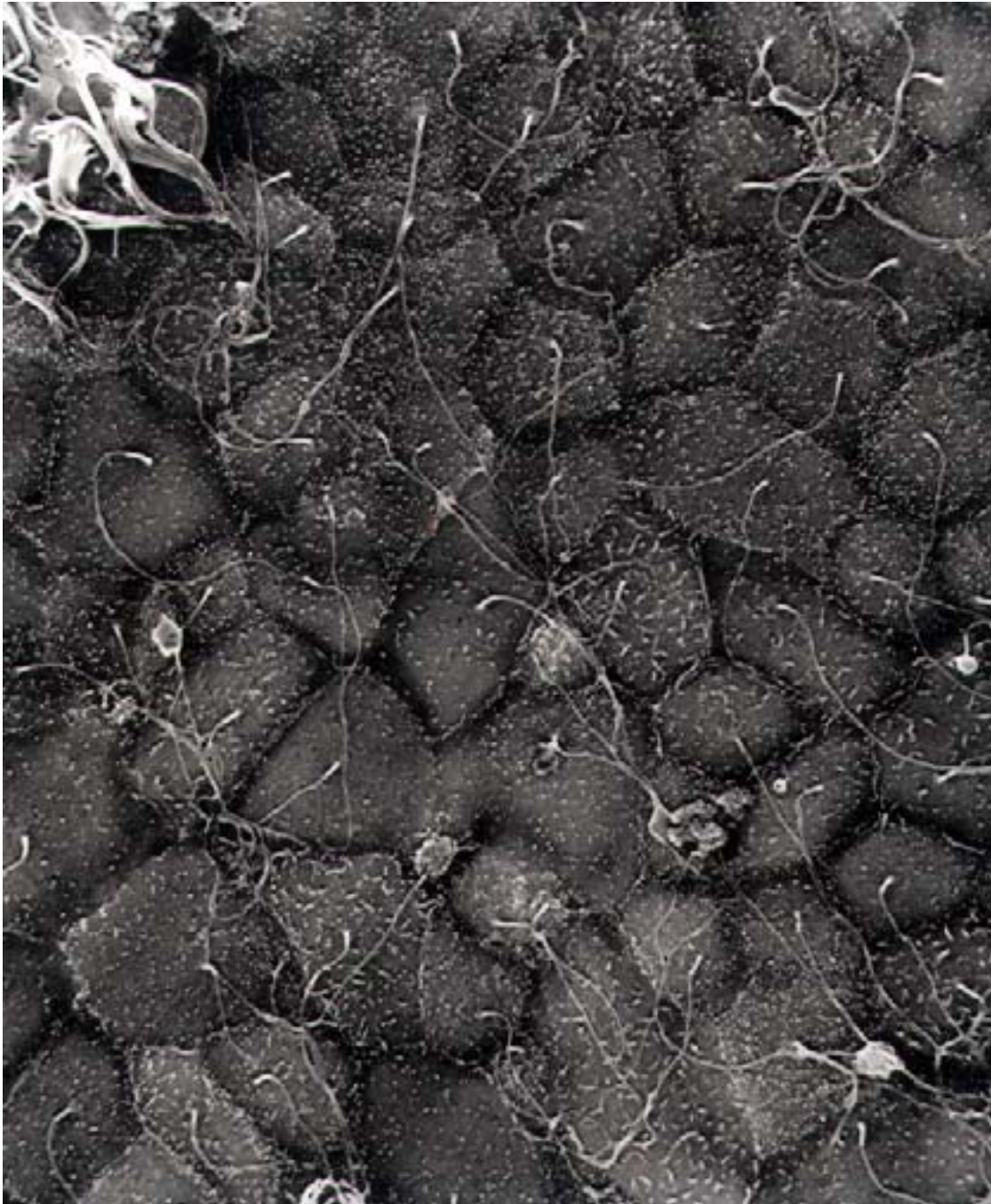
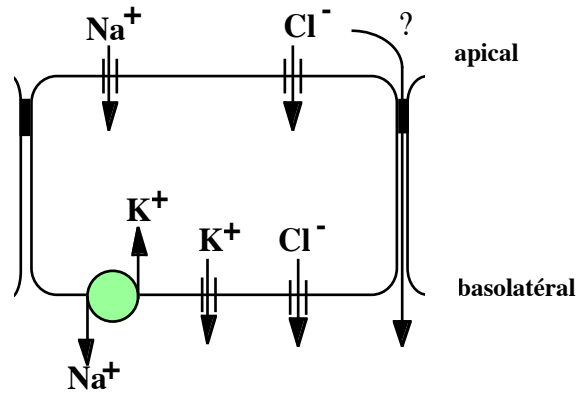
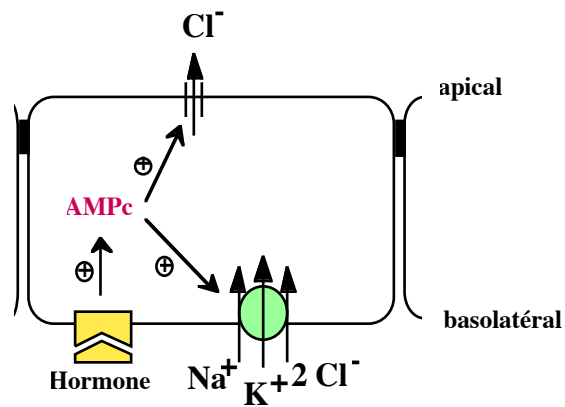


Figure 15: image en microscopie à balayage d'une monocouche de cellules A6 sur filtre. Grossissement x 3000.

A: absorption d'ions chlorure en parallèle avec le sodium



B: sécrétion d'ions chlorure sous stimulation hormonale



C: sécrétion d'ions chlorure suite à un gonflement cellulaire

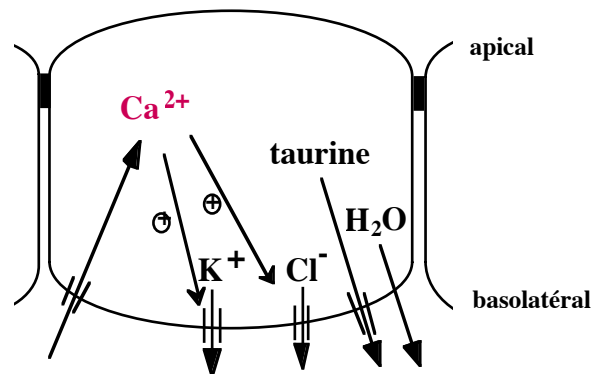


Figure 16: Principaux mécanismes de transport catalysés par la monocouche épithéliale formée par la lignée cellulaire rénale A6.

La membrane baso-latérale des cellules A6 comporte également plusieurs voies de conductance au chlorure sensibles aux variations du volume cellulaire induites par un choc hypo-osmotique (Banderali and Ehrenfeld, 1996). L'activation de conductances chlorure et potassium baso-latérales, consécutive à un gonflement cellulaire, permet aux cellules A6 d'assurer leur régulation du volume (Ehrenfeld et al., 1994; Brochiero et al., 1995; De Smet et al., 1995). En effet, l'efflux passif de Cl^- et de K^+ de la cellule entraînera un efflux d'eau par osmose et produit ainsi le retour au volume normal (**Figure 16 C**). Un efflux de taurine accompagne également les efflux de Cl^- et de K^+ (Ehrenfeld and Bogliolo, 1999).

Les caractéristiques de la régulation du volume et du transport transépithélial des cellules A6 correspondent à celles des cellules du tubule distal et des cellules principales du tubule collecteur. Le fait que les cellules A6 aient conservé la réabsorption de sodium dans les conditions normales, fait de cette lignée un modèle d'étude des fonctions du tubule distal complémentaire à la lignée cellulaire MDCK, également supposée être issue du tubule distal, mais qui a perdu les propriétés de transport transépithélial d'origine.

2. Thématique de recherche

L'équipe du Professeur Ehrenfeld s'intéresse depuis plusieurs années à la caractérisation des voies de perméabilité des membranes cellulaires et à leur régulation. Dans ce cadre, la lignée cellulaire A6 a été choisie comme modèle d'étude des fonctions de transport transépithélial et de régulation du volume. Au cours des études antérieures, des approches d'imagerie cellulaire (signaux intracellulaires), de flux isotopiques (transports membranaires et transépithéliaux), de compteur Coulter (détermination du volume cellulaire) et d'électrophysiologie (courant de court-circuit et aussi patch-clamp) ont été mises en œuvre pour participer à la caractérisation macro- et microscopique des différentes voies de perméabilité aux ions, impliquées dans les fonctions étudiées, ainsi que leur régulation hormonale. Plus récemment, les recherches menées au sein de l'équipe se sont concentrées sur la caractérisation des conductances chlorure, en particulier celles qui interviennent dans la régulation du volume. En parallèle à une étude macroscopique détaillée du courant chlorure activé par un gonflement cellulaire (Brochiero et al., 1995) et à la mise en évidence de plusieurs canaux chlorure sensibles à un choc hypo-osmotique sur la membrane baso-latérale des cellules A6 (Banderali and Ehrenfeld, 1996), l'équipe a initié une approche moléculaire, afin de déterminer la nature moléculaire du ou des canaux chlorure assurant la régulation du volume.

3. Stratégie de clonage

Le problème du choix de la stratégie de clonage de canaux chlorure de la lignée cellulaire A6 s'est rapidement posé. Un clonage par expression est généralement mis en œuvre lorsque la protéine d'intérêt possède une activité particulière, qui constitue le test fonctionnel indispensable. La réussite dépend souvent du niveau d'expression de la protéine dans le matériel biologique de départ. En effet, un fort niveau d'expression de la protéine diminue sensiblement le nombre de clones à cribler avant d'isoler un clone positif. L'avantage de ce type de clonage réside dans la connaissance de la fonction de la protéine clonée. De plus, ce type de clonage permet parfois d'aboutir à l'identification de nouvelles familles de gènes.

Alternativement, dans le cas du clonage par homologie, l'identification de l'ADN repose sur la conservation des séquences nucléotidiques. Par ce type de clonage, on peut identifier de nouveaux membres d'une famille de gènes, sans trop de contraintes de matériel biologique de départ, mais souvent la difficulté consiste à identifier la fonction de la protéine.

Au cours de mon DEA, j'ai réalisé une étude préliminaire pour tester la faisabilité d'une stratégie de clonage par expression, dans l'ovocyte de xénope, d'un canal activé par le choc hypo-osmotique à partir des cellules A6. L'expression des ARNm des cellules A6 dans l'ovocyte de xénope se traduit par une augmentation relativement faible de la conductance de la membrane plasmique. La majeure partie de cette conductance est sensible à l'amiloride ce qui montre que l'ovocyte exprime le canal sodium épithélial, sensible à l'amiloride, largement étudié sur les cellules A6 (Puoti et al., 1995). En présence d'amiloride, le choc hypo-osmotique induit une augmentation de la conductance membranaire, qui reste cependant peu élevée. Cette conductance présente une sensibilité aux inhibiteurs des canaux chlorure DIDS et NPPB. Ceci suggère que les ovocytes expriment une conductance chlorure des cellules A6, activée par le choc hypo-osmotique. Néanmoins, le faible niveau d'expression du (des) canal (canaux) chlorure dans les cellules A6 rend son (leur) étude difficile. De plus, le clonage par expression d'un canal activé par le choc hypo-osmotique est difficile du fait de l'existence de canaux chlorure endogènes présentant des caractéristiques très similaires. L'équipe a donc préféré opter pour la stratégie de clonage par homologie avec des canaux chlorure putatifs, qui avaient été clonés antérieurement.

En 1994, au début du projet d'identification moléculaire, on ne disposait d'aucune information concernant la nature moléculaire de canaux chlorure des cellules A6. A cette date, la nature moléculaire de seulement quelques canaux était connue et aucun canal n'avait pu être identifié clairement comme un canal impliqué dans la régulation du volume. Deux candidats à la régulation du volume étaient proposés: le pICln (Paulmichl et al. 1992) et le CIC-2 (Thiemann et al., 1992; Gründer et al., 1992). L'expression, dans l'ovocyte de xénope, des deux canaux chlorure putatifs avait donné lieu à des courants chlorure sensibles au choc hypo-osmotique. Dans le cas du pICln, la controverse s'alimentait du fait que le courant chlorure était déjà présent en milieu iso-osmotique, ce qui paraissait inhabituel, et son organisation structurale en quatre

feuillet β laissait planer le doute sur sa capacité à constituer un canal transmembranaire. Pour le CIC-2, la structure en 10-12 domaines potentiellement transmembranaires et les résultats de reconstitution du CIC-0 publiés par Middleton et al. (1994) étaient favorables à l'idée que le CIC-2 puisse constituer un canal chlorure. Cependant, il était difficile d'établir l'implication du CIC-2 dans la régulation du volume car les caractéristiques du courant associés à son expression (en système cellulaire hétérologue) ne correspondent pas à celles habituellement mises en évidence pour le courant sensible au volume.

La stratégie de clonage qui avait été mise en œuvre par le laboratoire (étude menée par le Dr. Sabine Lindenthal), et ce en collaboration avec le Dr. N.K. Wills (Galveston, Texas), a employé la technique de PCR (*polymerase chain reaction*) pour amplifier des séquences présentant une forte homologie avec les séquences des amorces choisies, à partir d'une banque d'ADNc obtenue par transcription reverse (RT) des ARNm des cellules A6. Les séquences dégénérées des amorces utilisées pour la PCR étaient définies d'après les régions conservées des ADNc de pICln ou de la famille des CIC. Les morceaux d'ADNc identifiés étaient ensuite clonés dans leur intégralité (*full lenght*), avec leurs parties non-codantes, par la technique de RACE-PCR (*rapid amplification of cDNA ends-PCR*), puis séquencés. Les ADNc complets de trois protéines ont ainsi pu être isolés à partir des cellules A6: le pICln et deux membres de la famille des CIC, appelés xCIC-5 et xCIC-3 (x pour *Xenopus*) du fait de leur homologie avec les CIC-5 (Fisher et al., 1994 et 1995; Steinmeyer et al., 1995; Sakamoto et al., 1996) et les CIC-3 (Kawasaki et al., 1994; Borsani et al., 1995), respectivement, clonés et publiés entre temps et dont la fonction est discutée.

4. Présentation du travail de thèse

Peu de temps après mon arrivée au laboratoire, les ADNc complets de xCIC-5 et xCIC-3 étaient obtenus. Ne disposant d'aucune information sur les fonctions cellulaires de ces protéines, nous avons défini un programme de caractérisation fonctionnelle et de localisation tissulaire et cellulaire de ces protéines, qui a constitué l'objet de mon travail de thèse.

Dans un premier temps, nous avons réalisé l'expression du xCIC-5 dans l'ovocyte de xénope. L'expression fonctionnelle de la protéine a été mise en évidence par la technique de voltage-clamp en doubles micro-électrodes et par l'utilisation d'anticorps polyclonaux. Le courant induit par l'expression de la protéine a fait l'objet d'une caractérisation électrophysiologique, visant la détermination de sa dépendance du voltage et du pH, sa sélectivité anionique, sa pharmacologie et sa sensibilité aux ions métalliques. Nous avons également examiné l'implication de diverses voies kinases dans la régulation de son activité électrique. Les anticorps dirigés contre le xCIC-5, que nous avons développés, nous ont permis d'étudier l'état de glycosylation du xCIC-5 dans l'ovocyte de xénope. Par la suite, nous avons utilisés ces anticorps pour étudier la distribution tissulaire du xCIC-5 dans différents tissus, ainsi que sa

localisation cellulaire sur la lignée cellulaire A6. La spécificité des anticorps utilisés sera largement discutée.

La deuxième partie de cette thèse est consacrée à l'étude de la protéine xCIC-3. Comme précédemment, nous avons voulu exprimer la protéine et réaliser une caractérisation électrophysiologique. Pour cela, nous avons utilisé deux systèmes d'expression cellulaires: l'ovocyte de xénope et la lignée cellulaire HEK 293. L'utilisation d'anticorps anti-xCIC-3, que nous avons développés, nous a permis de montrer la synthèse de la protéine dans les deux systèmes d'expression, mais les approches électrophysiologiques employées (doubles micro-électrodes et patch-clamp) ne nous ont pas permis de mettre en évidence une conductance nouvelle. Nous avons alors étudié la glycosylation et la distribution tissulaire de la protéine, chez le xénope et/ou la souris. Pour cela, nous avons utilisé nos anticorps anti-xCIC-3 ainsi que des anticorps polyclonaux dirigés contre une protéine de fusion contenant une partie du CIC-3 du rat.

Dans chaque partie, nos résultats sont analysés et discutés par rapport aux résultats publiés par d'autres équipes. Une attention particulière est prêtée à la discussion des modèles fonctionnels qui ont émergés pour chacune des protéines.

MATERIEL & METHODES

1. Culture cellulaire

La lignée cellulaire A6, gracieusement fournie par le Dr. Bernard Rossier (Lausanne, Suisse), est constituée de cellules adhérentes, provenant de la région distale du tubule rénal de *Xenopus laevis* (Rafferty, 1969). Cette lignée cellulaire, initialement fournie par l'"American Tissue Type Collection", avait ensuite été clonée par dilution limitante (Verrey et al., 1987). Les cellules sont cultivées entre les passages 88 et 98, à 28°C, dans une atmosphère d'air humidifiée contenant 5% de CO₂. Le "milieu amphibien" utilisé pour la culture cellulaire (Handler et al., 1979) est complété par 10% de sérum de veau fœtal (Dutcher, France) et 1% d'antibiotiques (pénicilline, streptomycine). Pour maintenir la lignée, les cellules subissent une trypsination à 0,001% de trypsine ainsi qu'une dilution au 1/7^{ème}. Pour induire une différenciation des cellules et obtenir une monocouche hautement polarisée, les cellules sontensemencées sur des filtres perméables traités au collagène (Transwell Col, pores de 0,45 µm, Costar, USA), dans le milieu amphibien complet additionné de 2% d'ultraSer-G (Gibco-IBF, USA-France). La mesure du potentiel transmembranaire et de la résistance transépithéliale constituent le test fonctionnel permettant de vérifier que la monocouche de cellules constitue un épithélium à jonctions serrées (épithélium de type "tight"). Les expériences d'immunocytochimie, ont été réalisées les cellules A6 polarisées, cultivées sur des filtres perméables qui n'ont pas été traités au collagène, mais qui sont plus rigides, ce qui facilite leur manipulation (Transwell Clear, pores de 0,45 µm, Costar, USA). En parallèle, certaines expériences ont été réalisées sur des cellules A6 cultivées sur des lamelles de verre stériles.

La lignée cellulaire HEK 293 (Human Embryonic Kidney) provient de la "European Collection of Cell Cultures". Les cellules sont cultivées en présence de EMEM (Life Technology) additionné de 10% de sérum de veau fœtal (Dutcher, France) et 1% d'antibiotiques (pénicilline, streptomycine). Elles sont placées dans une atmosphère d'air humidifiée, à 37°C, contenant 5% de CO₂. Le maintien de la lignée est assuré par trypsination (comme décrit ci-dessus) et dilution. Pour les expériences d'immunocytochimie, les cellules sont cultivées sur des lamelles de verre stériles prétraitées à la poly-L-lysine hydrobromide (Sigma), afin d'améliorer l'adhérence des cellules.

2. Constructions plasmidiques utilisées

Les ADNc des canaux chlorure xCIC-5 et xCIC-3 ont été obtenus par une stratégie de clonage par homologie, réalisée par le Dr. S. Lindenthal (membre de notre équipe) en collaboration avec le Dr. N.K. Wills (Galveston, TX, USA). A partir des ARNm des cellules A6, et en présence d'amorces oligonuléotidiques définies selon les parties conservées d'autres membres de la famille des CIC, une RT-PCR a permis d'amplifier plusieurs fragments d'ADNc

(Lindenthal et al., 1997). Par RACE-PCR, deux clones ont pu être isolés dans leur totalité et séquencés. L'analyse des homologies de séquence obtenues a conduit à les nommer xCIC-5 et xCIC-3 (x pour *Xenopus*).

Les ADNc ont été sous-clonés dans des vecteurs permettant leur transcription *in vitro*. Dans un premier temps, l'ADNc du xCIC-5 avec ses régions non codantes natives a été sous-cloné dans le vecteur pGEM-T (Promega) en aval du promoteur de la T7 polymérase. Par la suite, les ADNc des canaux xCIC-5 et xCIC-3 ont été sous-clonés dans le vecteur pSP64 (Promega), en aval du promoteur de la SP6 polymérase, entre les régions non-codantes de la β -globine de *Xenopus laevis* (Krieg et Melton, 1984; Lorenz et al., 1996) (généreusement offert par le Dr. S. King). De plus, un site consensus Kozak (Kozak, 1991) a été introduit en amont du codon initiateur ATG. Ces constructions ont été réalisées dans le but de faciliter l'expression de la protéine.

L'ADNc du xCIC-3 a également été sous-cloné dans un vecteur d'expression bicistronique pour cellules de mammifère, pIRES (Clontech). L'ADNc du xCIC-3 a été introduit dans le vecteur pIRES-CD8 (généreusement offert par le Dr. M. Fink, Sophia Antipolis Valbonne, France) en aval d'un promoteur CMV et en amont de l'ADNc de la protéine de surface CD8. Les cellules transfectées avec ce plasmide synthétisent alors la protéine CD8 et de manière implicite la protéine xCIC-3. La protéine CD8 sera exportée à la membrane cellulaire, où elle pourra être reconnue par un anticorps anti-CD8. Lorsque ces anticorps sont conjugués à des billes Dynabeads (Dynal), ils constituent un test de transfection et permettent de localiser facilement les cellules transfectées.

Le **Tableau 1** récapitule l'ensemble des constructions plasmidiques utilisées et leurs représentations schématiques sont données dans la **Figure 17**.

Vecteur	ADNc	Utilisation
pGEM-T	xCIC-5	transcription <i>in vitro</i>
pSP64	xCIC-5	transcription <i>in vitro</i>
pSP64	xCIC-3	transcription <i>in vitro</i>
pIRES-CD8	xCIC-3	transfection cellules HEK

Tableau 1: Les différentes constructions plasmidiques et leur utilisation.

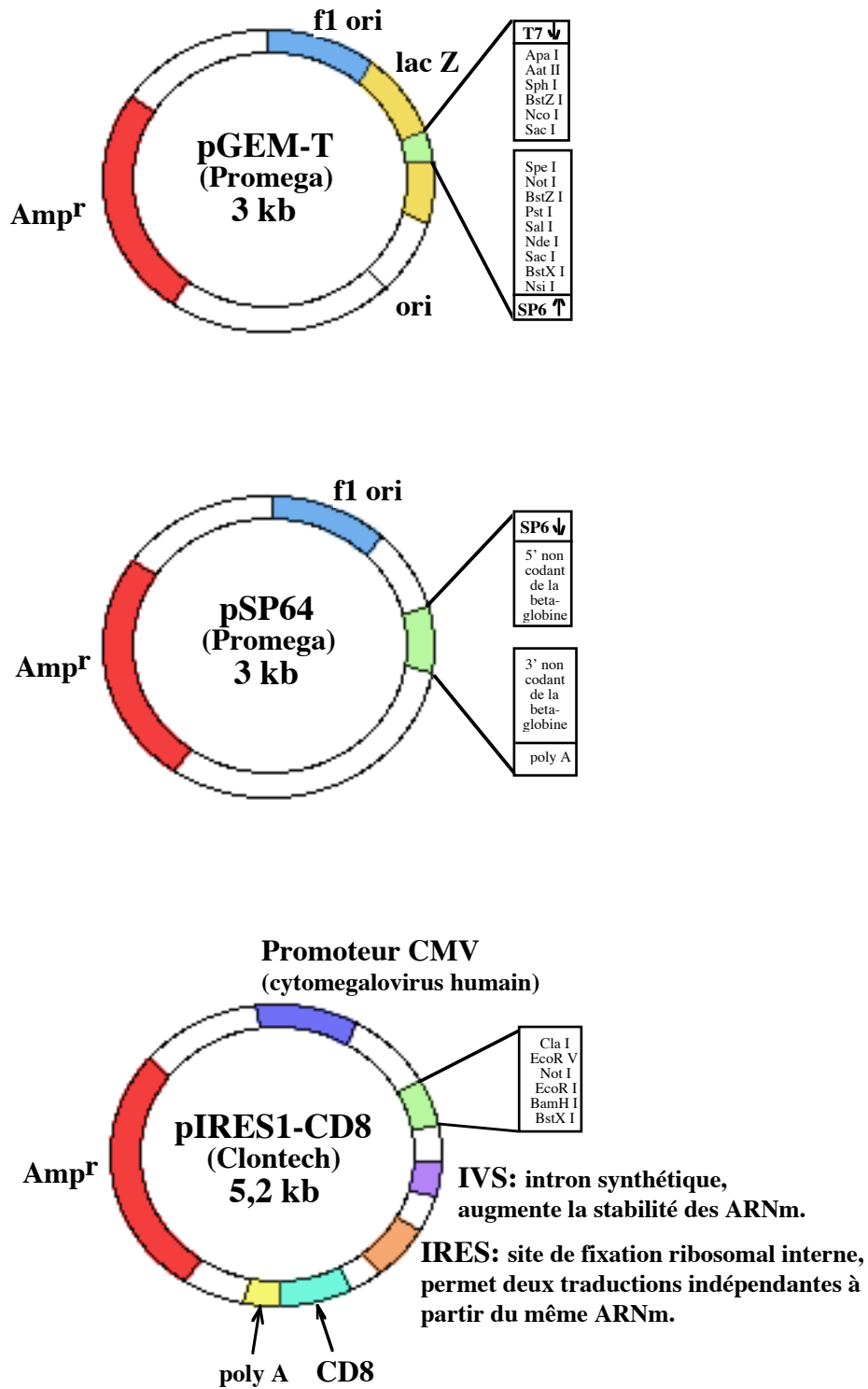


Figure 17: Représentations schématiques des différentes constructions plasmidiques utilisées.

3. Expression fonctionnelle dans l'ovocyte de xénope: l'approche électrophysiologique

L'ovocyte de xénope (*Xenopus laevis*, amphibien originaire d'Afrique du Sud) est un système cellulaire d'expression de protéines hétérologues ou homologues. Les ovocytes sont utilisés au stade mature (post-vitellogénique) également appelé stade VI de l'ovogenèse (Dumont, 1972) (**Figure 18**). A ce stade, les ovocytes mesurent 1,2 à 1,3 mm de diamètre ce qui rend leur manipulation aisée. Ce système d'expression est très répandu du fait qu'une xénope peut fournir un grand nombre d'ovocytes matures dont la conservation peut être assurée pendant une dizaine de jours par la simple présence d'antibiotiques dans le milieu. L'expression d'une protéine est induite par l'injection des ARNc de la protéine d'intérêt.

3.1. Transcription *in vitro*

La synthèse d'ARNc est réalisée à l'aide d'un kit de transcription *in vitro* (mMessage mMachine, Ambion) utilisant la polymérase T7 ou SP6, selon la construction plasmidique qui sert de matrice. Au préalable, le plasmide est linéarisé par une coupure enzymatique au niveau d'un site de restriction en aval de la séquence d'intérêt. (NsiI pour le plasmide pGEM-T et SmaI pour les constructions dans pSP64, voir **Figure 17**). Les ARNc synthétisés à l'aide du kit sont "capés": ils contiennent des nucléotides modifiés qui augmentent leur stabilité. Après purification (par précipitation au chlorure de lithium), les ARNc sont repris dans de l'eau traitée au diéthyl-pyrocarbonate (DEPC) (Sigma), puis conservés à -80°C jusqu'à l'injection. Un aliquote des ARNc néosynthétisés est visualisé sur gel dénaturant d'agarose 0,8%, formaldéhyde 1,9%, MOPS 1X (0,2 M MOPS, 50 mM acétate de sodium, 10 mM EDTA) afin d'en déterminer la concentration et la taille.

3.2. Prélèvement et traitement des ovocytes

Les xénopes adultes sont maintenues au laboratoire dans des bacs collectifs à une température ambiante de 18 à 20°C. Les lobes ovariens sont prélevés sous hypothermie et rincés par du milieu "culture" (pour la composition voir plus loin). Les ovocytes sont ensuite soumis pendant 15 heures à un traitement par la collagénase (Serva) à 1,3 unités/ml de milieu "culture", afin de digérer les fibres de collagène du tissu conjonctif et du follicule qui enveloppent les ovocytes. Les ovocytes sont finalement défolliculés par une incubation de 30 minutes dans le milieu "culture" dépourvu de calcium ce qui permet de rompre les jonctions de type "gap" entre l'ovocyte et les cellules folliculaires qui l'entourent. Une légère agitation mécanique aide à séparer les ovocytes de leur enveloppe folliculaire. Les ovocytes sont ensuite replacés dans le milieu "culture" normal, dans lequel ils seront conservés, à une température de 18°C, tout au long de l'expérience. Les ovocytes au stade VI (**Figure 18**) sont triés et prêts pour l'injection.

Les ovocytes de xénope présentent un courant anionique endogène activé suite à un choc hypo-osmotique, le $I_{Cl_{swell}}$ (Ackerman et al., 1994). Cependant ce courant n'est observé que sur des ovocytes défolliculés manuellement. Par conséquent, les ovocytes utilisés dans l'étude de ce courant endogène n'ont pas subi le traitement décrit ci-dessus. Après prélèvement du lobe ovarien, les follicules sont retirés manuellement, un à un, à l'aide de fines pinces métalliques. L'observation microscopique de ces ovocytes permet de visualiser des cellules folliculaires résiduelles à la surface des ovocytes (**Figure 19**). Ces ovocytes sont également conservés dans le milieu "culture", dans un incubateur à 18°C.

3.3. Injection des ovocytes

L'injection des ovocytes s'effectue sous la loupe binoculaire à l'aide d'une micro-pipette reliée à un injecteur à pression d'air (Inject+Matic, Genève, Suisse). Seul les ovocytes défolliculés par le traitement à la collagénase sont utilisés pour l'injection des ARNc. Les ARNc des protéines xClC-5 et xClC-3 sont injectés à des concentrations comprises entre 50 à 700 ng/ μ l, soit 2,5 à 35 ng d'ARNc par ovocyte. Les ovocytes contrôle peuvent être des ovocytes non injectés ou bien injectés avec 50 nl d'eau traitée au DEPC. Ces deux types d'ovocytes contrôle ont donné sensiblement les mêmes résultats.

3.4. Voltage-clamp en double micro-électrodes

L'analyse électrophysiologique des ovocytes permet de mettre en évidence des courants induits par l'expression de la protéine nouvellement synthétisée. L'analyse se fait généralement entre 3 et 6 jours après l'injection, lorsque la synthèse de la protéine est à son niveau maximum. La technique utilisée consiste à introduire deux micro-électrodes dans l'ovocyte afin de mesurer simultanément la différence de potentiel transmembranaire (V) et le courant correspondant (I). L'ovocyte est placé dans une chambre perfusée ce qui permet de le soumettre à des changements de milieux. Chaque micro-électrode est constituée d'un fil d'argent chloruré, introduit à l'intérieur d'une micro-pipette étirée sur un étireur horizontal DMZ-Universal Puller (Zeitz, Allemagne) et remplie de KCl 3M. La résistance des micro-électrodes est comprise entre 1-3 M Ω . Un protocole de voltages imposés (ou voltage-clamp) est appliqué à l'ovocyte à l'aide d'un amplificateur Dagan TEV-200, piloté par le logiciel pClamp6 (Axon Instruments, USA). Le protocole de voltage-clamp utilisé impose à la membrane de l'ovocyte une rampe de voltages de -100 à +80 mV par pas de 20 mV durant 800 ms chacun (voir **Figure 25**). L'enregistrement des courants correspondant à chaque voltage permet d'établir la courbe courant-voltage (I-V) reflétant la conductance de l'ovocyte dans la condition expérimentale donnée.

L'effet de diverses substances pharmacologiques sur la conductance de l'ovocyte peut être déterminé par comparaison des courbes I-V avant, pendant et après l'application de la



Figure 18: Les stades I à VI (de gauche à droite) de l'ovogenèse chez *Xenopus laevis*. Les ovocytes ont été défoliculés manuellement. La barre représente 500 μm . D'après Smith et al., 1991.

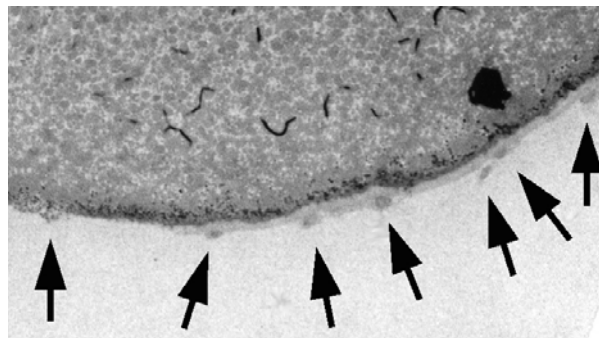


Figure 19: Photographie en microscopie optique d'une coupe d'un ovocyte de xénope défoliculé manuellement et fixé 2 heures en 2,5% de glutaraldéhyde. A la surface de l'ovocyte, on peut observer des cellules folliculaires résiduelles, qui persistent en contact avec la membrane vitelline (acellulaire) de l'ovocyte après le retrait de l'enveloppe folliculaire. Grossissement x 210. Photographie généreusement offerte par l'équipe du Prof. R. Motais, Villefranche sur mer, France.

substance à tester. Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes accompagnées de leur erreur standard (écart-type divisé par la racine carrée de n-1, n étant le nombre de valeurs moyennées) et la comparaison statistique est basée sur le test de Student.

3.5. Substances pharmacologiques

Diverses substances pharmacologiques ont été utilisées pour caractériser les courants étudiés. Un large spectre d'agents inhibiteurs de différents types de courants anioniques ont été testés. Il faut savoir que la spécificité de ces substances est assez mauvaise dans la mesure où une même molécule est capable de bloquer une variété de canaux ou transporteurs très différents. Les formules chimiques des inhibiteurs de canaux chlorure utilisés sont illustrées sur la **Figure 20**.

Liste des différents agents inhibiteurs des courants anioniques utilisés:

- * acide niflumique (Aldrich Chemical Co.)
- * 9-anthracène (9-AC) (Aldrich Chemical Co.)
- * adénosine monophosphate cyclique (cAMP, pas diffusible) (Sigma)
- * 4,4'-diisothiocyanate-2,2'-stilbène disulfate (DIDS) (Sigma)
- * acide diphénylamine-2-carboxylique (DPC) (Fluka AG)
- * gossypol (Sigma)
- * kétoconazole (Biomol Research Laboratories, USA)
- * lanthane (La^{3+}) (Sigma)
- * acide 5-nitro-2-(3-phénylpropylamino) benzoïque (NPPB) (R. Greger, Fribourg, Allemagne)
- * oxonol (DiSBAC2(3)) (Molecular Probes)
- * riluzole (Research Biochemicals International)
- * tamoxifen (Sigma)
- * vérapamil (Sigma)

Par ailleurs, des substances pharmacologiques agissant sur les voies de signalisation intracellulaire, en particulier sur diverses voies kinase, ont été utilisés:

- * forskoline (Sigma)
- * dibutyryl-cAMP (Sigma)
- * 3-isobutyl-1-méthyl-xantine (IBMX) (Sigma)
- * staurosporine (Boehringer)
- * ionomycine (Sigma)

- * génistéine (Sigma)
- * daidzein (Sigma)
- * tyrphostin 51 (TEBU)
- * geldanamycine (Life Technology)
- * acide cinnamique (Sigma)

La solution de pervanadate à 0,1 mM a été obtenue en mélangeant du sodium orthovanadate (Janssen Chimica, Belgique)   0,1 mM et du H₂O₂ (Sigma)   0,5 mM dans l'ISO 95 (voir composition au paragraphe suivant). Après avoir laissé le mélange à 28 C pendant 10 minutes, on ajoute 400  g/ml de catalase (Aldrich Chemical Co.) pour éliminer l'exc dent de H₂O₂.

Enfin, l'effet des ions Zn²⁺ a été testé en utilisant du chlorure de zinc. Le ZnCl (Sigma) a été utilisé à 500  M dans de l'ISO 95. Après addition du ZnCl dans le milieu, le pH de la solution a été réajusté à 7,4 avec une petite quantité de Trizma Base (Sigma).

3.6. Composition des milieux

Les ovocytes sont maintenus depuis le prélèvement jusqu'à l'expérimentation en milieu "culture". L'expérimentation se fait généralement dans le milieu ISO 95, sauf pour les chocs hypo-osmotiques, qui ont été réalisés en exposant les ovocytes au milieu HYPO 70. L'enregistrement contrôle est alors mesuré en milieu iso-osmotique ISO 70 qui possède la même concentration en ions chlorure que le milieu HYPO 70. On contourne ainsi les variations du courant dues à la différence de concentration des ions chlorure. Le choc hypo-osmotique est obtenu par omission de 80 mM de mannitol.

Pour tester l'effet des différentes substances pharmacologiques on utilise au choix le milieu ISO 95 ou HYPO 70, selon les conditions osmotiques de l'expérience. Ces milieux sont dépourvus d'antibiotiques, dont la présence n'est pas indispensable dans l'expérimentation.

Les séquences de sélectivité ont été établies par des substitutions ioniques, réalisées dans les milieux ISO 95 ou HYPO 70 (selon les conditions osmotiques) dans lesquels 80 mM de NaCl ont été remplacées par 80 mM du substituant (NaI, NaBr, NaNO₃ ou Na gluconate).

Le **Tableau 2** indique les concentrations des composants en mM. La streptomycine sulfate est à 798 unités/mg et la pénicilline G (benzylpenicillin) est à 1730 unités/mg. La pression osmotique des solutions est vérifiée avec un osmomètre à pression de vapeur (modèle 5500, Wescor, USA). Tous les produits chimiques indiqués proviennent de Sigma.

La détermination de l'effet du pH extracellulaire sur le xCIC-5 a été réalisée dans le milieu ISO 95 dépourvu de HEPES et tamponné au pH voulu avec du MES (Sigma) ou bien du Trizma Base (Sigma). L'acidification du milieu intracellulaire des ovocytes de xénope a été réalisée à l'aide d'une solution possédant la composition du milieu ISO 95 dans lequel le HEPES

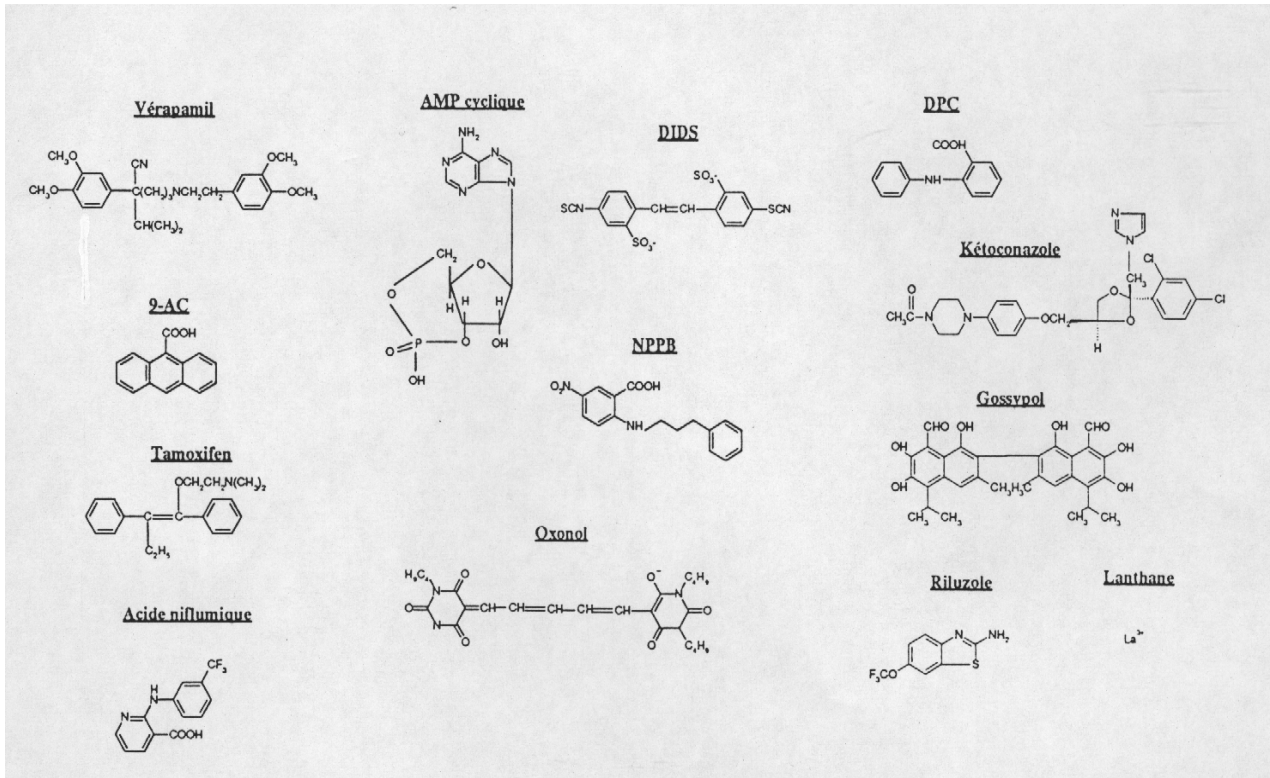


Figure 20: Formules chimiques développées des inhibiteurs des courants anioniques utilisés.

et le NaOH ont été remplacés par 2,4 mM de NaHCO₃. Le pH de cette solution dépend de sa pression partielle en CO₂. La solution contrôle est équilibrée à l'air (0,03% de CO₂) et son pH est de 7,5. L'acidification intracellulaire est obtenue en perfusant l'ovocyte avec la solution gazée à 2,5% de CO₂, de pH 6,7.

Milieu	culture	ISO 95	ISO 70	HYPO 70
NaCl	95	95	70	70
KCl	2	2	2	2
NaHCO ₃	2,4	2,4	2,4	2,4
MgSO ₄	0,82	0,82	0,82	0,82
Ca(NO ₃) ₂ , 4 H ₂ O	0,33	0,33	0,33	0,33
CaCl ₂ , 2 H ₂ O	0,41	0,41	0,41	0,41
HEPES	5	5	5	5
NaOH	3	3	3	3
mannitol	-	-	80	-
streptomycine	10 mg/l	-	-	-
pénicilline	6 mg/l	-	-	-
pH	7,4	7,4	7,4	7,4
pOsm	214 mOsm	214 mOsm	244 mOsm	164 mOsm

Tableau 2: Composition chimique des milieux utilisés dans le maintien des ovocytes de xénope et dans l'expérimentation.

4. Expression dans la lignée cellulaire HEK

L'expression transitoire de la protéine xCIC-3 dans les cellules HEK repose sur l'utilisation du plasmide bi-cistronique pIRES, qui permet la transcription simultanée des ADNc du xCIC-3 et du CD8. La transfection est réalisée en présence de lipofectamine (Gibco BRL) en suivant les instructions du fournisseur. En bref, 1,5 à 2,0 µg d'ADN sont mélangés aux réactifs fournis et déposés sur 9,6 cm² de cellules HEK. Après 5 heures d'incubation, le milieu est changé. Les cellules sont examinées 3 à 5 jours après la transfection par immunocytochimie (immunodétection du xCIC-3), par la mise en évidence du CD8 à l'aide d'anticorps anti-CD8 conjugué à des billes (Dynabeads, Dynal) et par patch-clamp.

5. Traduction *in vitro*

Les expériences de traduction *in vitro* ont été réalisées à l'aide du kit TNT (Promega, Madison, USA) en suivant les instructions fournies. Le protocole utilisé permet de coupler les réactions de transcription et de traduction. L'ADNc contenu dans une construction plasmidique circulaire est transcrit en ARNc par la polymérase adéquate (T7 ou SP6, selon la construction plasmidique qui sert de matrice), puis l'ARNc est traduit en protéine en présence d'un lysat de réticulocytes et d'acides aminés. La méthionine n'étant fournie que sous la forme radiomarquée au ^{35}S , les protéines néosynthétisées auront forcément incorporé l'acide aminé radioactif. Ceci permet de détecter ces protéines nouvellement traduites par autoradiographie, après une séparation en fonction de leur taille par SDS-PAGE.

6. Immunodétection par Western blot

Afin de déterminer l'expression des canaux CIC-3 et CIC-5 dans divers organes ou systèmes d'expression nous avons choisi l'approche immunologique. A l'aide de différents anticorps, nous avons pu immunodétecter les canaux étudiés par la technique de Western blot. Cette technique a également servi à étudier la glycosylation des protéines d'intérêt.

6.1. Les anticorps primaires et leur purification

* anti-xCIC-5 et anti-xCIC-3:

Nous avons fait produire des anticorps polyclonaux de lapin par la société Eurogentec (Belgique). Pour les deux canaux, ils s'agit d'anticorps anti-peptide C-terminal de la protéine. Les peptides choisis correspondent aux 16 derniers acides aminés (HIAQMANQDPDSILFN) pour le canal xCIC-5 et aux 14 derniers acides aminés (AQMANHDPESILFN) pour le canal xCIC-3. Etant donné la forte homologie de séquence entre les deux canaux, seul deux acides aminés diffèrent dans les séquences des peptides choisis. Pour chaque peptide, deux lapins ont été immunisés.

Les anticorps spécifiques ont été purifiés à partir des séras des saignées finales des lapins. Dans un premier temps, les IgG totaux sont séparés des autres protéines sériques de haut poids moléculaire par précipitation à l'acide caprylique (Sigma). Un volume de sérum est acidifié par l'ajout de 2 volumes d'acétate de sodium à 60 mM et de pH 4,0. Le pH final étant de 4,8. La précipitation est réalisée par ajout de 75 μl d'acide caprylique/ml de sérum, sous agitation continue, durant 30 minutes, à température ambiante. Le précipité blanc est éliminé par 20 minutes de centrifugation à 10 000 x g. Le surnageant est dialysé 15 heures contre du PBS. Dans un deuxième temps, les IgG spécifiques des peptides sont purifiés par affinité sur une

colonne peptide. 1 mg de peptide est couplé aux 6 ml de sépharose (Pharmacia Biotech, Suède) par ses groupements N-hydroxysuccinimide (NHS) en présence de tampon de couplage (0,1 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl, pH 8,3). Les groupements actifs inutilisés de la sépharose sont ensuite bloqués par 0,2 M de glycine dans le tampon de couplage. La colonne est ensuite lavée et équilibrée par 4 cycles de tampon de couplage et de tampon acétate (0,1 M Na acétate, 0,5 M NaCl, pH 4,0) suivi d'une neutralisation par du Tris 10 mM à pH 7,5. Les IgG spécifiques sont retenus sur la colonne par trois passages successifs des IgG totaux, suivi d'un lavage abondant par 0,5 M NaCl en Tris 10 mM à pH neutre. L'éluion des anticorps retenus par le peptide se fait à bas pH, en passant une solution froide (4°C) d'acide chlorhydrique à 0,1 M. L'éluat est immédiatement neutralisé par une solution de Trizma Base 2M à pH 10,2. Les anticorps ainsi purifiés sont aliquotés et stockés à -80°C.

* anti-rCIC-3

Il s'agit d'anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre une protéine de fusion constituée des acides aminés 592-661 du rCIC-3 et de la glutathione-S-transferase (GST). Ces anticorps ont été obtenus au sein d'Alomone Labs (Israël) par le Dr. G. H. Idelson. La protéine de fusion synthétisée par *Escherichia coli* a été purifiée par chromatographie sur une colonne de GST-sépharose (Pharmacia, Suède). L'immunisation a été réalisée par des injections mensuelles de protéine de fusion. Les IgG totaux ont été purifiés à partir de l'antisérum par une précipitation en présence de 50% de (NH₄)₂SO₄, puis débarrassés des IgG dirigés contre la GST par une incubation avec des billes couplées à la GST (Affigel 10, Bio-Rad). Les IgG spécifiques du rCIC-3 ont été purifiés par affinité sur une colonne présentant la protéine de fusion. Les anticorps obtenus ont été dialysés contre 0,1 M d'acétate d'ammonium, aliquotés et conservés à -80°C. Ces anticorps sont utilisés en Western blot à une concentration comprise entre 1,0 et 1,5 µg/ml.

6.2. L'anticorps secondaire

Les anticorps primaires étant issus de lapins, leur révélation se fait à l'aide d'un anticorps secondaire anti-lapin de chèvre conjugué à la peroxydase (HRP) (Sigma). Cet anticorps est utilisé à une dilution de 1/15 000.

6.3. Préparation des fractions membranaires

Des fractions membranaires ont été préparées à partir de divers organes de souris et de xénope, des lignées cellulaires A6 et à partir d'ovocytes de xénope.

Les souris de type B6D2 F1 (issues d'un croisement mâle DBA2 x femelle C57 et élevées au Centre de Biochimie, Nice) sont sacrifiées par étirement des cervicales. Les xénopes

(maintenues à l'animalerie du laboratoire) sont placées en hypothermie, puis décapitées. Les organes sont prélevés rapidement et rincés sur la glace par du PBS (300 mOsm) pour les organes de mammifère et du PBS 0,8X (240 mOsm) pour les organes d'amphibien. La dissection se fait également dans ces solutions. Le travail sur la glace est maintenu tout au long de la préparation des fractions membranaires. Tous les organes, sauf l'intestin, sont utilisés en entier. Le tube digestif est ouvert longitudinalement et étalé sur sa face séreuse. L'épithélium muqueux est prélevé à l'aide d'une lame de verre que l'on passe perpendiculairement au tissu.

Les cellules A6 sont rincées 3 fois par du PBS 0,8X, décollées, centrifugées à 1000 x g et débarrassées du surnageant.

Les ovocytes sont isolés et éventuellement injectés comme décrit ci-dessus. Ils ne nécessitent pas de manipulation particulière avant la préparation des fractions membranaires.

Généralement l'homogénéisation se fait dans le tampon de lyse décrit par Beron et Verrey (1994), dont la composition est: 1% Triton X-100, 0,4% Na déoxycholate, 66 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 7,4. Avant utilisation, ce tampon est additionné de 1 mM de phénylméthylsulfonide fluoride (PMSF) (Sigma) et conservé sur la glace, afin d'inhiber les protéases. Les organes ou cellules sont homogénéisés dans ce tampon à l'aide d'un broyeur en verre ou par 10 aller-retour dans une aiguille 23G. L'homogénat est débarrassé des gros débris et des cellules non lysées, par 15 minutes de centrifugation à 10 000 x g dans une centrifugeuse réfrigérée à 4°C. Trente minutes d'ultracentrifugation à 100 000 x g (4°C) (TL-100, Beckman) du surnageant permettent de récupérer la fraction membranaire dans le culot. Cette fraction est alors resuspendue dans le tampon d'homogénéisation (additionné de PMSF) et le contenu en protéines dosé à l'aide d'un procédé colorimétrique commercial (BioRad Protein Assay, BioRad).

6.4. SDS-PAGE

Les protéines membranaires sont séparées selon leur masse moléculaire par électrophorèse sur des mini-gels d'acrylamide en conditions dénaturantes. Le gel d'acrylamide est composé de deux parties:

* la partie supérieure est composée de 4% d'acrylamide dans 125 mM Trizma Base (pH 6,8), 0,1% sodium dodécyl sulfate (SDS), 0,5% persulfate d'ammonium et 0,1% TEMED. Ce gel permet une migration rapide lors de la pénétration des protéines dans le gel depuis le puits (gel de "stacking").

* la partie inférieure est composée de 7,5% d'acrylamide dans 375 mM Trizma Base (pH 8,8), 0,1% SDS, 0,5 mM EDTA, 0,5% persulfate d'ammonium et 0,02% TEMED. Ce gel permet la résolution lors de la séparation des protéines de moyen à haut poids moléculaire (gel de séparation).

Les échantillons protéiques sont mélangés 1:1 avec le tampon de solubilisation ayant les concentrations finales suivantes: 60 mM Trizma Base, 3% SDS, 10% glycérol, 1,5 mM bleu de bromophénol et 1% β -mercaptoéthanol. Après avoir dénaturés les protéines 5 minutes à 95°C, les échantillons sont déposés dans les puits formés dans le gel de "stacking" à raison de 40 à 100 mg de protéines par puits selon les organes ou les cellules, et à raison de 15 à 25 μ g de protéines par puits pour les ovocytes de xénope. Une piste est toujours réservée au dépôt de 5 μ l de standards protéiques précolorés (prestained SDS-PAGE standards, high range, BioRad) qui permettront de visualiser différents poids moléculaires. Le gel est alors placé en tampon de migration (25 mM Trizma Base, 250 mM glycine, 0,1% SDS, pH 8,5) et soumis à une tension constante de 200 V, pendant 53 minutes environ.

6.5. Electro-transfert sur membrane de nitrocellulose

Une fois les protéines séparées selon leur taille, elles sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (Hybond-C extra, Amersham). Pour cela, le gel de séparation est placé sur une membrane de nitrocellulose, l'ensemble des deux étant placé entre 5 feuilles de papier pour chromatographie 3mm Chr (Whatman) de chaque côté. Les feuilles de papier sous la membrane, placées du côté de l'anode, sont imbibées de tampon "anode" (300 mM Trizma Base, 20% éthanol) et les feuilles placées sur le gel, du côté de la cathode, sont imbibées de tampon "cathode" (40 mM acide α -amino-n-caproïque, 20% éthanol). Un courant constant de 80 mA par mini-gel est appliqué pendant 75 minutes. Au bout de ce temps, la coloration bleue correspondant aux standards protéiques est visible sur la membrane ce qui témoigne du transfert des protéines. L'ensemble des protéines peut être visualisé par une coloration au rouge Ponceau à 1% (Sigma). La membrane est plongée dans la solution de rouge Ponceau pendant une minute, puis rincée à l'eau distillée.

6.6. Immunodétection

L'immunodétection d'une protéine sur la membrane de nitrocellulose repose sur la fixation d'un anticorps primaire qui est supposé reconnaître spécifiquement la protéine d'intérêt. L'anticorps primaire sera reconnu par un anticorps secondaire couplé à un système de révélation.

La première étape consiste à saturer la membrane de nitrocellulose par une incubation de 15 minutes dans du TBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 2,5 mM Trizma Base, pH 7,4) contenant 5% de lait écrémé et 0,1% de Tween 20. La saturation de la membrane diminue de manière importante les liaisons non-spécifiques des anticorps.

Dans un deuxième temps, la membrane est incubée avec l'anticorps primaire à une dilution adéquate dans du TTL (TBS contenant 1% de lait écrémé et 0,1% de Tween 20). Dans les ovocytes de xénope, l'expression des protéines d'intérêt étant suffisamment forte, une

incubation de 2 heures à 37°C est suffisante, tandis que pour des organes ou des cellules, l'incubation se fera pendant 15 heures à 4°C.

Ensuite, la membrane est lavée 3 fois 10 minutes, à température ambiante, dans le TTL, incubée 1 heure avec l'anticorps secondaire et encore lavée au moins 3 fois 10 minutes dans le TTL.

Les protéines immunodétectées sont alors révélées à l'aide d'un kit de révélation par chemiluminescence (ECL+, Amersham). La chemiluminescence est obtenue par une réaction enzymatique catalysée par la peroxydase (couplée à l'anticorps secondaire). Le substrat de la peroxydase est le luminol, fourni par la solution commerciale. En présence de peroxyde, la peroxydase catalyse l'oxydation du luminol en un ester d'acridinium, qui va réagir avec le peroxyde ce qui a pour effet de produire une molécule excitée qui émet à une longueur d'onde de 430 nm. L'autoradiographie de la membrane avec un film BioMax MR-1 (Kodak) permet de visualiser le signal chemiluminescent.

7. Etude de la glycosylation des protéines

7.1. Déglycosylations enzymatiques

L'analyse des protéines par Western blot permet d'apprécier les poids moléculaires des protéines étudiées. Les masses moléculaires des protéines membranaires ne correspondent généralement pas à leur masses théoriques dans la mesure où la plupart des protéines sont sujettes à des modifications post-traductionnelles, comme par exemple la glycosylation. Le type de glycosylation d'une forme protéique peut être déterminé par sa sensibilité à diverses enzymes déglycosylantes.

Au cours de ce travail, trois expériences de déglycosylation différentes ont été réalisées. Les échantillons protéiques soumis aux différents traitements déglycosylants sont généralement constitués de protéines solubilisées afin de faciliter l'accès aux enzymes. Les cellules sont homogénéisées dans le tampon RIPA (150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0,5% sodium déoxycholate, 0,1% SDS, 50 mM Trizma Base, 1 mM PMSF, pH 8,0) par 10 aller-retour dans une aiguille 23G. L'homogénat est agité pendant 2 heures à 4°C avant d'être ultracentrifugé pendant 30 minutes à 100 000 x g. C'est le cas des expériences réalisées sur les ovocytes de xénope. Pour les échantillons protéiques issus des organes de souris, la préparation a été faite en tampon de lyse. Le fait que ces protéines ne soient pas solubilisées au départ n'a pas d'incidence notable sur le traitement déglycosylant car dans tous les cas la première étape du traitement correspond à une étape dénaturante. On place environ 100 µg de protéines en présence de 0,5% SDS et de 0,1% β-mercaptoéthanol et l'ensemble est porté à 95°C pendant 5 minutes. Pour

chaque préparation protéique, on réalise un échantillon avec l'enzyme et un échantillon contrôle, sans l'enzyme.

* Identification des formes immatures

Les protéines dénaturées sont incubées à 37°C, pendant 15 heures, avec 5 mU d'endoglycosidase H (Boehringer) dans 50 mM de sodium acétate à pH 5,5. L'endoglycosidase H coupe les groupements oligosaccharidiques riches en mannoses, liés à la protéine au niveau d'une asparagine (N-glycosylation). Les formes protéiques dont les groupements N-glycosylés sont sensibles à l'endoglycosidase H sont des formes protéiques en cours de maturation, localisées entre le réticulum endoplasmique et les compartiments trans de l'appareil de Golgi.

* Identification des formes N-glycosylées

Cette réaction de déglycosylation est réalisée en incubant les protéines dénaturées pendant 15 heures à 37°C en présence de 0,2 U du mélange endoglycosidase F/N-glycosidase F (Boehringer) dans un tampon composé de 30 mM Trizma Base, 30 mM EDTA, 1,5% Triton X-100, à pH 8,0. Ce mélange enzymatique coupe toutes les formes de N-glycosylation: les formes riches en mannoses, ainsi que les formes complexes.

* Identification des formes O-glycosylées

L'échantillon protéique dénaturé est placé dans un tampon de 50 mM citrate de sodium à pH 5,5, puis incubé pendant 90 minutes, à 37°C, avec 20 mU de neuraminidase (Boehringer). On ajoute ensuite 1,25 mU de O-glycosidase (Boehringer) et on poursuit l'incubation à 37°C pendant 90 minutes. L'utilisation de neuraminidase permet de cliver les résidus d'acide sialique, ce qui rend la glycoprotéine plus accessible à la O-glycosidase qui pourra ainsi digérer les O-glycanes.

Après le traitement enzymatique, l'échantillon protéique est analysé par Western blot et immunodétection. La sensibilité aux différentes enzymes est déterminée par comparaison de la migration de la protéine traitée par rapport à la protéine non traitée.

7.2. Inhibition de la glycosylation par la tunicamycine

La tunicamycine est connue pour son effet inhibiteur sur la machinerie de glycosylation (McDowell and Schwarz, 1988). Nous avons utilisé la tunicamycine pour étudier la glycosylation de la protéine xCIC-5, exprimée dans l'ovocyte de xénope. Les ovocytes soumis à la tunicamycine ont été injectés avec une solution contenant 15 ng d'ARNc et 0,3 ng de tunicamycine (Sigma), puis maintenus pendant 4 jours dans le milieu "culture" contenant 2 µg de tunicamycine/ml de milieu. Après cette période, l'effet a été analysé à deux niveaux: d'abord,

les courants à +80 mV ont été relevés pour déterminer l'effet de la tunicamycine sur l'activité canal, puis les mêmes ovocytes ont été analysés par Western blot pour déterminer l'incidence du traitement sur la glycosylation de la protéine.

8. Immunocytochimie

Afin de localiser les protéines xCIC-5 et xCIC-3 au niveau cellulaire, on a réalisé des expériences d'immunocytochimie directement sur les lignées cellulaires A6 (détection du xCIC-5 endogène) ou HEK (mise en évidence du xCIC-3 obtenu par transfection transitoire). L'immunomarquage se fait sur des cellules cultivées en monocouche (sur filtre perméable) et/ou cultivées sur lamelle de verre. La manipulation et l'observation au microscope optique est plus aisée pour les cellules sur lamelle, cependant la différenciation des cellules A6 en épithélium hautement polarisé nécessite la culture sur des filtres.

8.1 Fixation et perméabilisation des cellules

Après avoir été rincées rapidement par trois bains de PBS (0,8X pour les cellules A6 et 1X pour les cellules HEK), les cellules sont fixées 45 minutes par 3% de paraformaldéhyde dans du PBS, à pH neutre. Pour les 15 dernières minutes, la solution de fixation est additionnée de 0,3% de Triton X-100, ce qui a pour effet de débiter la perméabilisation des cellules. La fixation au paraformaldéhyde est une technique classique qui permet de fixer efficacement les protéines cellulaires et de conserver suffisamment l'architecture cellulaire. L'utilisation de glutaraldéhyde n'est donc pas indispensable ce qui permet d'éviter les problèmes d'autofluorescence artéfactuelle liés à l'utilisation de glutaraldéhyde.

Suit une incubation de 5 minutes dans 1% de SDS (dans du PBS), qui s'est révélée être profitable à l'immunomarquage. En effet, les épitopes reconnus par les anticorps utilisés sont intracellulaires et la perméabilisation des cellules est donc une étape indispensable. On termine par trois lavages d'au moins 5 minutes chacun, avec le PBS, pour éliminer soigneusement le SDS dont une action prolongée pourrait résulter en la solubilisation et la perte des protéines membranaires.

8.2. Immunomarquage

Les liaisons non-spécifiques des anticorps sont réduites par une étape de blocage de 15 minutes avec 3% de BSA dans du PBS, dont la salinité est augmentée en portant la concentration en NaCl à 500 mM. Par la suite, la saturation des sites de liaison non-spécifiques est maintenue par la présence de 1% de BSA dans toutes les solutions utilisées pour incuber et laver les

cellules. Le maintien d'une salinité élevée dans ces solutions permet également d'empêcher les liaisons non-spécifiques. Les cellules sont ensuite exposées pendant 2 heures aux anticorps primaires (de lapin) à la dilution adéquate. L'excès d'anticorps est lavé par 3 bains de 10 minutes, et les anticorps liés spécifiquement sont reconnus par les anticorps secondaires anti-lapin (de chèvre ou de mouton, Sigma) conjuguées à des sondes fluorescentes telles que le FITC (fluoresceine isothiocyanate) ou le dérivé Cy3. Après une heure d'incubation, l'excès d'anticorps secondaires est lavé par 3 bains de 10 minutes. Les noyaux des cellules peuvent éventuellement être marqués à l'agent intercalant de l'ADN, le Hoechst 33342 (Molecular Probes). Pour cela, une incubation de 5 minutes à 1 $\mu\text{g/ml}$, suivi de plusieurs rinçages des cellules à l'eau distillée suffit. Enfin, les cellules sont montées entre lame et lamelle avec un milieu de montage spécial, conçu pour limiter les phénomènes de "bleaching", c'est à dire d'extinction de la fluorescence à la suite d'une exposition prolongée aux rayons UV excitateurs. Ce milieu de montage "anti-bleaching" est composé de 2 g/ml de polyvinylalcool, 3 mg/ml de n-propylgallate, 50% de glycérol et 3,25 mM Tris, pH 8,5 et est conservé aliquoté à -20°C .

Afin d'établir la spécificité du marquage observé, diverses expériences contrôle ont été réalisées:

- * contrôle sans anticorps primaire et sans anticorps secondaire

 - => pour tester le signal endogène aux cellules

- * contrôle sans anticorps primaire

 - => pour tester la spécificité de l'anticorps primaire

- * contrôle avec une préincubation de l'anticorps primaire en présence du peptide ayant servi à l'immunisation

 - => pour tester la spécificité de l'anticorps primaire, le peptide faisant compétition avec l'antigène.

9. Microscopie

L'observation des cellules se fait avec un microscope optique droit, en contraste interférentiel et en fluorescence (Polyvar, Reichert-Jung). L'observation du signal obtenu à l'aide des sondes fluorescentes nécessite divers filtres d'excitation et d'émission, selon le type de sonde utilisée.

Sonde fluorescente	longueur d'onde d'excitation	longueur d'onde d'émission
FITC	495 nm	525 nm (vert)
Cy3	552 nm	570 nm (rouge)
Hoechst 33342	360 nm	470 nm (bleu)

Tableau 3: Longueurs d'ondes d'excitation et d'émission des différentes sondes fluorescentes utilisées.

Sonde fluorescente	Filtre	Filtre d'excitation	Filtre d'arrêt
FITC	B3	475-495 nm	> 520 nm
CY3	G2	520-560 nm	> 590 nm
Hoechst 33342	U1	330-380 nm	> 418 nm

Tableau 4: Longueurs d'onde des bandes passantes des filtres d'excitation et des filtres d'arrêt utilisés.

RESULTATS & DISCUSSION

A. Caractérisation fonctionnelle et distribution du xClC-5

1. Caractéristiques moléculaires du xCIC-5

L'ADNc du xCIC-5 est constitué de 2424 paires de base et code pour une protéine de 808 acides aminés (**Figure 21**), dont la masse moléculaire théorique calculée est de 90 kDa (Lindenthal et al., 1997). L'analyse de l'hydrophobicité de la protéine a été effectuée selon la méthode décrite par Kyte et Doolittle (1982). Il apparaît que la protéine possède 10 à 12 domaines d'au moins 21 acides aminés suffisamment hydrophobes pour s'organiser en hélices alpha et traverser une membrane cellulaire (**Figure 22**). Le modèle topologique que nous proposons pour le xCIC-5 (**Figure 23**) dérive de celui qui a été proposé par Lloyd et al. (1996) pour son homologue humain hCIC-5. La séquence protéique possède trois sites potentiels de N-glycosylation aux positions Asn-17, Asn-169 et Asn-470. Si le modèle topologique proposé est correct, l'asparagine en position 17 se situe à l'intérieur de la cellule et n'est probablement pas utilisé. Par contre, les deux autres sites seraient localisés sur des boucles extracellulaires et peuvent faire l'objet d'une N-glycosylation au cours de la maturation post-traductionnelle de la protéine. La séquence porte également trois sites consensus de phosphorylation par les protéines kinases dépendantes de l'AMPc et du guanosine 3', 5' -cyclic monophosphate (Ser-10, Thr-411 et Thr-412), ainsi que de nombreux sites consensus pour la protéine kinase C (Thr-353, Thr-411, Ser-459, Thr-606, Ser-639, Ser-690, Ser-708, Thr-719, Ser-738 et Thr-786).

Le xCIC-5 appartient à l'embranchement CIC-3/4/5 de la famille des CIC. Il présente de fortes homologies de séquence protéique avec les autres membres de cet embranchement (**Tableau 5**).

	CIC-3	CIC-4	CIC-5
humain	69%	73%	77%
rat	72%	74%	77%

Tableau 5: pourcentages d'identité des différentes protéines avec la protéine xCIC-5.

Les 51 premiers acides aminés du xCIC-5 sont absents chez le hCIC-5 et le rCIC-5 (qui présentent 100% d'identité au niveau protéique). Ainsi, si on considère que la protéine commence à la cinquième méthionine, le pourcentage d'identité avec le hCIC-5 est augmenté à 84%. Par contre, l'homologie avec des membres d'autres embranchements est beaucoup plus faible. A titre d'exemple, il n'y a que 19,8% d'identité avec le rCIC-2 et 14,5% avec le hCIC-6.

2. Expression fonctionnelle du xCIC-5 dans l'ovocyte de xénope. Caractéristiques électrophysiologiques et pharmacologiques.

Pour réaliser l'expression fonctionnelle du xCIC-5, nous avons choisi l'ovocyte de xénope (**Figure 24**). Ce système cellulaire d'expression est largement utilisé pour l'étude de protéines hétérologues de nature diverses et nous semblait particulièrement adapté à l'expression homologue d'une protéine originaire du xénope.

2.1. Injection de l'ARNc du xCIC-5 avec les régions non-codantes natives

L'expression d'une protéine homologue ou hétérologue dans l'ovocyte de xénope peut être obtenue par microinjection, soit de l'ADNc de la protéine d'intérêt dans le noyau, soit de l'ARNc dans le cytoplasme. Nous avons opté pour la microinjection d'ARNc transcrit *in vitro*. Pour cela, l'ADNc du xCIC-5 entouré de ses régions 5' et 3' non-codantes natives ont été sous-clonés dans un plasmide, en aval du promoteur de la T7 polymérase (voir **Figure 17**). Après linéarisation du plasmide, en aval de l'insert, la transcription *in vitro* est réalisée par la T7 polymérase, puis l'ARNc obtenu est purifié. Les ovocytes sont injectés avec environ 5 ng d'ARNc et la conductance de la membrane plasmique est analysée 1 à 5 jours après l'injection. La grande taille des ovocytes (1,2 à 1,3 mm au stade VI) permet l'utilisation de la technique des double microélectrodes et l'application du protocole de voltage-clamp (**Figure 25**).

L'analyse électrophysiologique réalisée montre qu'une conductance nouvelle (I_{natif}) apparaît, environ 4 jours après l'injection, sur les ovocytes injectés avec 2,5 à 5 ng d'ARNc. L'enregistrement représentatif des tracés de courant obtenus avec le protocole de voltage-clamp (**Figure 26 A**) montre que les courants ne s'inactivent pas avec le temps. Les courbes courant/voltage (I/V) (**Figure 26 B**), enregistrées sur des ovocytes contrôle (injectés à l'eau ou bien non-injectés) et des ovocytes injectés depuis 4 jours avec l'ARNc, montrent une augmentation d'un facteur 23 du courant mesuré à +80 mV (courant sortant¹): on enregistre 6263 ± 492 nA (n=29) sur les ovocytes injectés avec l'ARNc et seulement 271 ± 30 nA (n=13) sur les ovocytes contrôle. La contribution de la conductance de base, présente dans les ovocytes contrôles, peut donc être considérée comme négligeable par rapport à la conductance induite. L'augmentation du courant est moins prononcée pour les voltages inférieurs au potentiel de membrane (courants entrants¹). La conductance mise en évidence présente donc une rectification

¹ Par convention, les courants enregistrés pour les voltages supérieurs au potentiel d'inversion (quand $I=0$ nA) sont appelés courants sortants et ceux enregistrés pour des voltages plus négatifs sont appelés courants entrants. Pour un anion, par exemple le chlorure, un courant sortant correspond à un flux entrant dans la cellule, alors qu'il s'agit d'un flux sortant de cations. Inversement, un courant entrant correspond à un flux entrant de cations ou bien un flux sortant d'anions.

-450 TTCCAGTCACGACGTTGTAACGACGGCCAGTGTATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGGCCGACG
 -360 TCGCATGCTCCCGCCCCCATGTCCGCGGAGTCCGCCCTAGTACCAGAGCTGTGAGGAGCTGTCTCCGACTCTGATATAAATACATTTTA
 -270 AAGAGGTGACTGTACAATACTGTGATACCATATGAAAGACTGTCCCTCGTTCAGGTTCTTCATGATTTTTAGTCTGATTTCTCTCTT
 -180 CTGGAGGGCACAATAATACCAGTCCAGGAGTACCACAGAATTTATGGCCGTCAATGGGTACCAGTTTGTGCAGCAAGAGCCACTCTT
 -90 ATAAGAGCTAATGTCTGACATTGAGTAATTGCAGAGAGTAATCCAGCATTGTACCAGGAGCCCCCTCAGTCGCAAGCATAGTTGCGGG
 1 ATGGACAACAAGGATTTCCGCGTTCCAGCCTCGCGAGTTTTCACAGCAACACTAGTGTGAGGACATGGTTGAGATCACAGAGGCTACC
 1 M D N K G F R R S S L A S F H S N T S D E D M V E I T E A T
 91 CTGGATTTTACCATGACAGATGACGTGCCCCCATCGACAGAGACATGGTGCAGGCTTCGTTTCATACAACGGCAATGGTTGAACGGC
 31 L D F T M T D D V P P I D R D M A A G F V S Y N G N G L N F
 *
 181 GCGCTAAGGTGATGGATTTCCGATGTGCCGGAGTGGGACGTATGAAGACTCAATACCATCGACTGGGTGAGGAGAAATCAAGA
 61 G A K V M D F L D V P G V G T Y E D F N T I D W V R E K S R
 271 GATCGAGACAGGCACAGAGAGATTTCCAGCAGGAGTAAAGAGTCCACGTGGGCCCTTTCGACAGTGTAAAGTGTGCTTTCTGGATGG
 91 D R D R H R E I L S R S K E S T W A L L H S V S D A F S G W
 361 ATGCTTATGTCTCATCGCCCTAACAGCAGGTTTCATTGGCTGGTTTGGATGACATCTCATCGACTGGATGACAGATCAAAAGGAGGC
 121 M L M L L I G L T A G S L A G L I D I S S H W M T D L K E G
 451 ATCTGTCTGCTGGTTCTGGTTTAAACCATGAACAGTGTGTGGCAGTCTAATAATGTGACTTTTGAAGTCGAAATACTGTCCAGAA
 151 I C L P W F W F N H E Q C C W Q S N N V T F E D R N N C P E
 1 1
 541 TGGCAAGCTGGTCCCAGCTTGTCTCGCAGGTCGCGAGGAGCATTCCATACATCTAAATACTTTATGTATGTGGGCACT
 181 W R S W S Q L V L G R S E G A F P Y I L N Y F M Y V M W A L C
 631 CTTTTCTCGCTAGCTGTTTGTGGTCCGTAACCTTGGCCCATATGCTGCGGTTCCAGGATTCCTGAGATAAAGACCATATTGAGT
 211 L F S L L A V L L V R N F A P Y A C G S G I P E I K T I L S
 721 GCTTTCATTTCTGGCTATTTGGGCAAGTGGACGCTGATTATTAAGACTATGACACTGGTGTGGTGTCTTCTGGCCTCAGCTTG
 241 G F I I R G Y L G K W T L I I K T M T L V L A V S S G L S L
 811 GGCAGGAAGTCCCTCATTCAATGTTGCTGTGTTGGTAAACATCTTGTGCCATCTTCTACTAAGTACCGCAAGATGAGGCCAAG
 271 G K E G P L I H V A C C C G N I L C H L F T K T R K N E A K
 901 AGGAGAGAGGTGTTGTCAGCTGCAGCCGCTGCCGGGTGTCCTGAGCCTTTGGTGTCCCATTTGGTGGAGTTCTTTCAGTCTGGAAGAG
 301 R R E V L S A A A A A G V S V A F G A P I G G V L F S L E E
 991 GTCAGCTATTATTTCCATTAAGACTTTATGGAGTCACTTTGCTGCTATGGTAGCAGCCTTTACTCTCGTTCCATAAACCCCTTT
 331 V S Y Y F P L K T L W R S F F A A L V A A F T L R S I N P
 c
 1081 GGAACAGCCGCTGGTCTCTTCTACGTTAGTTCACGCGCCATGGCACTTATGGAGCTCATTCATTATTTATTAGGAATATTT
 361 G N S R L V L F Y V E F H A P W H L L E L I P F I L L G I F
 1171 GGGGAGTGTGGGTGCTTTTTTATCCGTGCCAATTCCTGGTGTACAGACGGAAACCACAACTCGGTCGCTATCCTGTGGC
 391 G G V W G A F F I R A N I A W C H R R K T T K L G R Y P V A
 1261 GAAGTCAATGTTGACGGCTATTACAGCATACTGGCATTCCCAATGATTACAGAGAATGAGCTCTAGTGAATGATATCTGAGCTT
 421 E V L M V T A I T A I L A F P N D Y T R M S S E S E L
 1351 TTCAATGACTGCGCCTTCTTACTCGTCCAAGCTATGTGATTATGTTAATGATTACAACAACAAGGGGGCAACCTCCCTGACCGT
 451 F N D C G L L D S S K L C D Y V N D Y N N T K G G N L P D R
 c
 1441 GCAGCAGAAATGGAGTCTACACAGCCATGGCAACTGTCCTGGCTGATCTTCAAAGCTGTGATTACCATATTACATTTGGCATA
 481 A A G N G V Y T A M W Q L S L A L I F K A V I T I F T F G I
 1 1
 1531 AAGGTGCCATCAGCCCTTTTTCATCCCAAGCATGGCTGTGGTGTATAATGGGAAGGCTTTTGGGGGTTGCCATGGAAGACTTTCTCTC
 511 K V P S G L F I P S M A V G A I M G R L L G V A M E Q L S F
 1621 TACCATCAGACTGGCTGATCTTACAGAGGATGGTGAACCAAGGAGCAGACTGTATCACTCTGCTCTATGCCATGGTTGGAGCAGCG
 541 Y H H D W L I F R G W C N Q G A D C I T P G L Y A M V G A A
 1711 GCCTGCCTAGGTGGCCACACGATGACTGTCTCACTTGTGGTTATTATGTTGAGATAACTGGTGGATTGGAATACATTTGACTCTG
 571 A C L G G A T R M T V S L V V I M F E I T G G L E Y I V P L
 1801 ATGTCGCCGCCATGACCAGCAAGTGGGTGGCAGCCTTTGGGGCGGGGAGTATTTATGATGCCACATCCATTTAAATGGTTACCCC
 601 M A A A M T S K W V A D A L G R G S I Y D T H I H L N G Y P
 c
 1891 TTCTGGAGGCGAAGGAGAGTTCAGCCATAAAACACTGGCTATGGATGTCATCGCTCCCGCGCAATGACCTATATTAACGGCCATT
 631 F L E A K G E F S H K T L A M D V M R P R R N D P I L T A I
 c
 1981 ACTCAAGACAGCATGACGGTGGAGCATTAGGCCATTATAAGTGAACGACCTACAGTGGCTTCCCAATGTAGTTCTAGAGAATCC
 661 T Q D S M T V E D I E A I I S E T T Y S G F P I V V S R E S
 c
 2071 CAAAGACTAATGGGCTTTGACTGAGAAGAGACTTAATATCTCTATCGAAAGCGCCGAAAAAGCAAGGATAGTGAACACATCG
 691 Q R L M G F V L R R D L I I S I E S A R K K Q E G I V S T S
 c
 2161 CGGATTTACTTTACAGAGCACAGCCCAACCAACCCAGCAGTCTCCACCCAGCCTAAAGCTTCGTGCAATATTGGACTTAAGCCCTTC
 721 R I Y F T E H T P T Q P T T A P P S L K L R A I M D L S P F
 c
 2251 ACAATAACAGACCAGACACCTATGGAGATTGTGGTGGATATCTCCGTAAGCTTGGTCTGCGCCAGTGCCTTGTGACACACAATGGGAGA
 751 T I T D Q T P M E I V V D I F R K L G L R Q C L V T H N G R
 2341 TTGCTTGGCATAATAACAAGAAAGATGTCCTAAAGCATATAGCAGATGGCCAATCAAGATCCGACTCTATATTTAACTGAATC
 781 L L G I I T K K D V L K H I A Q M A N Q D P D S I L F N *
 c
 2431 TATGCTAAAATAACAGGAGCTATGGACCTGTGAAGCCATATTCAGTATCATTTGAGGTTGTTTTCACCTCCAGACTGTGAAGAG
 2521 GTCCCTGTCATGAAGTGGAGTACTGAAGCTTTGGTGGCTGATTTCCAAAAATGAAGT

Figure 21: Séquences nucléotidique et protéique du xCIC-5 (incluant les régions non-codantes). Les étoiles indiquent les sites potentiels de phosphorylation par la protéine kinase A. Les c indiquent les sites potentiels de phosphorylation par la protéine kinase C. La séquence nucléotidique du xCIC-5 est déposée à la banque de données de la GenBank/European Molecular Biology Laboratories sous le N° Y09940.

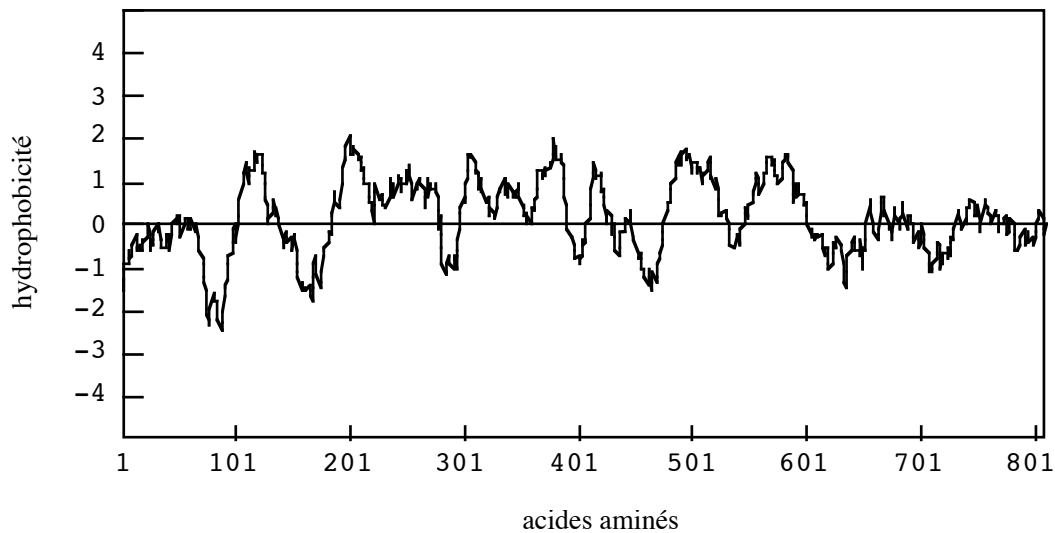


Figure 22: Profil d'hydrophobicité du xClC-5. L'index d'hydrophobicité moyenne est obtenu par l'algorithme décrit par Kyte et Doolittle (1982) avec une fenêtre de 21 acides aminés. Les valeurs positives correspondent aux régions hydrophobes et les valeurs négatives correspondent aux régions hydrophiles.

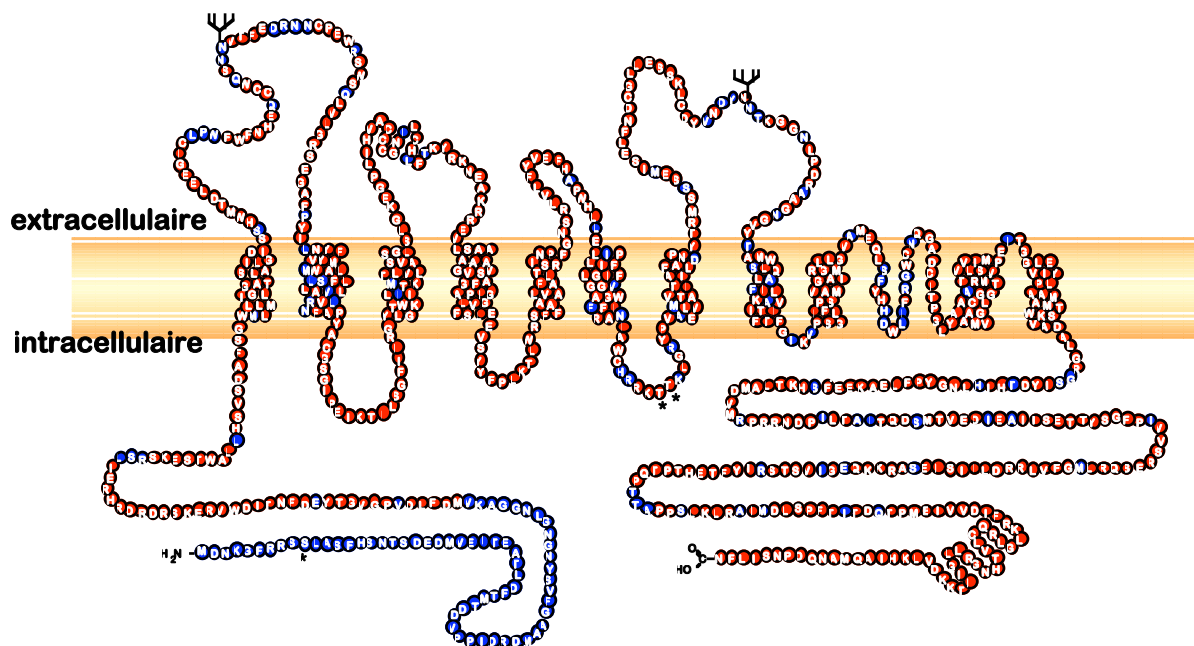


Figure 23: Modèle topologique proposé pour le xClC-5 (d'après le modèle proposé pour le hClC-5 par Lloyd et al., 1996). Les extrémités N- et C-terminales seraient intracellulaires. Le modèle permet de distinguer les acides aminés identiques (en rouge) et différents (en bleu) par rapport à ceux de la protéine hClC-5. Deux sites de N-glycosylation potentiels sont indiqués sur des boucles extracellulaires. Des étoiles marquent la localisation de sites potentiels de phosphorylation.

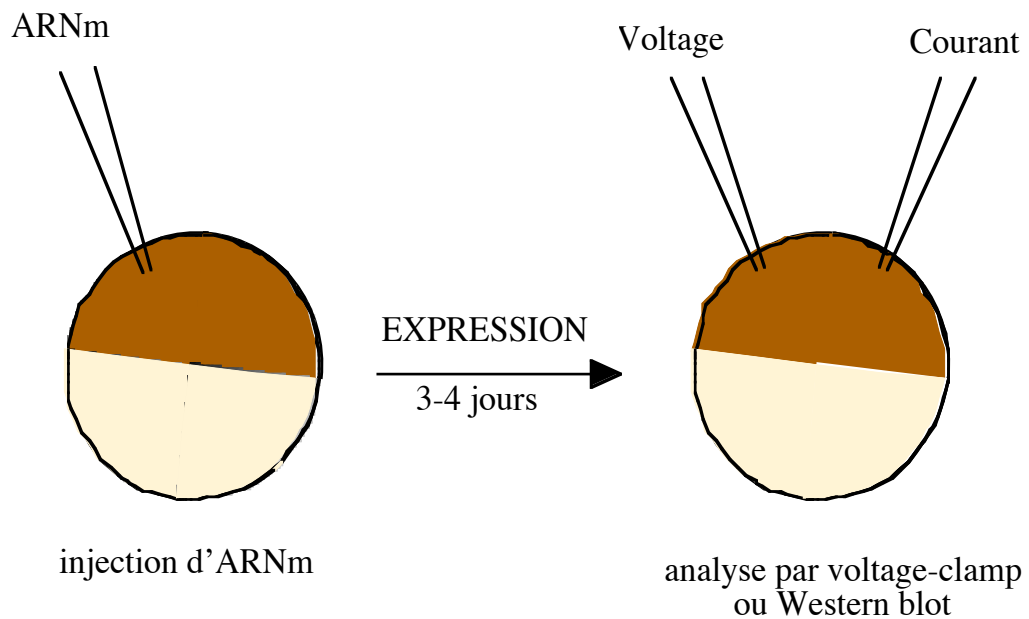
A**B**

Figure 24: Le système d'expression de l'ovocyte de xénope. A: photographie d'une femelle *Xenopus laevis* adulte. B: principe de l'expression d'une protéine dans l'ovocyte de xénope. Les ovocytes sont injectés individuellement avec les ARNm de la (ou des) protéine(s) à exprimer. Trois à quatre jours après l'injection des ARNm, l'expression de la protéine peut être détectée par la mesure de la conductance membranaire en double micro-électrodes, ou bien par immunodétection de la (ou des) protéine(s), par exemple en Western blot.

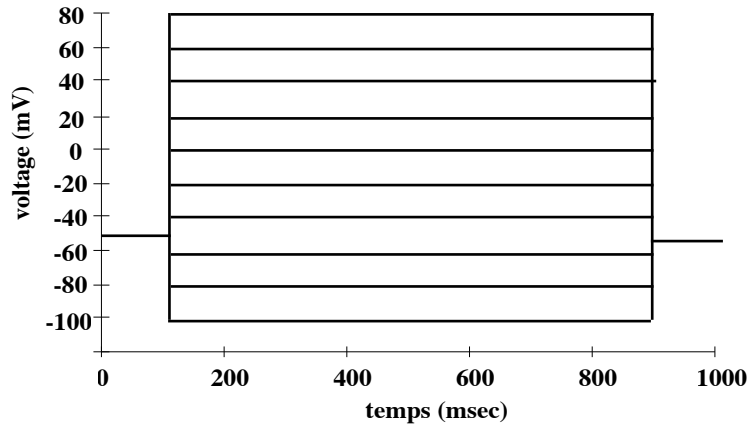


Figure 25: Protocole de voltage-clamp utilisé pour l'analyse électrophysiologique des ovocytes de xénope, à l'aide de la technique des double micro-électrodes. Un potentiel de -50 mV est imposé à la membrane de l'ovocyte, puis des potentiels de -100 mV à +80 mV, par pas de 20 mV, pendant 800 msec chaque. Pour chaque potentiel imposé on enregistre le courant correspondant afin d'établir une courbe courant/voltage (I/V).

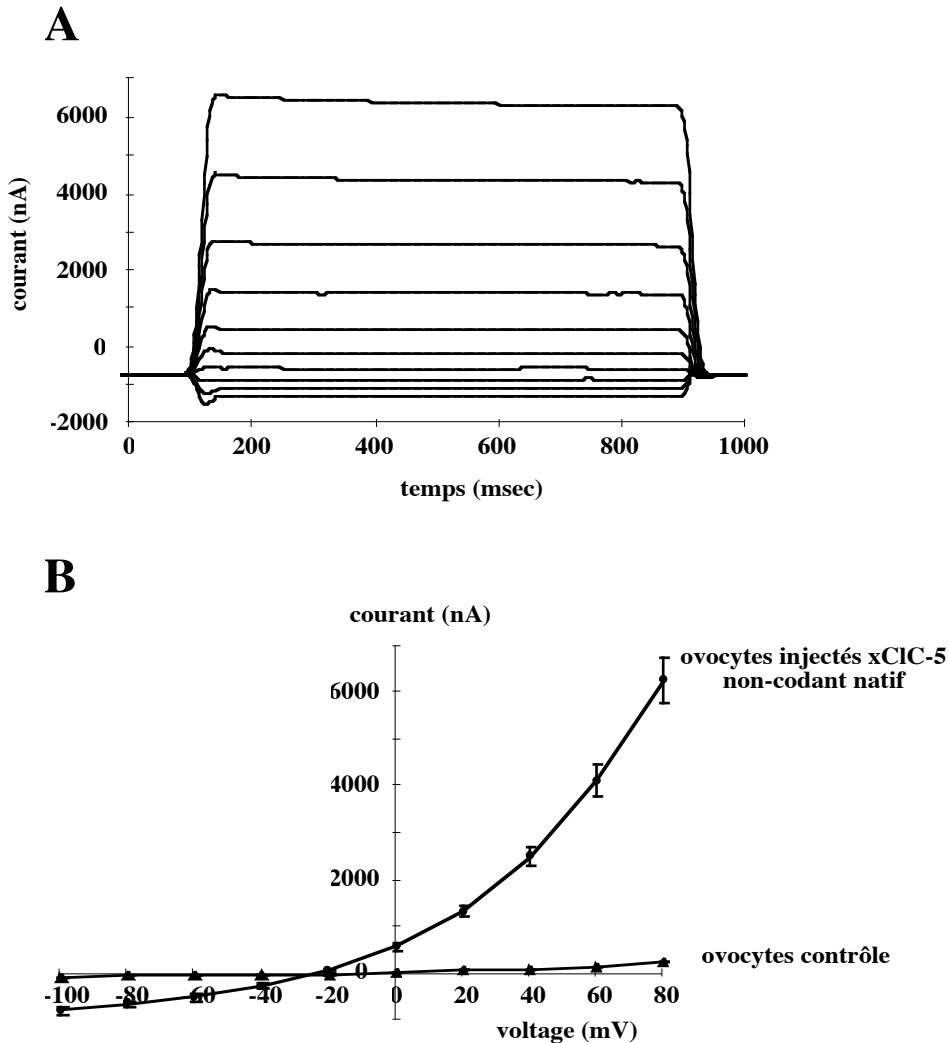


Figure 26: Caractérisation électrophysiologique du courant I_{natif} exprimé dans l'ovocyte de xénope. A: tracés de courant représentatifs, enregistrés 4 jours après l'injection de 5 ng d'ARNc du xCIC-5, présentant les régions non-codantes natives. B: relations courant/voltage obtenues sur des ovocytes contrôle (n=13) et sur des ovocytes injectés avec les ARNc (n=29).

sortante: on parle de *outward rectifier*. Le coefficient de rectification, défini comme le rapport entre les courants mesurés à +60 mV et -100 mV ($I_{+60\text{mV}}/I_{-100\text{mV}}$), est de $5,19 \pm 0,31$ (n=58).

Le potentiel de repos des ovocytes injectés avec l'ADNc est dépolarisé (-23 ± 1 mV, n=29) par rapport à celui des ovocytes contrôles (-66 ± 6 mV, n=10). Le potentiel d'équilibre du chlorure se situe approximativement à -30 mV dans un grand nombre de cellules. L'ouverture d'une conductance chlorure dans ces cellules produit une dépolarisation du potentiel de membrane jusqu'au potentiel d'équilibre du chlorure. Nous avons voulu examiner la nature ionique de la conductance induite. Pour cela, j'ai réalisé des expériences de substitution ionique partielle et déterminé la sélectivité anionique. Les résultats ont été analysés de deux manières.

Dans un premier temps, les variations de potentiel de membrane consécutifs aux substitutions ont permis de déterminer la séquence des perméabilités des substituants relatives à celle des ions chlorure. La formule (1) a été utilisée pour le calcul des perméabilités relatives. La séquence des perméabilités, déterminée pour la conductance induite sur les ovocytes injectés avec l'ARNc est nitrate ($1,62 \pm 0,10$) > iodure ($1,44 \pm 0,07$) > bromure ($1,24 \pm 0,04$) > chlorure >> gluconate ($0,50 \pm 0,07$). Les rapports de perméabilité relatifs au chlorure sont indiqués entre parenthèses.

$$(1) \quad V_C - V_E = 58 \log \left(\frac{[X^-] P_X / P_{Cl} + [Cl^-]_E}{[Cl^-]_C} \right)$$

V_C : potentiel de membrane dans la solution contrôle (contenant les ions chlorure)

V_E : potentiel de membrane dans la solution de substitution (contenant le substituant)

$[Cl^-]_E$: concentration du chlorure dans la solution de substitution

$[Cl^-]_C$: concentration du chlorure dans la solution contrôle

$[X^-]$: concentration du substituant dans la solution de substitution

P_X : perméabilité au substituant

P_{Cl} : perméabilité au chlorure

Dans un deuxième temps, j'ai déterminé la séquence des conductivités relatives à celle aux ions chlorure en calculant le rapport des courants mesurés à +80 mV dans la solution de substitution et dans la solution contrôle (I_X/I_{Cl}). La séquence obtenue est iodure ($1,32 \pm 0,05$; n=14) > bromure ($1,13 \pm 0,01$; n=11) > nitrate ($1,11 \pm 0,02$; n=11) > chlorure >> gluconate ($0,58 \pm 0,06$; n=12).

La pharmacologie des conductances anioniques est très peu spécifique. Pour mieux caractériser la conductance induite dans les ovocytes injectés avec l'ARNc, j'ai testé l'effet de 13 substances pharmacologiques connues pour leur effet inhibiteur, en particulier sur des conductances anioniques (voir **Figure 20**).

L'effet des différents agents pharmacologiques a été testé 5 minutes après son ajout dans le milieu de perfusion de l'ovocyte, en mesurant les courants à -100 mV et à +80 mV en absence et en présence de l'agent pharmacologique. En outre, la réversibilité de l'effet a été déterminée

après avoir rincé l'ovocyte pendant 5 minutes. Le **Tableau 6** indique les concentrations utilisées et les pourcentages d'inhibition obtenus. Des inhibitions plus ou moins importantes ont pu être observées avec les différentes substances testées. Le tamoxifen, le riluzole, le vérapamil et l'acide niflumique sont restés sans effet. L'effet inhibiteur observé est généralement dépendant du voltage: seuls les courants sortants sont affectés (**Figure 27 A, B, C**), mis à part pour l'inhibition par le lanthane qui touche également les courants entrants (**Figure 27 D, E, F**). Les effets inhibiteurs obtenus avec le DIDS, l'oxonol, le gossypol et le lanthane présentaient moins de 30% de réversibilité après 15 minutes de rinçage.

J'ai également examiné la sensibilité du courant induit à un choc hypo-osmotique. Aucune variation significative du courant n'a pu être observée après 30 minutes de perfusion avec le milieu HYPO 70, par rapport au courant enregistré en ISO 70 (résultat non illustré).

Enfin, la sensibilité au calcium libre intracellulaire (Ca^{2+}) a été déterminée en utilisant la ionomycine, ionophore calcique, qui perméabilise la membrane au Ca^{2+} extracellulaire et produit ainsi une entrée massive de calcium dans la cellule. L'application de $1\mu\text{M}$ de ionomycine, sur des ovocytes contrôle, active un courant chlorure dépendant du calcium ($I_{\text{Cl, Ca}}$) endogène (Miledi and Parker, 1984). L'apparition de ce courant est immédiate (< 30 secondes), mais transitoire. Après trois minutes, le courant se stabilise à un niveau légèrement supérieur à celui enregistré avant l'application de la ionomycine (**Figure 28 A, B, C, D**). L'effet d'une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire a donc été déterminée 5 minutes après l'application de la ionomycine. En tenant compte de la contribution du courant endogène $I_{\text{Cl, Ca}}$, on a pu observer une inhibition de $45 \pm 7\%$ ($n=5$) du courant à $+80$ mV (**Figure 28 E**). L'effet inhibiteur de la ionomycine n'a pu être observé que pour les courants sortants.

La conductance anionique décrite ci-dessus a pu être observée dans 105 ovocytes sur les 240 ovocytes testés, soit 43% des ovocytes injectés avec l'ARNc du xCIC-5 (27 lots différents). De nombreux ovocytes injectés avec l'ARNc ont présenté des altérations morphologiques telles que la dépigmentation ou l'apparition d'une dépression au sommet de l'ovocyte. Ces ovocytes n'ont pas été pris en compte dans l'étude réalisée.

2.2. Injection de l'ARNc du xCIC-5 avec les régions non-codantes de la β -globine

Devant l'irrégularité de l'apparition de cette conductance nouvelle dans les ovocytes et la dégradation morphologique d'un grand nombre d'ovocytes, nous avons choisi d'utiliser une construction plasmidique différente pour réaliser la transcription *in vitro*. La modification majeure est intervenue au niveau des parties non-codantes. Les parties non-codantes natives ont été remplacées par celles de la β -globine du xénope (Krieg and Melton, 1984) et une séquence consensus Kozak (Kozak, 1991) a été introduite en amont de l'ATG initiateur de la traduction. Ce type de construction plasmidique est connue pour favoriser l'expression d'une protéine dans

Agent inhibiteur	Concentration (μ M)	n	Effet inhibiteur à +80 mV (% \pm erreur standard)	Effet inhibiteur à -100 mV (% \pm erreur standard)
oxonol	10	9	-17.11 \pm 6.01	-6.73 \pm 11.56
kétoconazole	100	7	-24.35 \pm 2.29	17.98 \pm 15.82
tamoxifen	10	7	-0.13 \pm 1.8	12.43 \pm 6.77
riluzole	100	8	-0.21 \pm 3.75	2.66 \pm 5.85
vérapamil	100	5	-2.99 \pm 5.32	6.58 \pm 4.49
DIDS	500	5	-72.24 \pm 7.29	-31.86 \pm 8.1
DPC	500	6	-21.78 \pm 3.14	5.26 \pm 6.91
NBBP	50	4	-76.43 \pm 0.6	-4.99 \pm 4.71
AMPc	5000	9	-49.7 \pm 2.09	-7.08 \pm 6.33
acide niflumique	50	7	-2.28 \pm 5.66	7.47 \pm 6.65
9-AC	1 000	5	-59.72 \pm 7.24	-18.9 \pm 18.75
lanthane	5 000	4	-89.86 \pm 4.6	-92.15 \pm 3.93
gossypol	10	4	-11.44 \pm 9.18	11.94 \pm 10.95

Tableau 6: Effet des différents inhibiteurs des courants anioniques sur le courant I_{natif} . Les ovocytes de xénope ont été injectés avec 5 ng d'ARNc du xClC-5, présentant les régions non-codantes natives, quatre jours avant l'expérimentation. Les effets des inhibiteurs ont été déterminés à -100mV et +80 mV, 5 minutes après l'ajout de la substance dans la perfusion. n correspond au nombre d'ovocytes testés.

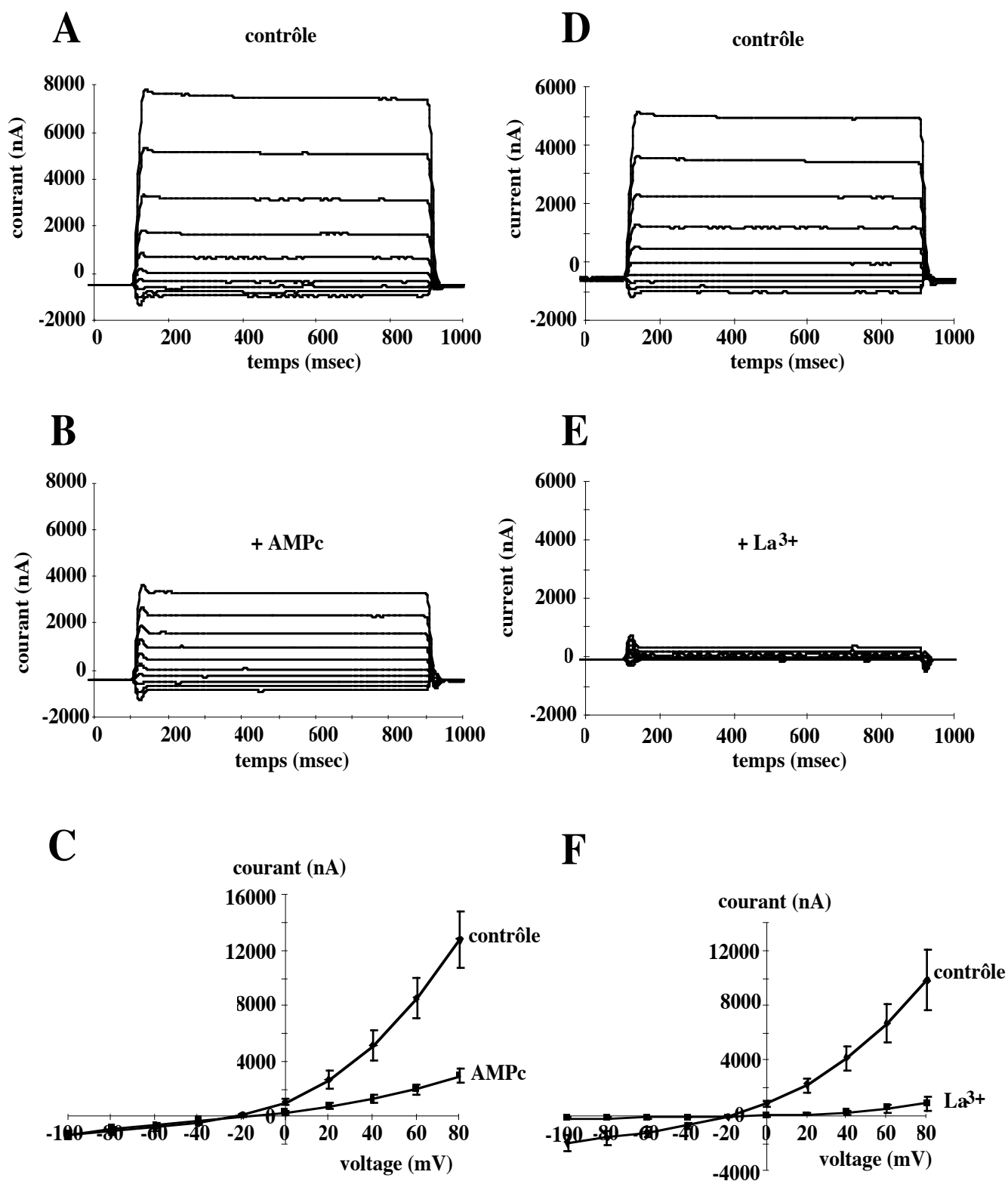


Figure 27: Mise en évidence des effets inhibiteurs de l'AMPc et des ions La^{3+} sur le courant I_{natif} . Tracés de courant représentatifs, enregistrés sur des ovocytes injectés depuis 4 jours avec 5 ng d'ARNc du xCIC-5 (régions non-codantes natives). A et D sont les enregistrements contrôle réalisés avant de perfuser l'ovocyte avec les inhibiteurs. En B, l'ovocyte a été perfusé 5 minutes avec 5 mM d'AMPc, et en E, un autre ovocyte a été perfusé avec 5 mM de lanthane (La^{3+}). Les relations courant/voltage correspondant à ces expériences sont données en C ($n=8$) et F ($n=4$).

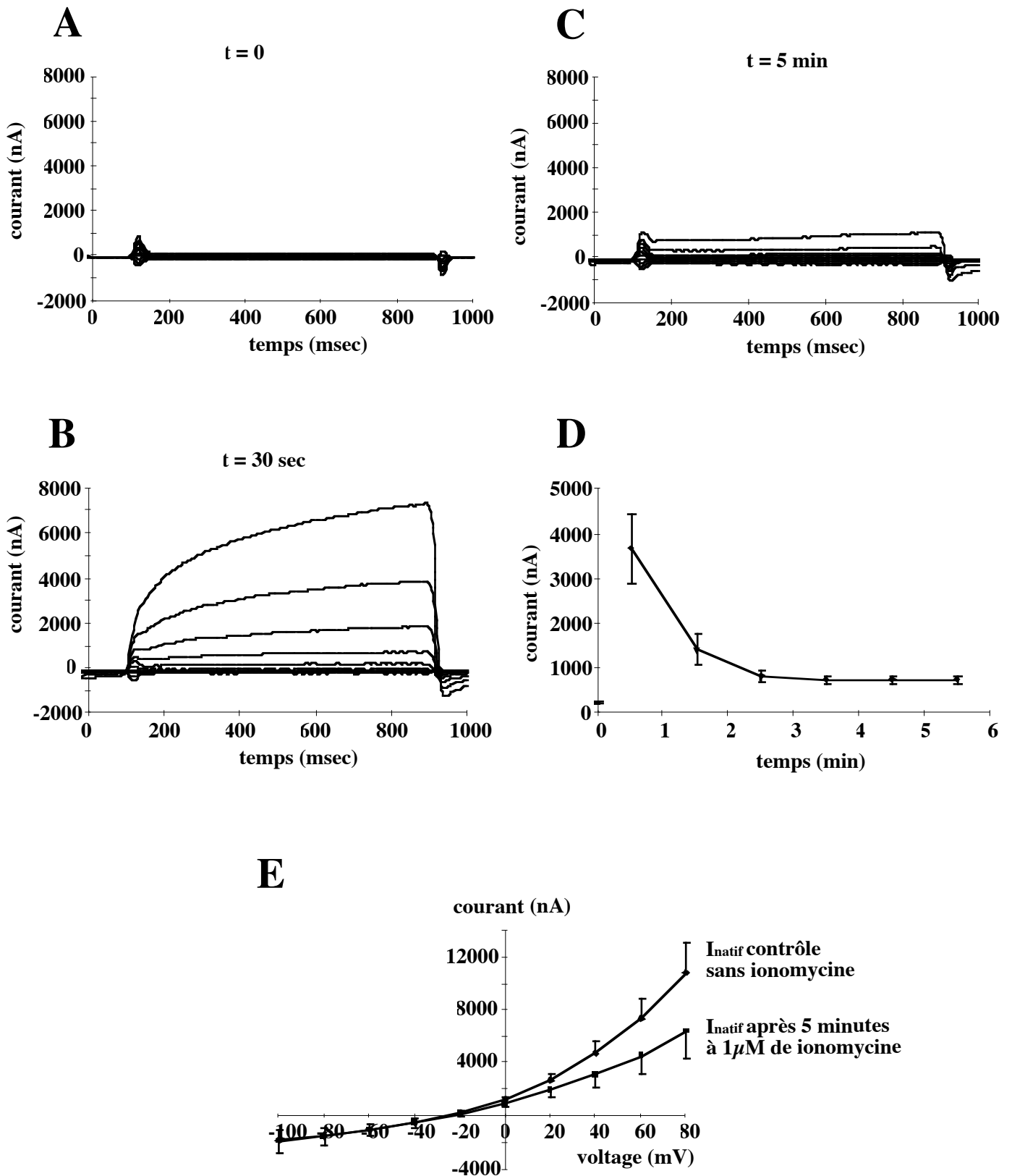


Figure 28: Mise en évidence du courant chlorure stimulé par le calcium, endogène à l'ovocyte de xénope et de l'effet de la ionomycine sur le courant I_{natif} . L'effet de $1 \mu\text{M}$ de ionomycine sur le courant enregistré sur des ovocytes contrôle est illustré après 30 secondes (B) et après 5 minutes (C) par rapport au courant initial (à $t=0$, avant l'application de la ionomycine) (A). La conductance au chlorure, endogène à l'ovocyte, I_{CaCl} , s'ouvre rapidement puis s'inactive avec le temps pour se stabiliser environ 2,5 minutes plus tard (D). Les courants en D sont ceux enregistrés pour un potentiel de clamp de +80 mV. L'effet inhibiteur de $1 \mu\text{M}$ de ionomycine sur le courant I_{natif} est illustré 5 minutes après l'application de l'inhibiteur ($n=5$) (E).

l'ovocyte de xénope (Lorenz et al., 1996). Les ARNc obtenus avec cette construction plasmidique sont notés ARNc (β) xCIC-5.

Les ovocytes injectés avec 15 ng d'ARNc (β) xCIC-5 ne présentent aucun signe d'altération morphologique dans les 9 jours qui suivent l'injection. Dans 95% de ces ovocytes (329 sur 346 ovocytes de 10 lots différents), on a pu enregistrer des courants sortants significativement supérieurs à ceux des ovocytes contrôle. L'amplitude des courants enregistrés à +80 mV a pu être corrélée avec le temps après l'injection et avec la quantité d'ARNc (β) xCIC-5 injecté (**Figure 29**). La courbe I/V de la conductance montre une rectification sortante (*outward rectifier*) très prononcée (**Figure 30**). Du fait de l'absence d'augmentation des courants entrants le coefficient de rectification $I_{+60\text{mV}}/I_{-100\text{mV}}$ est de $13,40 \pm 0,76$ (n=77), ce qui est 2,6 fois supérieur au coefficient de la conductance obtenue en injectant les ARNc possédants les régions non-codantes natives.

Dans la gamme des voltages négatifs, la conductance induite par l'injection des ARNc (β) xCIC-5 ne diffère pas significativement de la conductance des ovocytes contrôle. Les ovocytes injectés avec les ARNc (β) xCIC-5 possèdent un potentiel de repos de $-48,1 \pm 2,4$ mV (n=18), ce qui est peu différent des ovocytes contrôle. Curieusement, la conductance induite apparaît donc silencieuse dans la gamme des potentiels de membrane physiologiques. De ce fait, le potentiel de membrane n'était quasiment pas affecté lors des expériences de substitution du chlorure. Ainsi, la séquence des perméabilités relatives n'a pas pu être déterminée. Par contre, la séquence des conductivités relatives au chlorure (I_X/I_{Cl} , données entre parenthèses), à +80 mV, est nitrate ($1,28 \pm 0,04$; n=9) > bromure ($1,06 \pm 0,02$; n=9) > chlorure > iode ($0,77 \pm 0,04$; n=9) >> gluconate ($0,42 \pm 0,04$; n=9).

Ensuite, j'ai testé la même série d'agents pharmacologiques que précédemment pour caractériser le comportement de la conductance induite. Dans la gamme des voltages étudiés, (de -100 mV à +80 mV) les courants sont apparus totalement insensibles à l'application des différentes substances pharmacologiques (aux concentrations utilisées précédemment). La perfusion avec la solution hypo-osmotique, ainsi que l'application de la ionomycine sont également restées sans effet sur la conductance étudiée. Après l'application de 1 μ M de ionomycine, on assiste à une augmentation transitoire du courant (correspondant à l'activation de la conductance endogène $I_{\text{Cl, Ca}}$), puis à une stabilisation du courant à une valeur légèrement supérieure à la valeur initiale, comme dans les ovocytes contrôle (**Figure 31**).

La modification des régions non-codantes des ARNc utilisés pour l'injection des ovocytes s'est donc traduite par l'apparition de courants présentant des caractéristiques électrophysiologiques et pharmacologiques différentes. Ceci suggère que deux conductances distinctes ont été étudiées. Il est donc probable qu'au moins une des deux ne correspond pas au canal formé par la protéine xCIC-5, mais à un canal endogène à l'ovocyte.

2.3. Etude comparative du $I_{Cl\text{ swell}}$

Les caractéristiques de la conductance obtenue en injectant les ARNc du xCIC-5 présentant les régions non-codantes natives sont similaires à celles décrites pour un courant endogène à l'ovocyte, appelé $I_{Cl\text{ swell}}$. Ce courant est activé par un choc hypo-osmotique sur des ovocytes n'ayant pas été défolliculés enzymatiquement à la collagénase (cas des ovocytes injectés avec les différents ARNc, rapportés dans les chapitres précédents), mais manuellement avec des pinces (Ackerman et al., 1994). Les ovocytes ayant subi ce type de traitement manuel possèdent des cellules folliculaires résiduelles, accolées à leur membrane plasmique par des jonctions de type *gap*. La présence des cellules folliculaires et la fonctionnalité des jonctions *gap* ont été impliqués dans l'apparition de ce courant (Ackerman et al., 1994; Arellano and Miledi, 1995). Le $I_{Cl\text{ swell}}$ n'est jamais observé sur des ovocytes défolliculés enzymatiquement à la collagénase.

Le $I_{Cl\text{ swell}}$ est un courant chlorure de type *outward rectifier*, inhibé par les nucléotides extracellulaires et dont la séquence des conductivités relatives au chlorure est iodure > bromure > nitrate > chlorure >> gluconate (Ackerman et al., 1994). J'ai donc menée une étude sur le $I_{Cl\text{ swell}}$, afin de dresser un tableau comparatif de ses caractéristiques par rapport aux caractéristiques des conductances obtenues par injection des différents ARNc.

Pour induire le $I_{Cl\text{ swell}}$, les ovocytes sont défolliculés manuellement et perfusés avec un milieu hypo-osmotique. Après 5 à 10 minutes de perfusion, on assiste à une dépolarisation du potentiel de membrane de 28 ± 2 mV et sa stabilisation à -23 ± 1 mV (n=22). Cette dépolarisation traduit l'ouverture de la conductance chlorure activée par le choc hypo-osmotique. Les tracés de courant enregistrés en appliquant le protocole de voltage-clamp montrent une légère inactivation des courants avec le temps (**Figure 32 A**). La courbe I/V de cette conductance montre une rectification sortante peu prononcée (**Figure 32 B**). Le coefficient de rectification du $I_{Cl\text{ swell}}$ n'est que de $2,49 \pm 0,08$ (n=34). Le profil pharmacologique du $I_{Cl\text{ swell}}$ est similaire à celui de la conductance observée dans les ovocytes injectés avec l'ARNc du xCIC-5 présentant les régions non-codantes natives. Tous les agents pharmacologiques testés inhibent le $I_{Cl\text{ swell}}$, sauf le tamoxifen, le riluzole, le vérapamil et l'acide niflumique (**Tableau 7**). Par contre, dans le cas du $I_{Cl\text{ swell}}$, les inhibitions affectent les courants entrants et sortants. L'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire, provoqué par l'application de la ionomycine, n'a pas d'effet sur le $I_{Cl\text{ swell}}$, comme précédemment montré par Ackerman et al. (1994).

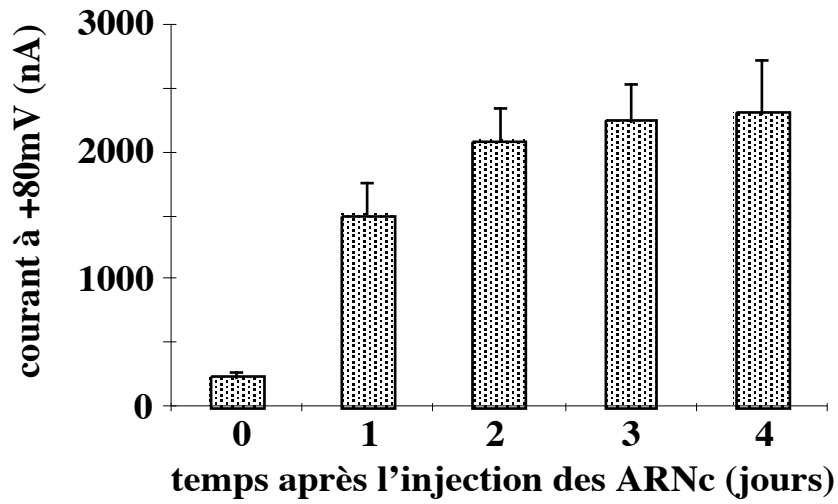
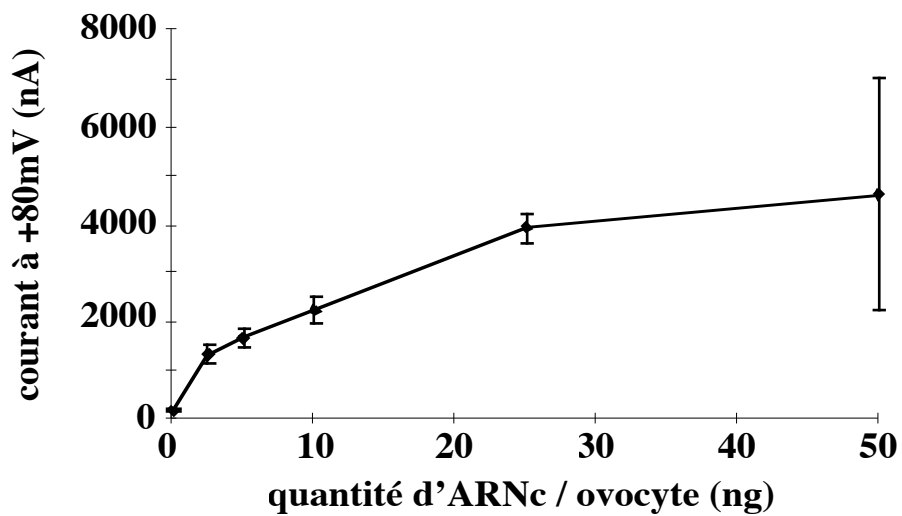
A**B**

Figure 29: Corrélations entre l'amplitude du courant $I_{\beta\text{-globine}}$ et le temps après l'injection des ARNc (A) ou la quantité d'ARNc injectée (B). Illustration de l'augmentation du courant $I_{\beta\text{-globine}}$ mesuré à +80 mV en fonction du temps passé depuis l'injection (A) et en fonction de la quantité d'ARNc injectés (mesuré 3 jours après l'injection) (B).

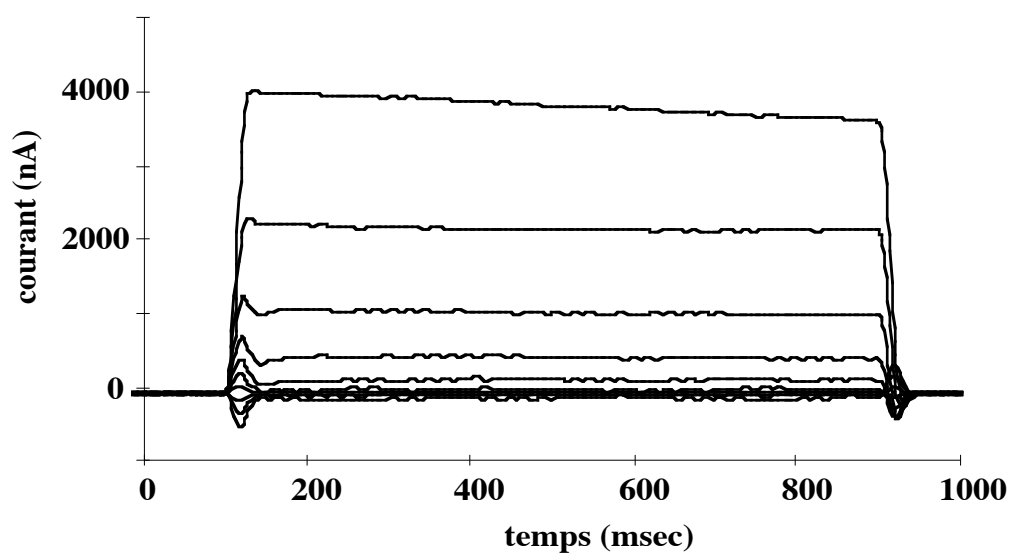
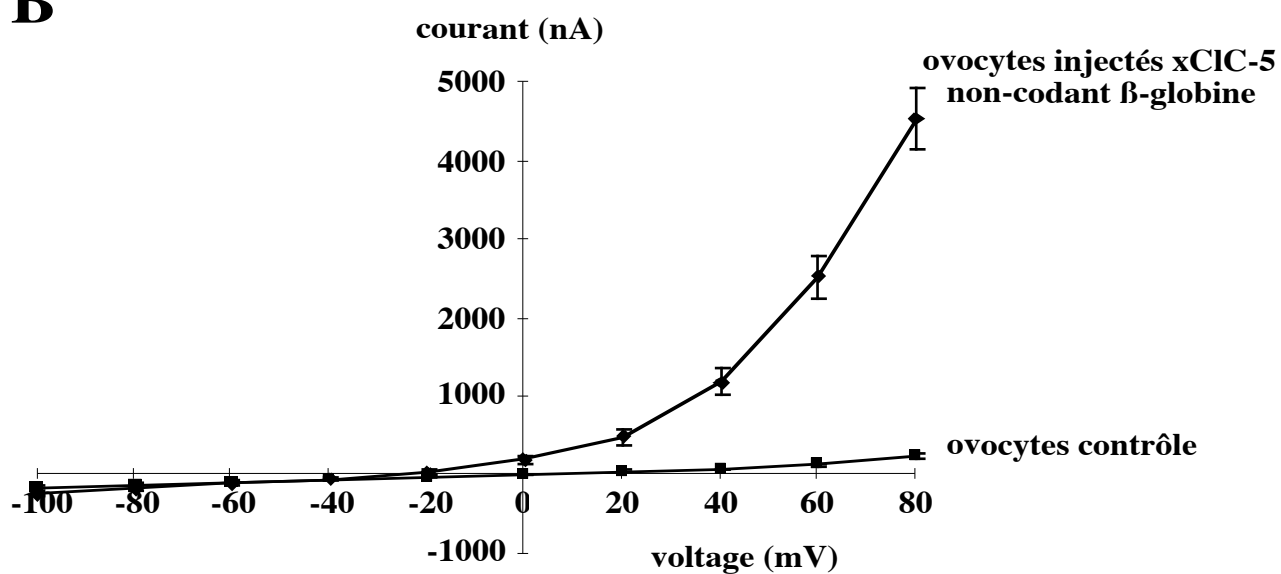
A**B**

Figure 30: Caractérisation électrophysiologique du courant $I_{\beta\text{-globine}}$ exprimé dans l'ovocyte de xénope. A: tracés de courant représentatifs, enregistrés 3 jours après l'injection de 15 ng d'ARNc du xCIC-5, présentant les régions non-codantes de la β -globine de *Xenopus*. B: relations courant/voltage obtenues sur des ovocytes contrôle (n=17) et sur des ovocytes injectés avec les ARNc (n=21).

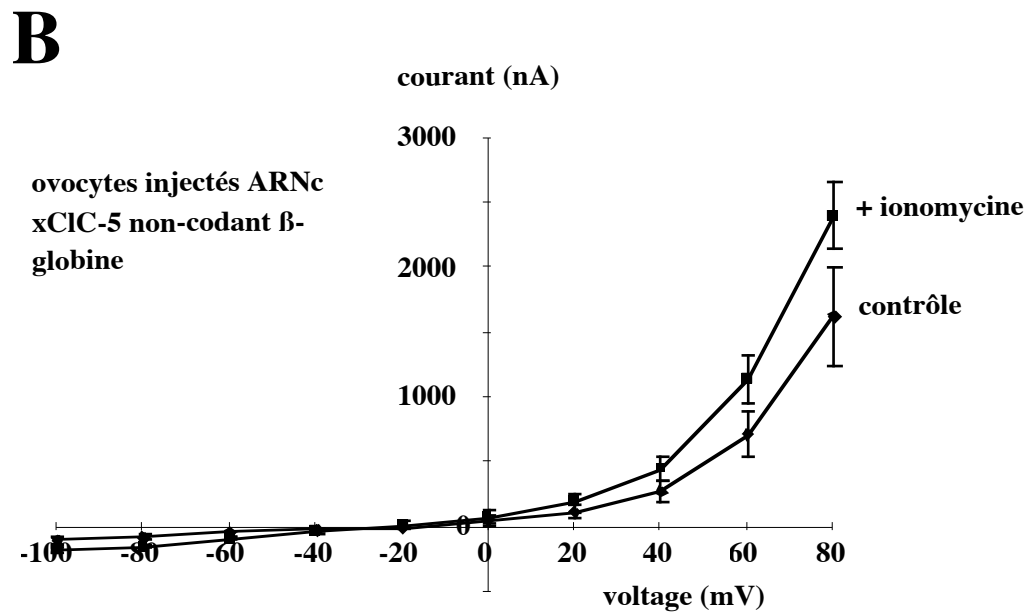
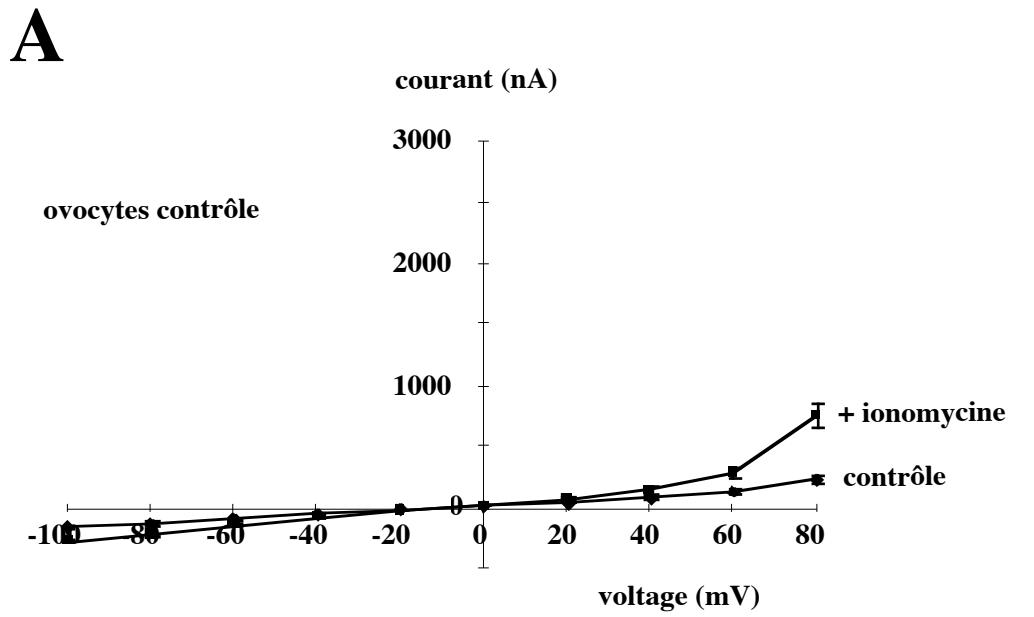


Figure 31: Effet du calcium sur le courant $I_{\beta\text{-globine}}$. Relations courant/voltage obtenues sur des ovocytes contrôle (A, n=5) et des ovocytes injectés avec 15 ng d'ARNc du xCIC-5 (régions non-codantes de la β -globine) (B, n=4) avant et 5 minutes après l'ajout de 1 μM d'ionomycine dans la perfusion.

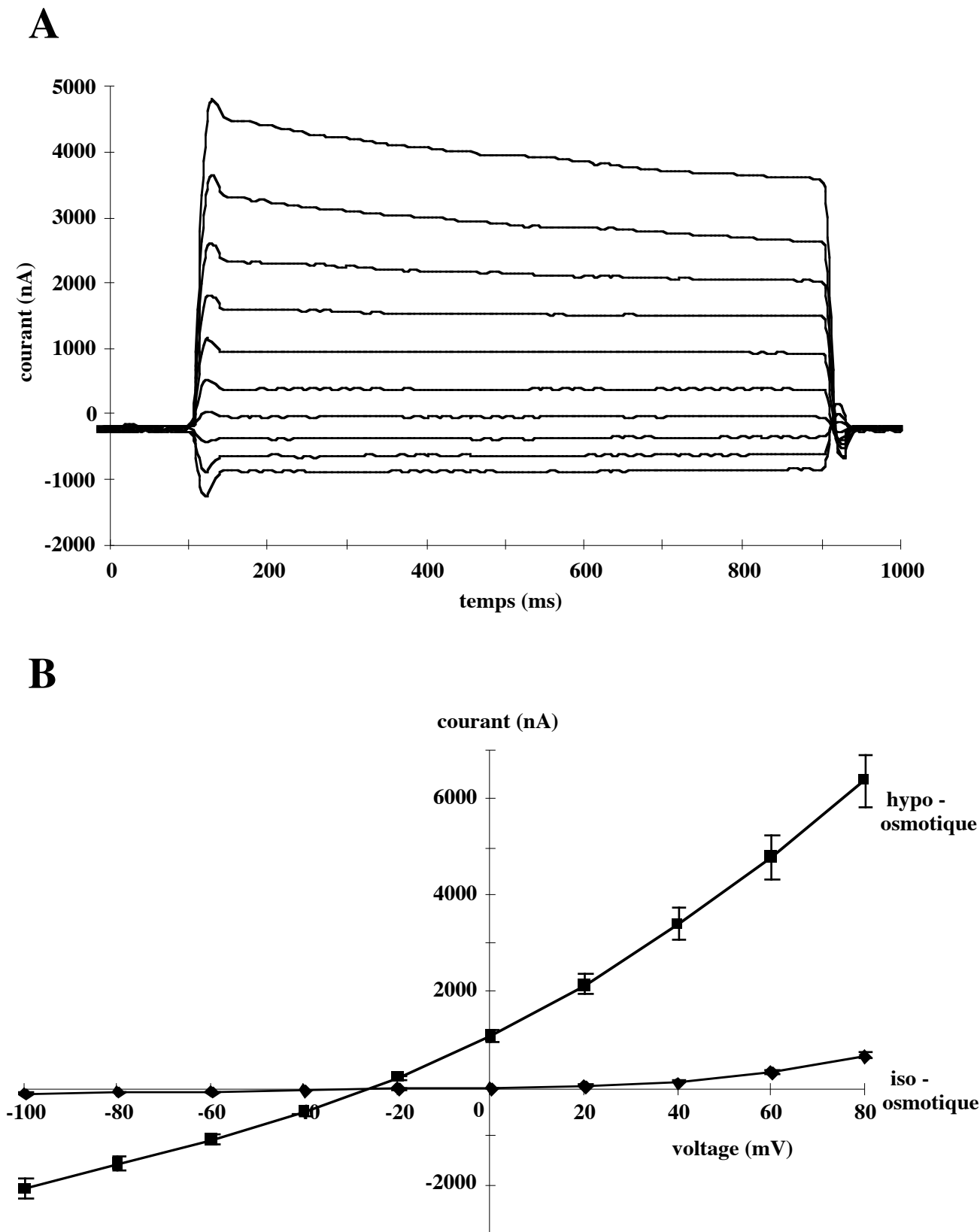


Figure 32: Caractérisation électrophysiologique du courant $I_{Cl^{swell}}$ de l'ovocyte de xénope. A: tracés de courant représentatifs enregistrés sur des ovocytes défolliculés manuellement et perfusés pendant 30 minutes avec la solution HYPO 70. Les courants s'inactivent avec le temps pour les voltages positifs. B: courbes courant/voltage ($n=22$) obtenues sur des ovocytes défolliculés manuellement en milieu ISO 70 (iso-osmotique) et après 30 minutes de perfusion avec le milieu HYPO 70 (hypo-osmotique).

Agent inhibiteur	Concentration (μM)	n	Effet inhibiteur à +80 mV (% \pm erreur standard)	Effet inhibiteur à -100 mV (% \pm erreur standard)
oxonol	10	6	-32.3 \pm 1.92	-45.8 \pm 3.64
kétoconazole	100	6	-17.63 \pm 2.1	-17.63 \pm 4.41
tamoxifen	10	5	-2.07 \pm 2.67	2.14 \pm 6.09
riluzole	100	6	-3.45 \pm 3.13	-7.03 \pm 2.87
vérapamil	100	5	-12.72 \pm 3.8	-3.77 \pm 2.53
DIDS	500	5	-50.97 \pm 4.81	-26.74 \pm 3.69
DPC	500	6	-21.8 \pm 2.51	-19.47 \pm 8.22
NBBP	50	5	-53.3 \pm 2.41	-43.94 \pm 2.6
AMPc	5000	7	-48.3 \pm 5.3	-62.67 \pm 11.69
acide niflumique	50	5	-5.24 \pm 3.51	1.22 \pm 4.17
9-AC	1000	4	-51.84 \pm 3.42	-48.66 \pm 2.14
lanthane	5000	3	-87.05 \pm 1.28	-91.93 \pm 1.28
gossypol	10	6	-57.25 \pm 7.49	-56.11 \pm 15.13

Tableau 7: Effet des différents inhibiteurs des courants anioniques sur le courant $I_{Cl\text{ swell}}$. Les ovocytes de xénope ont été défolliculés manuellement et exposés au milieu HYPO 70 pendant 30 minutes. Les effets des inhibiteurs ont été déterminés à -100mV et +80 mV, 5 minutes après l'ajout de la substance dans la perfusion. n correspond au nombre d'ovocytes testés.

Le **Tableau 8** résume l'étude comparative des caractéristiques des trois conductances mises en évidence:

- i) I_{natif} , la conductance observée sur les ovocytes injectés avec les ARNc présentant les régions non-codantes natives,
- ii) $I_{\beta\text{-globine}}$, la conductance observée sur les ovocytes injectés avec les ARNc présentant les régions non-codantes de la β -globine et le site consensus Kozak,
- iii) $I_{\text{Cl swell}}$, la conductance chlorure endogène à l'ovocyte défolliculé manuellement et induite par un choc hypo-osmotique.

Le $I_{\text{Cl swell}}$ est très différent de $I_{\beta\text{-globine}}$ et se distingue également de I_{natif} au niveau du score de rectification, de l'inactivation avec le temps et de la sensibilité à la ionomycine. De plus, seul les courants sortants du I_{natif} sont sensibles aux agents pharmacologiques alors que dans le cas du $I_{\text{Cl swell}}$ l'inhibition touche les courants sortants et entrants. En conclusion, ni I_{natif} , ni $I_{\beta\text{-globine}}$ ne correspondent à $I_{\text{Cl swell}}$.

2.4. Traduction *in vitro* des constructions plasmidiques

Etant donné que l'injection des ARNc du xCIC-5, obtenus par transcription *in vitro* de deux constructions plasmidiques différentes, induit des conductances chlorure distinctes, il est apparu nécessaire de contrôler la synthèse de la protéine xCIC-5. En attendant la disponibilité d'anticorps dirigés contre le xCIC-5, nous avons commencé par étudier la traduction *in vitro* du xCIC-5 à partir des deux constructions plasmidiques utilisées.

Deux types d'expérience ont été réalisées: i) la transcription de l'ADNc, couplée directement à la traduction de l'ARNc obtenu et ii) la traduction des ARNc, préalablement transcrits *in vitro*. La traduction réalisée à partir des ADNc permet d'apprécier le rendement de la traduction de la protéine à partir de quantités égales d'ADNc. La traduction réalisée directement à partir de quantités équivalentes d'ARNc, permet de déterminer si le défaut de traduction de la protéine est lié à un défaut de transcription.

Les résultats obtenus sont illustrés sur la **Figure 33**. Avec 0,3 μg d'ADNc, comme avec 1 μg d'ARNc, de la construction contenant les régions non-codantes de la β -globine, on observe un produit de traduction migrant avec une masse moléculaire apparente proche de la masse moléculaire théorique du xCIC-5, c'est à dire 90 kDa. Avec les mêmes quantités d'ADNc ou d'ARNc de la construction contenant les régions non-codantes natives, aucun produit de traduction n'est détecté. En utilisant des quantités supérieures d'ADNc (0,5 μg , quantités identiques vérifiées sur un même gel), j'ai pu finalement détecter un signal faible à environ 90 kDa. Nous avons conclu que la construction plasmidique contenant les régions non-codantes natives permet la transcription *in vitro* de l'ADNc en ARNc, mais que ces ARNc ne sont que difficilement traduits en protéine. En revanche, la construction contenant les régions non-

codantes de la β -globine autorise la traduction de la protéine xCIC-5, dont la masse moléculaire est de 90 kDa comme attendu.

2.5. Immunodétection du xCIC-5 dans l'ovocyte de xénope

Par la suite, nous avons fait développer, par deux lapins (lapins 62 et 63), des anticorps dirigés contre les 16 derniers acides aminés de l'extrémité C-terminale du xCIC-5 (HIAQMANQDPDSILFN). J'ai purifié les IgG totaux des sérums obtenus (SF62 et SF63), par une précipitation à l'acide caprylique, puis les IgG spécifiques du peptide C-terminal par une chromatographie d'affinité. Les IgG retenus par le peptide, fixé sur une colonne de sépharose, sont élués par le passage d'un volume de HCl 0,1N. Nous avons obtenus les 4 lots d'anticorps suivants:

<u>IgG totaux:</u>	<u>IgG spécifiques:</u>
* IgG SF 62	* HCl SF 62
* IgG SF 63	* HCl SF 63

Les IgG totaux et les IgG purifiés sur colonne d'affinité des deux lapins ont donné sensiblement les mêmes résultats. La plupart des expériences ont été réalisées avec le lot IgG SF 62.

Nous avons utilisé les anticorps anti-xCIC-5 pour déterminer si la protéine xCIC-5 est synthétisée dans l'ovocyte. L'immunodétection a été réalisée par Western blot sur des ovocytes contrôle et injectés avec les deux types d'ARNc du xCIC-5. D'abord, les protéines membranaires (toutes membranes confondues) sont séparées des protéines cytosoliques par ultracentrifugation après avoir été homogénéisé dans un tampon dépourvu de détergent ionique (comme par exemple le sodium dodecyl sulfate, SDS), afin d'éviter leur solubilisation. Puis, 15 μ g de protéines membranaires sont séparées selon leur masse moléculaire sur gel SDS-PAGE (*SDS - polyacrylamide gel electrophoresis*) et transférées sur membrane de nitrocellulose. Après 2 heures d'incubation avec les anticorps dilués au 1/1500^e, on détecte un signal uniquement dans les ovocytes injectés avec les ARNc présentant les régions non-codantes de la β -globine (**Figure 34 A**, piste b). Le signal est composé de bandes dont les masses moléculaires apparentes sont approximativement 85-100, 130 et 230 kDa. Ces bandes n'apparaissent ni sur les ovocytes contrôle (piste a), ni sur les ovocytes injectés avec l'ARNc présentant les régions non-codantes natives (piste c). Lorsque l'expérience est réalisée avec les IgG totaux des sérums pré-immuns ou bien avec des anticorps préincubés avec un excès du peptide C-terminal, aucun signal n'est observé (résultats non illustrés). Les bandes immunodétectées dans les ovocytes injectés avec les ARNc (β) xCIC-5 correspondent donc vraisemblablement à différentes formes de xCIC-5, traduit dans l'ovocyte à partir des ARNc injectés. Nous avons conclu de ces expériences que seuls les ARNc présentant les régions non-codantes de la β -globine permettent la synthèse de la protéine xCIC-5 lorsqu'ils sont injectés dans l'ovocyte de xénope. Les caractéristiques biochimiques des différentes formes de xCIC-5 immunodétectées restent à être déterminées. Des éléments de réponse seront apportées dans l'étude de la glycosylation du xCIC-5.

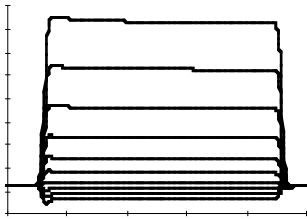
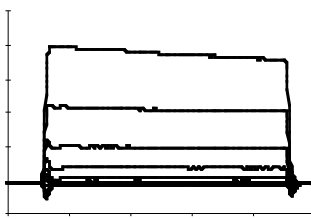
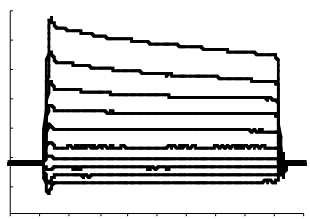
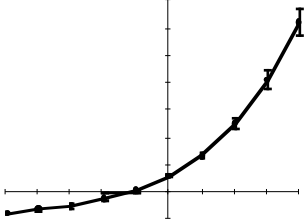
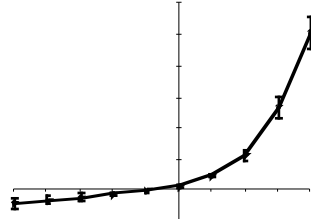
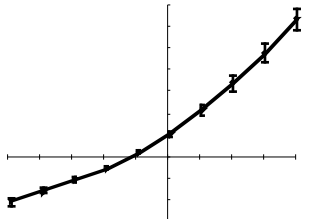
Courant	I natif	I β -globine	I Cl swell
Cinétiques			
Constante d'inactivation (ms)	380 ± 38	561 ± 39	628 ± 35
Courbes I/V			
Rectification	5.19 ± 0.31	13.40 ± 0.76	2.49 ± 0.08
Séquence de conductivité	$I^- > Br^- = NO_3^- > Cl^- \gg$ gluconate	$NO_3^- > Br^- > Cl^- > I^- \gg$ gluconate	$I^- > Br^- > NO_3^- > Cl^- \gg$ gluconate
Pharmacologie	inhibition	sans effet	inhibition
Ionomycine	inhibition	sans effet	sans effet
Sensibilité au choc hypo-osmotique	non	non	oui

Tableau 8: comparatif des caractéristiques des courants I natif, I β -globine et I Cl swell.

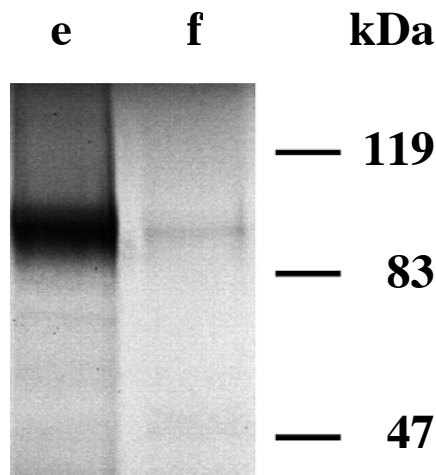
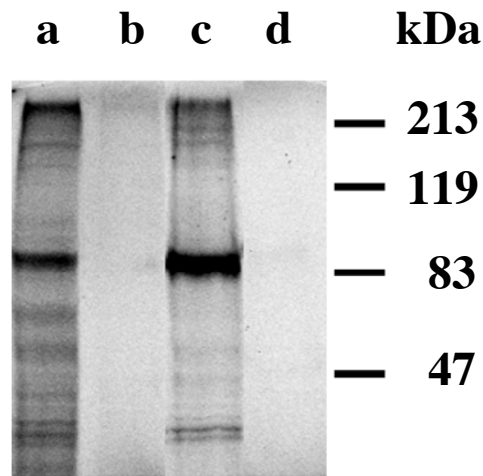


Figure 33: Traduction *in vitro* du xCIC-5 à partir des deux constructions plasmidiques utilisées. Le xCIC-5 est traduit lorsque la réaction est réalisée avec 1 μg d'ARNc (piste a) ou 0,3 μg d'ADNc (piste c) du xCIC-5 présentant les régions non-codantes de la β -globine, mais pas avec des quantités similaires d'ARNc (piste b) ou d'ADNc (piste d) du xCIC-5 présentant les régions non-codantes natives. Avec des quantités plus fortes (0,5 μg) d'ARNc du xCIC-5 présentant les régions non-codantes natives on a pu observer la traduction *in vitro* de la protéine xCIC-5 (piste f), mais à un niveau nettement plus faible qu'avec une quantité similaire d'ARNc présentant les régions non-codantes de la β -globine (piste e). La protéine xCIC-5 traduite *in vitro* migre environ à 90 kDa sur un gel dénaturant SDS-PAGE à 7,5% d'acrylamide.

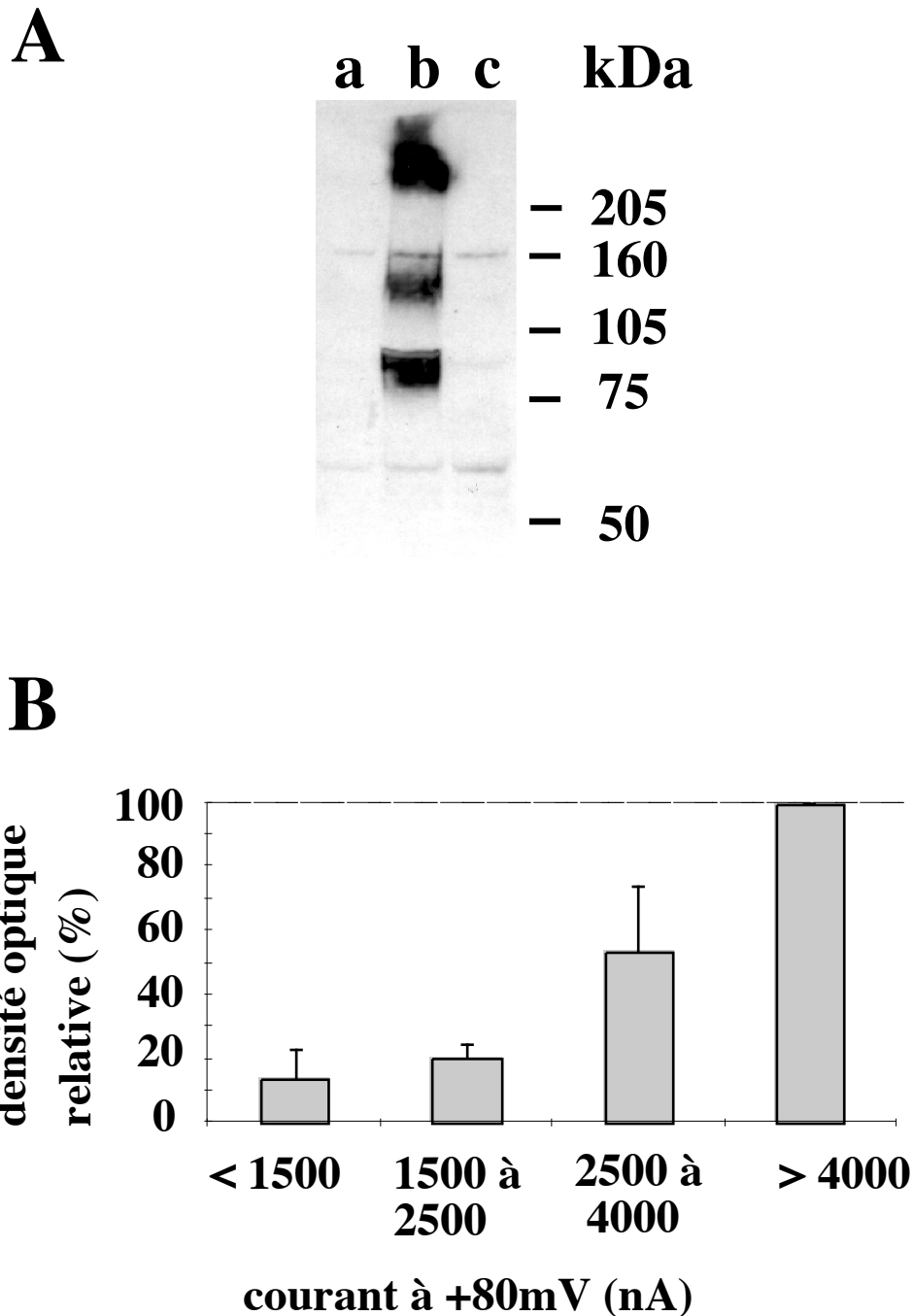


Figure 34: Mise en évidence de la synthèse protéique du xCIC-5 dans les ovocytes de xénope. A: 50 μ g de protéines des préparations membranaires d'ovocytes contrôle (piste a) et d'ovocytes injectés avec des ARNc du xCIC-5, présentant les régions non-codantes de la β -globine (piste b) ou les régions non-codantes natives (piste c) ont été séparés par SDS-PAGE (7,5% d'acrylamide) et testés avec un anticorps polyclonal dirigé contre le peptide C-terminal du xCIC-5. L'anticorps est utilisé dilué au 1/1500ème. Seul dans les ovocytes de la piste b on détecte un signal spécifique, qui correspond vraisemblablement à la protéine xCIC-5. B: corrélation du signal obtenu en Western blot avec des anticorps anti-xCIC-5 (1/1500ème) sur des ovocytes injectés avec les ARNc du xCIC-5, présentant les régions non-codantes de la β -globine, avec l'amplitude du courant I β -globine mesuré à +80 mV sur ces mêmes ovocytes. Les ovocytes ont été injectés avec des quantités variables (5-25 ng) d'ARNc, puis classés en groupes selon l'amplitude du courant mesuré. L'intensité du signal obtenu en Western blot pour chaque groupe d'ovocytes est quantifié par densitométrie et exprimé en valeurs relatives au signal le plus élevé (100) dans chaque expérience (n=3).

J'ai ensuite voulu déterminer s'il existait une corrélation entre la synthèse protéique du xClC-5 et l'amplitude des courants induits après l'injection des ARNc ($I_{\beta\text{-globine}}$). Pour cela j'ai injecté différentes quantités d'ARNc (présentant les régions non-codantes de la β -globine) de manière à obtenir différents niveaux de courant 4 jours après l'injection. L'amplitude des courants a été déterminée à +80 mV et les ovocytes classées dans les tranches de courant suivantes:

- * $I_{\beta\text{-globine}} < 1500 \text{ nA}$
- * $1500 \text{ nA} < I_{\beta\text{-globine}} < 2500 \text{ nA}$
- * $2500 \text{ nA} < I_{\beta\text{-globine}} < 4000 \text{ nA}$
- * $4000 \text{ nA} < I_{\beta\text{-globine}}$

Le Western blot a ensuite été réalisé sur un même nombre d'ovocytes appartenant aux différentes tranches de courant. Les densités relatives des signaux immunodétectés ont été numérisés pour chaque groupe d'ovocytes. La **Figure 34 B** montre que le signal révélé en Western blot, traduisant la synthèse protéique du xClC-5, augmente avec l'amplitude du courant mesuré sur les ovocytes.

2.6. Discussion

L'injection de deux ARNc du xClC-5, se distinguant uniquement par leurs régions non-codantes, a donné lieu à l'apparition de deux conductances anioniques de caractéristiques électrophysiologiques et pharmacologiques différentes. Les régions non-codantes des ARNc peuvent intervenir sur le niveau de traduction de la protéine (Piechaczyk et al., 1984), mais à priori pas sur leur mode de fonctionnement. Ceci suggère que deux conductances distinctes, correspondant à deux transporteurs distincts, ont été étudiées et il est probable qu'au moins une des deux conductances, I_{natif} ou $I_{\beta\text{-globine}}$, correspond à une conductance endogène à l'ovocyte.

L'induction de courants endogènes à l'ovocyte, au cours d'expériences d'expression de protéines, n'est pas une observation isolée (Moorman et al., 1992; Attali et al., 1993; Tzounopoulos et al., 1995). En 1997, Buyse et al. décrivent l'induction d'un courant, appelé I_{ClIn} , au cours de leurs tentatives d'expression de deux protéines structurellement très différentes, le ClC-6 humain et le pClIn humain. Le mécanisme par lequel les ARNc injectés activent cette conductance reste inconnu. Le courant I_{ClIn} est proche du courant $I_{\text{Cl swell}}$, mais l'étude menée par Voets et al. (1996) a conduit à la distinction des deux courants endogènes. La conductance I_{natif} que nous décrivons possède des caractéristiques proches de celles du courant endogène à l'ovocyte décrit par Buyse et al. (1997). Notre étude détaillée du $I_{\text{Cl swell}}$ a confirmé qu'il existe de nombreuses similitudes avec I_{natif} , mais plusieurs caractéristiques permettent néanmoins de distinguer ces deux courants. Nous favorisons donc l'hypothèse selon laquelle I_{natif} correspond à une conductance chlorure endogène à l'ovocyte, de type I_{ClIn} , distincte de $I_{\text{Cl swell}}$.

Nos expériences de traduction *in vitro* ont montré que la traduction du xCIC-5 se fait difficilement à partir des ARNc présentant les régions non-codantes natives. De même, l'injection des ARNc présentant les régions non-codantes natives n'a pas donné lieu à la synthèse protéique du xCIC-5 dans l'ovocyte de xénope. Il apparaît donc que, *in vitro* et *in vivo*, la construction plasmidique présentant les régions non-codantes du xCIC-5 ne permet pas la synthèse protéique du xCIC-5 à un niveau détectable. Par conséquent, ces expériences appuient l'hypothèse selon laquelle la conductance I_{natif} correspond à l'activité d'un canal endogène à l'ovocyte et non à l'activité canal du xCIC-5.

Le remplacement des régions non-codantes natives par celles de la β -globine et l'introduction d'un site consensus Kozak s'est révélé bénéfique pour la synthèse *in vitro* et *in vivo* du xCIC-5. On obtient un produit de traduction *in vitro* de masse moléculaire correcte (environ 90 kDa). Dans l'ovocyte, l'injection des ARNc (β) xCIC-5 se traduit simultanément par l'apparition d'un signal spécifique en Western blot et par l'apparition d'un courant, $I_{\beta\text{-globine}}$, dont l'amplitude est corrélée à la synthèse de xCIC-5. Ces observations traduisent clairement qu'il existe un lien entre la protéine et la fonction apparue. Les caractéristiques électrophysiologiques et pharmacologiques du $I_{\beta\text{-globine}}$ sont en accord avec celles décrites pour le rCIC-5 par Steinmeyer et al. (1995) et ont été confirmées par Mo et al. (1999). L'ensemble de ces données est en faveur de l'hypothèse selon laquelle $I_{\beta\text{-globine}}$ correspond à l'activité canal du xCIC-5 surexprimé dans l'ovocyte de xénope (mais nous ne pouvons pas exclure la possibilité que le xCIC-5 joue le rôle de régulateur d'un canal chlorure endogène).

Chez l'homme, le CIC-5 a été impliqué dans diverses pathologies rénales (néphrolithiases). Plusieurs études ont été consacrées à la caractérisation des courants induits lors de l'expression de formes mutées de l'ADNc du CIC-5 (Lloyd et al., 1996; Lloyd et al., 1997; Friedrich et al., 1999). L'expression des protéines mutées s'est traduit par l'altération ou la perte de l'activité canal. Ce type d'observation représente généralement un argument fort pour attribuer la fonction canal à une protéine. De plus, la fonction canal a été clairement établie pour d'autres membres de la famille des CIC, par des expériences de reconstitution dans des bicouches artificielles ou par des études mutationnelles. Par analogie avec le CIC-5 humain, il semble donc peu probable que le courant observé à la suite de l'expression de la protéine xCIC-5 ($I_{\beta\text{-globine}}$) corresponde à un courant endogène, régulé par le xCIC-5, et non pas directement à l'activité canal du xCIC-5.

Actuellement, seul les résultats d'expression obtenus par Sakamoto et al. (1996) restent en désaccord avec les différentes études citées ci-dessus. D'après ces auteurs, l'expression du rCIC-5 dans la lignée cellulaire de mammifère CHO (*chinese hamster ovary*) a donné lieu à des courants similaires à I_{natif} . Il n'est pas clair si cette divergence est due à l'induction de courants endogènes ou bien à l'existence de facteurs de régulation distincts dans les deux systèmes d'expression (ovocytes de xénope et CHO). quoi qu'il en soit, l'expression du rCIC-5 dans les cellules de mammifère HEK 293 (Friedrich et al., 1999) a donné lieu à un courant dont les caractéristiques sont identiques à celles obtenues dans l'ovocyte de xénope.

En bref, nous avons établi que l'injection d'ARNc du xClC-5, présentant les parties non-codantes natives, ne donne pas lieu à une expression détectable de la protéine dans l'ovocyte de xénope. La conductance anionique induite, I_{natif} correspond à une conductance endogène à l'ovocyte, différente de la conductance endogène $I_{Cl\ swell}$. Par contre, la synthèse de la protéine xClC-5 est obtenue par injection d'ARNc, présentant les régions non-codantes de la β -globine et un site consensus Kozak. L'expression de la protéine se traduit par l'apparition d'une conductance anionique de type outward rectifier, insensible aux agents pharmacologiques classiquement utilisés pour caractériser les canaux chlorure. Cette conductance correspond à l'activité du canal xClC-5.

3. Identification des différentes glycoformes du xCIC-5

Le xCIC-5 possède trois sites potentiels de N-glycosylation. D'après le modèle topologique proposé, seul deux sites seraient localisés sur des boucles extracellulaires (Asn-169 et Asn-470). Nous avons voulu déterminer s'il existait différentes glycoformes du xCIC-5 parmi les bandes immunodétectées dans les ovocytes injectées avec les ARNc (β) xCIC-5.

3.1. Déglycosylation par traitement enzymatique

Deux types de traitements enzymatiques déglycosylants ont été utilisés:

i) Le traitement à l'endoglycosidase H clive les chaînes sucre riches en mannoses et permet d'identifier les formes immatures core-glycosylées, généralement localisées dans le réticulum endoplasmique (**Figure 35**). A la suite de ce traitement, seule la bande migrant à 85 kDa a vu sa mobilité électrophorétique changer. Désormais elle migre à une masse moléculaire apparente légèrement plus faible, à environ 82 kDa (**Figure 36 A**). Cette bande correspond donc vraisemblablement à une forme core-glycosylée.

ii) Le traitement par un mélange de N-glycosidase F et d'endoglycosidase F produit la coupure de la chaîne sucre entre l'asparagine et le premier résidu N-acétylglucosamine et permet d'identifier toutes les formes portant des N-glycanes. Ce traitement se traduit par le changement de la mobilité électrophorétique de toutes les bandes immunodétectées dans les ovocytes (**Figure 36 B**). Les bandes migrant (sans traitement enzymatique) à 85, 100 et 130 kDa, disparaissent (ou diminuent en intensité) au profit d'une bande au niveau de 80-85 kDa, dont l'intensité est plus forte comme s'il s'agissait du cumul des bandes disparues. La migration se fait donc à une masse moléculaire apparente légèrement inférieure à la masse théorique du xCIC-5. Le traitement enzymatique augmente également la mobilité de la bande migrant normalement à 230 kDa: elle apparaît maintenant à 210-215 kDa. Ainsi, toutes les formes immunodétectées apparaissent N-glycosylées.

3.2. Inhibition de la glycosylation par la tunicamycine

Une deuxième approche a été mise en œuvre pour étudier la N-glycosylation du xCIC-5. Nous avons utilisé la tunicamycine pour bloquer la machinerie de N-glycosylation de l'ovocyte de xénope (McDowell and Schwarz, 1988). Pour cela, les ARNc (β) xCIC-5 ont été co-injectés avec la tunicamycine dans les ovocytes. Puis, les ovocytes ont été maintenus dans un milieu contenant la tunicamycine pendant 4 jours avant d'être analysés. Deux types d'analyses successives ont alors été réalisées sur les ovocytes. Dans un premier temps, le courant à +80 mV

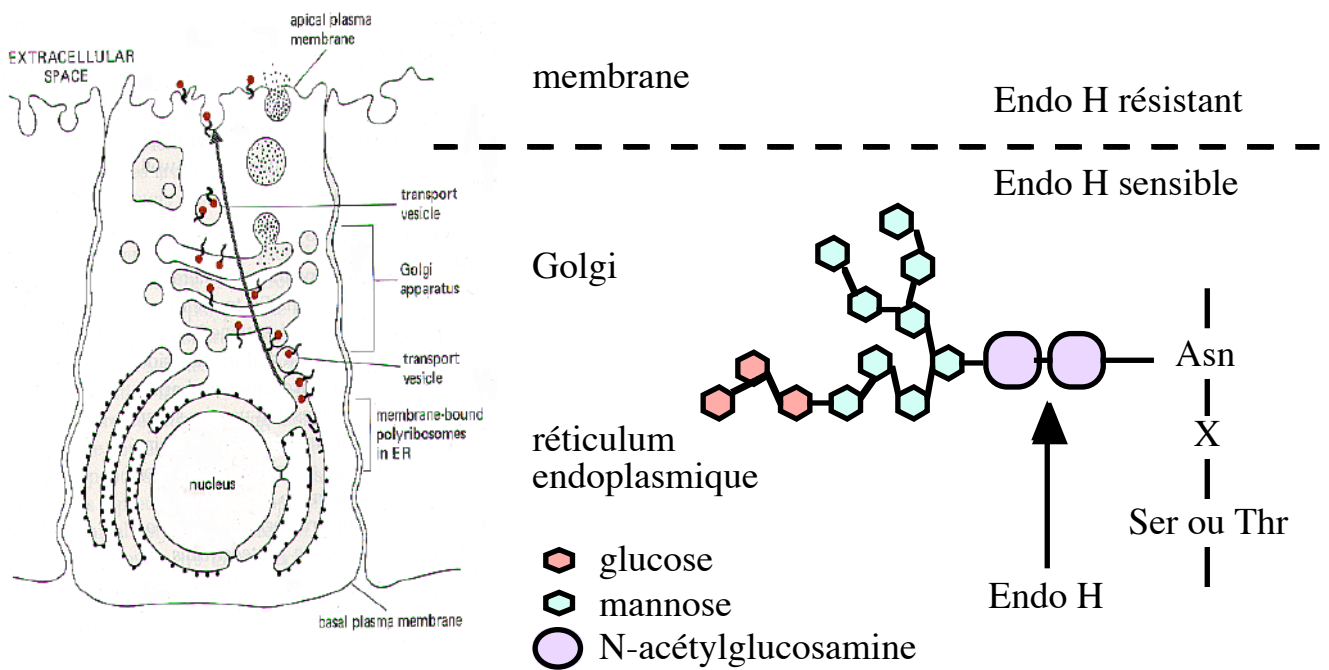


Figure 35: Localisation cellulaire des formes protéiques sensibles à l'endoglycosidase H. L'endoglycosidase H clive les groupements sucre riches en mannoses caractéristiques des protéines immatures, localisées entre le réticulum endoplasmique et le compartiment trans de l'appareil de Golgi. A partir du compartiment trans les protéines matures sont résistantes à l'endoglycosidase H.

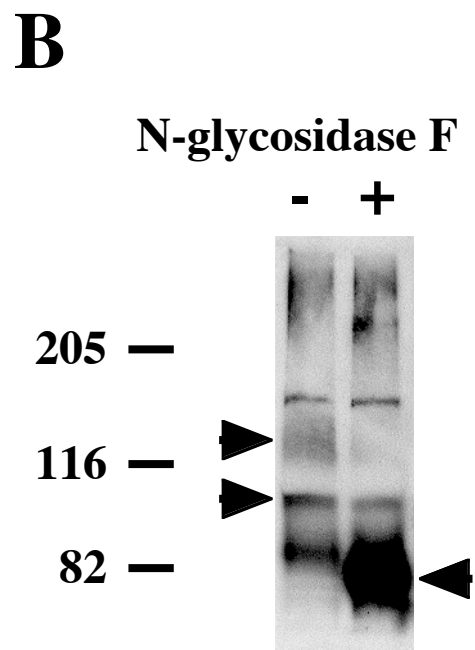
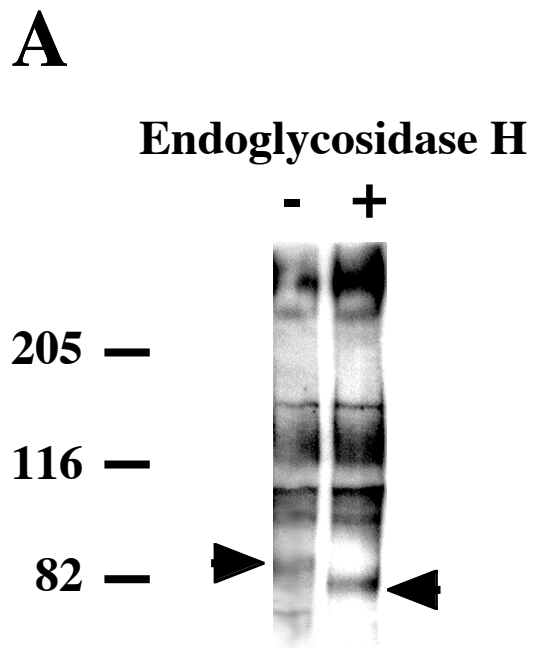


Figure 36: Mise en évidence des différentes formes N-glycosylées du xCIC-5 dans l'ovocyte de xénope. A: 100 μg de protéines d'ovocytes exprimant le xCIC-5 ont été soumis au traitement déglycosylant à l'endoglycosidase H, puis analysés par Western blot. Seule la bande de 85 kDa est affectée par le traitement. Elle migre désormais à 82 kDa (voir flèches). B: 100 μg de protéines d'ovocytes exprimant le xCIC-5 ont été soumis au traitement déglycosylant au mélange N-glycosidase F/endoglycosidase F. Après le traitement, les bandes à 85, 105 et 130 kDa ont perdu en intensité, alors qu'une bande très intense apparaît à environ 82 kDa (voir flèches). Le signal détecté à plus de 200 kDa a également gagné en mobilité.

a été mesuré sur chacun des ovocytes, et dans un deuxième temps l'expression du xCIC-5 a été analysée par Western blot sur les mêmes ovocytes.

Deux conditions de concentration de tunicamycine ont été testées:

- * expérience 1: 0,2 ng de tunicamycine par ovocyte
+ 1 μ g de tunicamycine par ml de milieu
- * expérience 2: 0,3 ng de tunicamycine par ovocyte
+ 2 μ g de tunicamycine par ml de milieu

Sur les ovocytes injectés avec les ARNc (β) xCIC-5, la mesure des courants montre que le traitement à la tunicamycine produit une diminution de l'amplitude des courants (**Figure 37 A**). La comparaison des expériences 1 et 2 montre que cette diminution est d'autant plus forte que les doses de tunicamycine injectées et présentes dans le milieu sont élevées (**Tableau 9**). Sur les ovocytes contrôle, le courant est inchangé à la suite du traitement.

La **Figure 37 B** illustre le résultat d'un Western blot réalisé sur des ovocytes de l'expérience 2. On observe une diminution très nette de l'intensité des bandes migrant approximativement à 85, 100 et 130 kDa et l'apparition d'une bande importante entre 80-85 kDa. Aussi, dans l'expérience illustrée, il semble que la bande de masse moléculaire 230 kDa contient deux formes distinctes. Après le traitement à la tunicamycine, cette bande diminue en intensité et gagne en mobilité, mais sa migration s'effectue toujours au dessus de 200 kDa. Lors de l'utilisation de doses plus faibles de tunicamycine (expérience 1), la disparition des différentes glycoformes est moins marquée (résultat non illustré). Aucun signal n'est détecté sur les ovocytes contrôle.

	<u>Expérience 1</u>	<u>Expérience 2</u>
Contrôle sans tunicamycine	65 (n=2)	117 (n=4)
Contrôle avec tunicamycine	81 (n=2)	101 (n=4)
xCIC-5 sans tunicamycine	2799 (n=4)	1958 (n=12)
xCIC-5 avec tunicamycine	1681 (n=4)	406 (n=12)
% d'inhibition	42 %	83 %

Tableau 9: Effet de la tunicamycine sur le courant xCIC-5 dans l'ovocyte de xénope. Les courants (nA) ont été mesurés à +80 mV, 4 jours après l'injection, sur des ovocytes contrôles ou bien injectés avec 10-15 ng d'ARNc (β) xCIC-5, traités ou non à la tunicamycine. Expérience 1: injection de 0,2 ng de tunicamycine par ovocyte + 1 μ g de tunicamycine par ml de milieu. Expérience 2: injection de 0,3 ng de tunicamycine par ovocyte + 2 μ g de tunicamycine par ml de milieu.

3.3. Discussion

Les résultats des expériences de déglycosylation et des expériences avec la tunicamycine sont cohérentes et permettent de tirer plusieurs conclusions:

i) Les formes protéiques migrant approximativement à 85, 100 et 130 kDa correspondent à des formes N-glycosylées du xCIC-5. En effet, ces formes disparaissent à la suite d'une déglycosylation enzymatique ou après traitement à la tunicamycine. Dans ces expériences, on observe l'apparition de la forme non-glycosylée du xCIC-5 qui migre à 82 kDa. La glycoforme migrant à 85 kDa correspond à la forme core-glycosylée immature alors que les autres bandes sont probablement des glycoformes matures (*fully*-glycosylées).

ii) La bande migrant à 230 kDa est large et comporte apparemment différentes glycoformes. La mobilité de cette bande est accrue à la suite du traitement à la N-glycosidase F ou bien du traitement à la tunicamycine, mais sa masse moléculaire apparente reste supérieure à 200 kDa. Ceci peut être le reflet de l'association du xCIC-5 avec une autre protéine. Comme la masse moléculaire apparente de ces formes est approximativement le double de la masse moléculaire du xCIC-5, il est possible que cette forme corresponde à un dimère, naturel ou artificiel, de xCIC-5. L'association en dimères a été montrée pour d'autres membres de la famille des CIC (Fahlke et al., 1996; Ludewig et al., 1996; Middleton et al., 1996).

En outre, les expériences utilisant la tunicamycine montrent de manière plus précise qu'il existe un lien entre l'expression de la protéine xCIC-5 et l'apparition de la conductance anionique. La glycosylation de la protéine semble jouer un rôle fondamental dans l'établissement de l'activité canal du xCIC-5. Deux interprétations sont possibles:

i) La N-glycosylation peut être importante pour l'adressage de la protéine à la membrane plasmique (Opdenakker et al., 1993). En effet, l'absence de N-glycosylation peut bloquer l'exportation de la protéine depuis le réticulum endoplasmique. Si la protéine n'est pas localisée à la membrane plasmique, la technique des double microélectrodes ne permet pas d'enregistrer l'activité électrique du canal. La technique de biotinylation des protéines membranaires pourrait être un moyen pour déterminer la présence du xCIC-5 à la membrane de l'ovocyte.

ii) La N-glycosylation peut être nécessaire à l'activité canal de la protéine (Opdenakker et al., 1993). Par exemple, les chaînes sucre peuvent jouer un rôle structural pour la protéine. En leur absence, la structure tridimensionnelle de la protéine n'est pas correcte et le fonctionnement de la protéine n'est plus assuré. On pourrait tester cette hypothèse par des expériences de déglycosylation *in vivo* sur l'ovocyte.

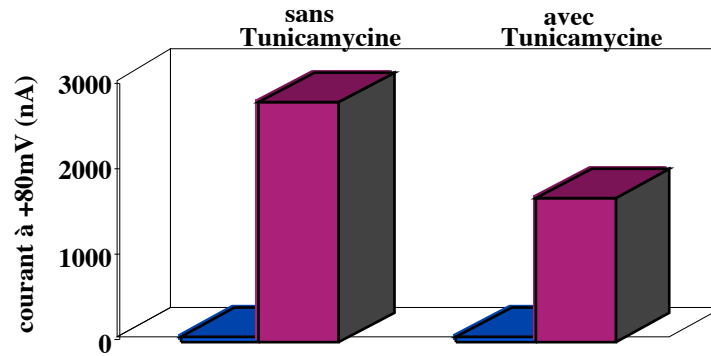
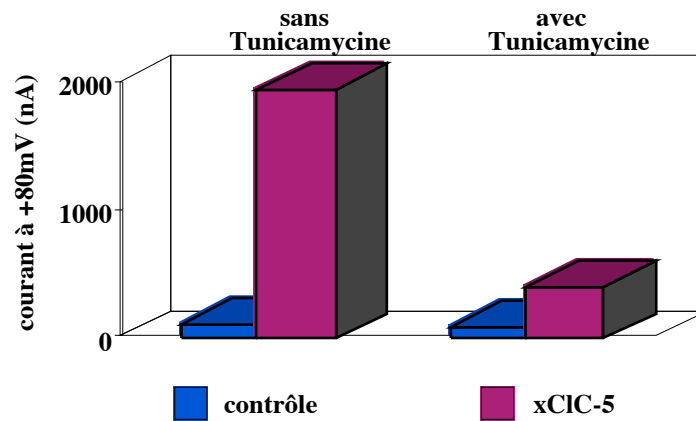
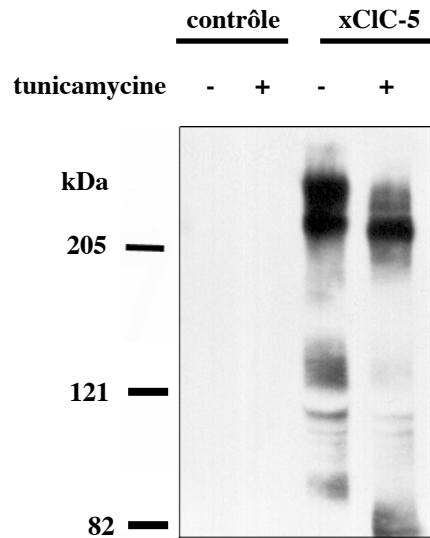
A**Expérience 1 : injection de 0.2 ng tunicamycine par ovocyte + 1 μ g tunicamycine dans le milieu****Expérience 2 : injection de 0.3 ng tunicamycine par ovocyte + 2 μ g tunicamycine dans le milieu****B**

Figure 37: Effet du traitement à la tunicamycine sur le courant xCIC-5 (A) et sur la N-glycosylation du xCIC-5 (B) dans l'ovocyte de xénope. A: courants mesurés à +80 mV sur des ovocytes contrôle (bleu) et des ovocytes exprimant le xCIC-5 (rouge), avec ou sans les traitements indiqués, pendant 3 jours. B: analyse par Western blot d'ovocytes contrôle et d'ovocytes exprimant le xCIC-5 ayant subi (+) ou non (-) l'expérience 2 décrit en A.

En bref, nous avons montré l'existence de différentes formes N-glycosylées de la protéine xClC-5, lorsqu'elle est exprimée dans l'ovocyte de xénope. On distingue au moins une forme core-glycosylée (immature) et deux formes fully-glycosylées (probablement matures). La N-glycosylation de la protéine intervient dans l'établissement de l'activité canal dans l'ovocyte de xénope.

4. Etude de voies de signalisation

Nous nous sommes également intéressés à la régulation de l'activité électrique du xCIC-5. Les voies de signalisation intracellulaires sont multiples et toutes n'ont pas été examinées. Les expériences réalisées visaient surtout à identifier les voies impliquant les messagers intracellulaires cAMP ou le Ca^{2+} intracellulaire, ainsi que les différents types de phosphorylation. La phosphorylation des protéines repose sur l'équilibre des activités protéine kinase et phosphatase dans la cellule. Pour déterminer les éléments de signalisation sollicités, j'ai testé l'effet de diverses substances pharmacologiques, connues pour moduler le niveau de messagers intracellulaires ou pour intervenir sur l'activité des différentes protéines kinases ou phosphatases.

4.1. AMPc et Ca^{2+} intracellulaires. Voies protéines kinases A et C.

Sachant que le xCIC-5 possède des sites consensus pour la phosphorylation pour les protéines kinases A et C, j'ai commencé avec des traitements adaptés à l'activation ou l'inhibition de ces kinases. La protéine kinase A est stimulée par une augmentation de l'AMPc intracellulaire. Pour produire une telle augmentation, j'ai appliqué simultanément de la forskoline (à $5 \mu\text{M}$, pour stimuler l'adénylate cyclase), du dibutyryl-AMPc (AMPc diffusible à 1 mM , qui pénètre dans la cellule) et de l'IBMX (3-isobutyl-1-méthyl-xantine à $50 \mu\text{M}$, qui inhibe les phosphodiesterases et empêche ainsi la dégradation de l'AMPc). Aucun effet n'a été observé lors de cette application (résultat non illustré), ce qui laisse penser que ni l'AMPc ni la voie protéine kinase A ne sont impliqués dans la régulation de l'activité électrique du xCIC-5.

La protéine kinase C est activée par une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire ou bien inhibé par l'application de staurosporine (500 nM). Nous avons vu (**Figure 28**) que l'application de ionomycine, qui augmente le niveau du Ca^{2+} intracellulaire, ne se répercute pas sur l'activité électrique du xCIC-5. Le traitement à la staurosporine est également resté sans effet (résultat non illustré). Par conséquent, l'activité canal du xCIC-5 ne semble pas être régulée par le Ca^{2+} intracellulaire, ni directement, ni par l'intermédiaire de la protéine kinase C.

4.2. Voies tyrosine protéines kinases

Les voies de signalisation impliquant des tyrosine protéines kinases sont complexes. Au sein d'une même cellule, il existe plus d'une centaine de protéines kinases capables de phosphoryler des résidus tyrosine. Ces phosphorylations peuvent porter sur la tyrosine protéine kinase elle-même (auto-phosphorylation) ou bien sur une autre protéine, qui peut également être une kinase. Ainsi, les tyrosine protéines kinases s'organisent en cascade et constituent des voies

de signalisation (**Figure 38**). Les domaines de reconnaissance pour les tyrosine protéines kinases sont très variés et tous n'ont pas été identifiés. A priori, la séquence du xCIC-5 ne comporte pas de motif de reconnaissance de tyrosine protéine kinase qui soit connu. L'état de phosphorylation d'une protéine dépend de l'équilibre des activités tyrosine protéine kinase et tyrosine protéine phosphatase. Les tyrosine protéines phosphatases sont également nombreuses au sein des cellules. Plus d'une cinquantaine de tyrosine protéines phosphatases différentes ont d'ores et déjà été identifiées.

Nous avons examiné l'implication d'une voie tyrosine protéine kinase, dans la régulation de l'activité électrique du xCIC-5, à l'aide de substances pharmacologiques connues pour leur effet inhibiteur ou stimulateur de tyrosine protéines kinases ou de tyrosine protéines phosphatases. Malheureusement, la spécificité d'action de ces substances est encore mal définie et la multitude de tyrosine protéines kinases et tyrosine protéines phosphatases au sein d'une même cellule ne facilite pas l'analyse des résultats.

4.2.1 Effet inhibiteur de la génistéine

La génistéine est un inhibiteur potentiel de tyrosine protéines kinases (Akiyama et al., 1987). Pour déterminer une éventuelle implication d'une voie tyrosine protéine kinase, j'ai testé l'effet de la génistéine sur l'activité canal du xCIC-5 dans l'ovocyte de xénope. L'application de 100 μM de génistéine pendant 5 minutes produit une inhibition de $41 \pm 2\%$ ($n=10$) du courant enregistré à +80 mV (**Figure 39 A**). Une application prolongée au-delà de 5 minutes ne produit pas d'augmentation supplémentaire de l'inhibition. L'effet inhibiteur est partiellement réversible au rinçage de la génistéine: après 5 minutes, le courant a récupéré 50% de son inhibition. La limite de solubilité de la génistéine se situe à 100 μM . Par conséquent, seule une courbe dose-réponse partielle a pu être établie. L'histogramme de la **Figure 39 B** montre que l'inhibition du courant est dépendante de la dose de génistéine, mais la concentration produisant une inhibition de 50% (IC_{50}) et le coefficient de Hill n'ont pas pu être déterminés.

Le daidzein est un analogue structural de la génistéine, dépourvu d'effet inhibiteur sur les tyrosine protéines kinases. L'application de 25 ou 100 μM de daidzein ne produit aucun effet inhibiteur sur le courant mesuré à +80 mV (résultat non illustré).

4.2.2. Autres inhibiteurs de tyrosine protéines kinases et phosphatases

Il existe un certain nombre d'autres inhibiteurs de tyrosine protéines kinases, qui possèdent des spécificités variées, souvent peu définies, vis-à-vis des différentes activités kinases. J'ai testé l'effet de 50 μM de tyrphostine 51 (Gazit et al., 1989), 20 μM de geldanamycine et 100 μM d'acide cinnamique. Seule l'application pendant 5 minutes de tyrphostine 51 s'est traduite par une inhibition réversible de $24 \pm 2\%$ ($n=5$) du courant à +80 mV (résultats non illustrés).

Le perorthovanadate (0,1 mM) est un inhibiteur de tyrosine protéines phosphatases bien connu (Gordon, 1991). L'application de perorthovanadate sur les ovocytes exprimant le xCIC-5 est resté sans effet sur le courant (résultat non illustré).

4.2.3. Discussion

L'effet inhibiteur que nous avons observé avec la génistéine pourrait être le reflet de l'implication d'une voie tyrosine protéine kinase dans la régulation du xCIC-5. Alternativement, on peut envisager un effet structural direct de la génistéine (Weinreich et al., 1997) sur la protéine xCIC-5. En effet, l'inhibition de tyrosine protéines kinases par la génistéine est compétitive sur le site de fixation de l'ATP ($K_i = 13,7 \mu\text{M}$ d'après Akiyama and Ogawara, 1991). Des séquences consensus correspondant à des sites de fixation de l'ATP ont été décrits sur différentes protéines liant des nucléotides (Walker et al., 1982). La séquence du CIC-5 contient une telle séquence, appelée Walker B, qui est relativement conservée chez l'amphibien et le mammifère (**Figure 40**). Pour le moment, aucune étude ne fait état d'une liaison éventuelle de l'ATP sur le motif de type Walker B du xCIC-5. L'absence d'effet inhibiteur avec le daidzein (analogue structural de la génistéine, inactif sur les tyrosine protéines kinases) suggère qu'il n'y a pas d'interaction directe de la génistéine avec le xCIC-5. De plus, l'application d'au moins un inhibiteur de tyrosine protéines kinases structurellement distinct, la tyrphostine 51, a également conduit à une inhibition du courant, favorisant également l'hypothèse de l'implication d'une tyrosine protéine kinase intermédiaire. L'absence d'effet avec la geldanamycine et l'acide cinnamique peut s'expliquer par une spécificité d'action différente de ces inhibiteurs.

L'implication d'une voie tyrosine protéine kinase voudrait qu'on observe une stimulation du courant en présence d'inhibiteurs des tyrosine protéines phosphatases. Or, l'application de perorthovanadate est restée sans effet sur le courant. L'absence d'effet du perorthovanadate n'invalide pas pour autant notre hypothèse car l'absence d'effet du perorthovanadate peut s'expliquer par le faible niveau d'activité des tyrosine protéines phosphatases dans l'ovocyte de xénope (Wischmeyer et al., 1998).

Dans leur ensemble, ces résultats sont compatibles avec l'existence d'une voie tyrosine protéine kinase régulant l'activité canal du xCIC-5, mais l'étude électrophysiologique de l'effet des substances pharmacologiques, que nous avons menée, n'est pas suffisante pour impliquer une voie tyrosine protéine kinase sans ambiguïté. Aussi, une de nos perspectives est d'analyser l'état de phosphorylation du xCIC-5 en Western blot. Pour commencer, l'utilisation d'anticorps anti-phosphotyrosine peut être un moyen adapté à la détection de résidus phosphotyrosine éventuellement présents sur le xCIC-5. Si la phosphorylation en tyrosine se confirme, l'étude pourra être poursuivie par la recherche d'éléments modulateurs de l'état de phosphorylation du xCIC-5, par exemple par phosphorylation *in vitro*, afin d'obtenir plus d'informations sur les éléments constitutifs de la voie tyrosine protéine kinase impliquée.

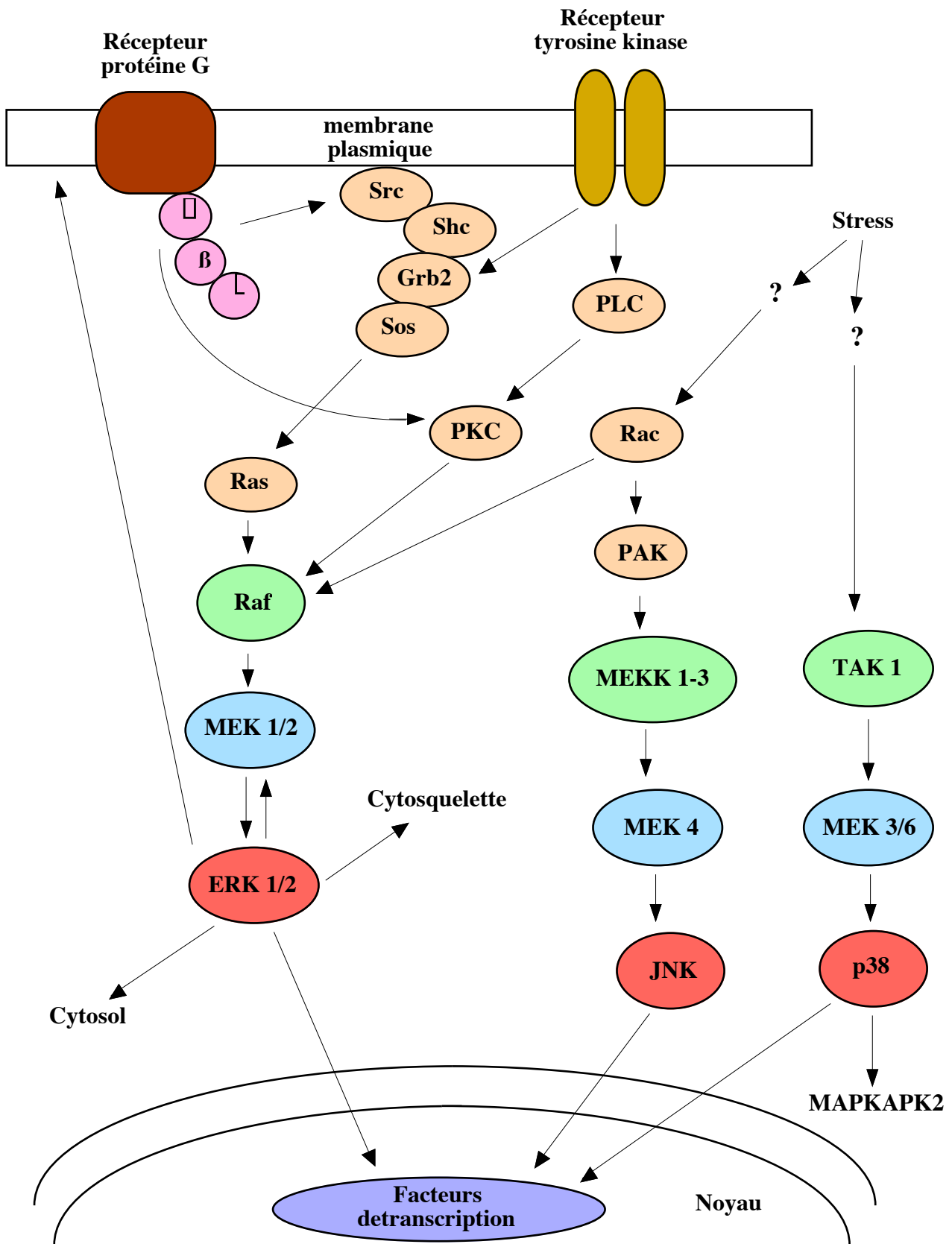


Figure 38: Les voies de signalisation intracellulaires impliquant des cascades de tyrosine protéine kinases.

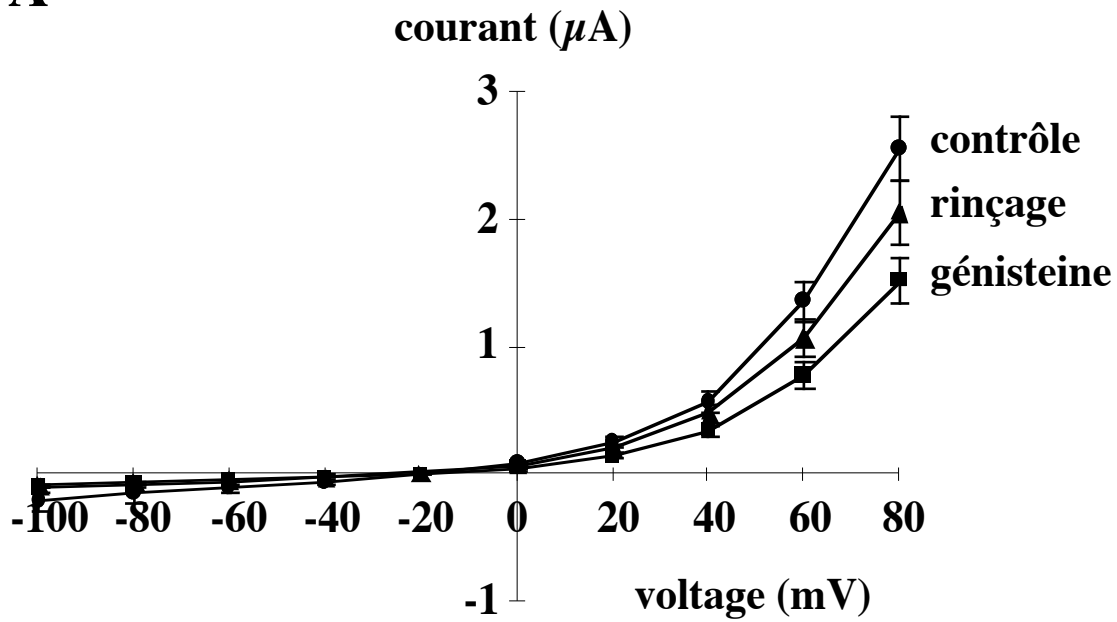
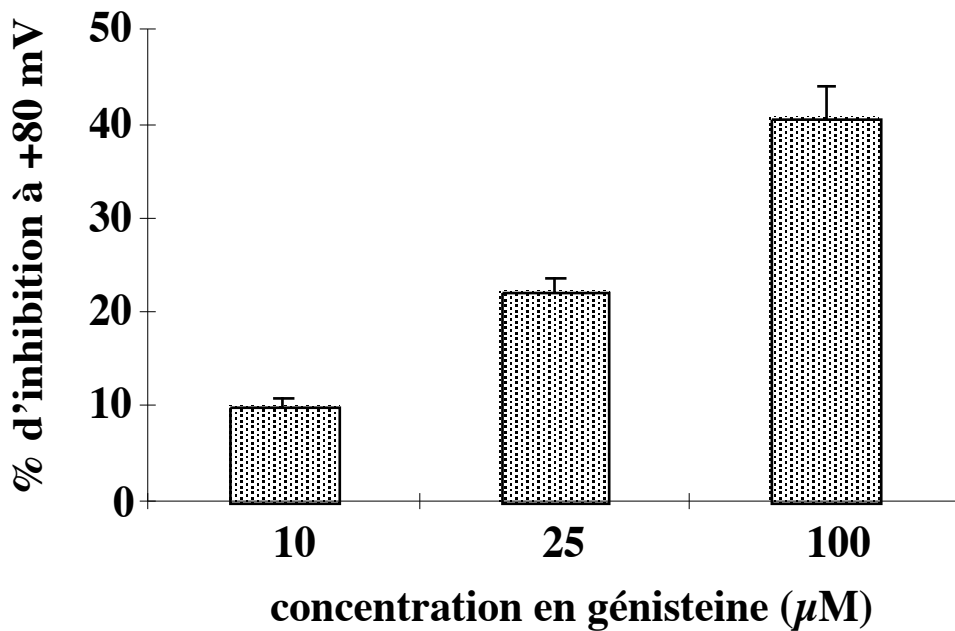
A**B**

Figure 39: Effet inhibiteur de la génistéine sur le courant xCIC-5 dans l'ovocyte de xénope. A: courbes courant/voltage obtenues sur des ovocytes exprimant le xCIC-5 en absence de génistéine (contrôle), en présence de 100 μM de génistéine depuis 5 minutes et après 5 minutes de rinçage de la génistéine. B: pourcentages d'inhibition du courant mesuré à +80 mV observés en présence de différentes concentrations de génistéine (effet déterminé après 5 minutes).

hCIC-5	R	G	Y	L	G	K	W	T	L	V	I	K	T	I
xCIC-5	R	G	Y	L	G	K	W	T	L	I	I	K	T	M
Walker B	R/K	X	X	X	G	X	X	X	L					D

Figure 40: Motifs de type Walker B contenus dans les séquences protéiques du hCIC-5 et du xCIC-5. X représente un acide aminé quelconque et le losange noir représente un acide aminé hydrophobe.

En bref, nous avons mis en évidence l'effet inhibiteur de la génistéine sur l'activité électrique du xClC-5. Initialement, la génistéine est connue pour son effet inhibiteur exercé sur une variété de tyrosine protéines kinases. L'hypothèse de l'implication d'une voie tyrosine protéine kinase dans la régulation du xClC-5 est soutenue par l'absence d'effet du daidzein et par l'inhibition induite par la tyrphostine 51. Bien que ces résultats semblent invalider l'hypothèse d'un effet direct de la génistéine sur le xClC-5, ils sont insuffisants pour valider définitivement l'implication d'une voie tyrosine protéine kinase. Des expériences, utilisant d'autres approches, sont nécessaires pour démontrer clairement l'existence d'une régulation du xClC-5 par l'intermédiaire de tyrosine protéines kinases.

5. Inhibition par les ions métalliques

L'effet inhibiteur des ions métalliques a été décrit sur plusieurs membres de la famille des CIC (**Tableau 10**). Les ions métalliques du groupe IIb (Zn^{2+} , Cd^{2+} et Hg^{2+}) inhibent le CIC-1 (Rychkov et al., 1997; Kürz et al., 1997), le Zn^{2+} inhibe le CIC-0 (Chen, 1998) et les ions Zn^{2+} et Cd^{2+} inhibent le CIC-2 (Clark et al., 1998). Nous avons donc voulu savoir si le xCIC-5 possède également une sensibilité aux ions métalliques de cette classe.

Canal	Elément	IC ₅₀	Caractéristiques	Références
CIC-0	Zn^{2+}	1-3 μM	réversible indépendant du voltage facilite le <i>slow gating</i>	Chen, 1998
hCIC-1	Zn^{2+} Cd^{2+} Hg^{2+}	200-300 μM	irréversible indépendant du voltage	Kürz et al., 1997
rCIC-1	Zn^{2+} Cd^{2+}	350 μM 1000 μM	dépendant du pH	Rychkov et al., 1997
rCIC-2	Cd^{2+} Zn^{2+}	280 μM $\approx 30 \mu M$	lentement réversible	Clark et al., 1998

Tableau 10: Effet inhibiteur des ions métalliques du groupe IIb sur divers membres de la famille des CIC.

5.1. Résultats

Sur les ovocytes exprimant le xCIC-5, l'application de chlorure de zinc ($ZnCl_2$) à 500 μM se traduit par une légère inhibition réversible de $18,5 \pm 2,5\%$ ($n=9$) du courant à +80 mV. L'effet inhibiteur est maximal en moins de deux minutes et réversible dès le retour au milieu de perfusion dépourvu de chlorure de zinc (résultats non illustrés).

5.2. Discussion

La sensibilité aux ions métalliques de transition semble être une caractéristique commune à plusieurs membres de la famille des CIC. Cet effet inhibiteur s'exerce-t-il à travers une organisation structurale commune à ces canaux?

Le CIC-0 s'associe en dimère pour former un canal constitué de deux pores (en double canon ou *double-barreled*) (Ludewig et al., 1996; Middleton et al., 1996). Chaque pore possède

une porte individuelle rapide et l'ensemble est chapeauté par une porte commune lente (**Figure 41**). Le Zn^{2+} agirait de manière réversible sur le mécanisme de *slow gating* de la porte commune avec un IC_{50} de 1-3 μM (Chen, 1998).

Cette structure en dimère, associée à l'existence de deux pores, constituerait une organisation structurale commune à plusieurs membres de la famille des CIC (Jentsch et al., 1999). En effet, cette structure a également été proposée pour le CIC-1 (Fahlke et al., 1998; Saviane et al., 1999). Par contre, l'inhibition du CIC-1 par les ions métalliques présente un IC_{50} cent fois plus élevé que pour le CIC-0 et semble être irréversible. Ceci semble impliquer un mécanisme d'action différent de celui proposé pour le CIC-0.

L'effet du Zn^{2+} sur le xCIC-5 est faible et présente probablement un IC_{50} cinquante à cent fois plus élevé que pour le CIC-1, suggérant un mécanisme d'action également différent. De plus, un effet non-spécifique ne peut être exclu.

Concernant le CIC-5, l'organisation structurale du canal reste à être déterminée. Les expériences de patch-clamp menées au laboratoire n'ont à ce jour pas permis de mettre en évidence le courant conduit par le xCIC-5. En outre, aucune étude ne décrit la caractérisation unitaire du CIC-5 de mammifère. La difficulté à détecter le courant unitaire peut être le reflet d'une conductance unitaire faible, inférieure au pS. Ce problème a déjà été rencontré avec le CIC-1, dont les caractéristiques unitaires ont finalement été déterminés par analyse de bruit (Pusch et al., 1994). L'utilisation de cette technique pourrait être utile pour la caractérisation fonctionnelle et structurale du CIC-5. Aussi, l'étude de l'inhibition du CIC-5 par les ions métalliques serait à compléter par la détermination de l'effet d'autres ions métalliques (comme par exemple le Cd^{2+}) et par la détermination du IC_{50} et du coefficient de Hill, qui caractérisent l'interaction. On pourrait également déterminer si l'inhibition du courant par les ions métalliques présente une dépendance vis-à-vis du voltage et du pH.

Quelle est la signification de la sensibilité des CIC aux ions métalliques sur le plan physiologique? Pour le moment, cette question n'est pas encore élucidée. Il a été suggéré que le Zn^{2+} joue un rôle de modulateur de l'activité de canaux dépendants de ligands ou du voltage (Harrison and Gibbons, 1994; Gingrich and Burkat, 1998). La concentration en Zn^{2+} est d'environ 10 à 20 μM dans le sérum et de 100 à 300 μM dans le système nerveux (au niveau de l'hippocampe) (Holtmeier, 1991; Harrison and Gibbons, 1994). Chez l'homme, le muscle squelettique est l'organe le plus riche en Zn^{2+} .

En bref, nous avons montré que le xCIC-5 est inhibé par le chlorure de zinc. Une caractérisation plus précise de l'inhibition du xCIC-5 par les ions métalliques et la détermination des caractéristiques unitaires du canal pourraient fournir des informations structurales permettant d'établir un modèle fonctionnel. Pour le moment, le rôle physiologique de la sensibilité des CIC aux ions métalliques reste incompris.

6. Sensibilité au pH

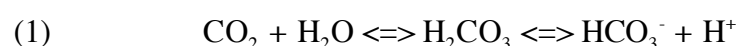
6.1. pH extracellulaire

Pour étendre la caractérisation fonctionnelle du xCIC-5, nous avons examiné la sensibilité au pH extracellulaire de son activité canal, lorsqu'il est exprimé dans l'ovocyte de xénope. L'effet du pH extracellulaire a été étudié sur une gamme de pH allant de pH 4,5 à pH 9,5. La **Figure 42** montre les courants à +80 mV enregistrés pour les différentes conditions de pH extracellulaire. Les courants à +80 mV des ovocytes contrôle ne varient pas de manière significative avec le pH extracellulaire. La conductance de base des ovocytes de xénope n'est donc pas affectée, à court terme, par des changements de pH extracellulaire. Sur les ovocytes exprimant le xCIC-5, le courant varie peu entre les pH 7,4 et 9,5, mais l'acidification du milieu extracellulaire à des pH inférieurs à 7,4 entraîne une diminution significative du courant à +80 mV. La rapidité de l'inhibition indique que l'effet observé relève du changement de pH extracellulaire. Sur toute la gamme de pH testée, l'inhibition du courant est rapidement (< 2 minutes) et totalement réversible, ce qui indique que l'acidification du milieu extracellulaire n'a pas endommagé les ovocytes. L'analyse de la courbe de titration donne un pK_a apparent (log négatif de la constante de dissociation) de $5,67 \pm 0,06$ (n=6) et un coefficient de Hill de $2,23 \pm 0,27$ (n=6).

6.2. pH intracellulaire

Dans le cadre de son travail de DEA au sein de notre laboratoire, Nathalie Hélix a examiné la sensibilité au pH intracellulaire du xCIC-5. Pour cela, elle a mesuré l'activité électrique du canal au cours d'une acidification modérée du milieu intracellulaire. Le pH intracellulaire de l'ovocyte de xénope est probablement proche de 7,5 (Burckhardt et al., 1992). L'acidification du milieu intracellulaire est produite par le passage de la solution contrôle à pH 7,5 (contenant 2,4 mM de HCO_3^- et équilibrée à l'air qui contient environ 0,03% de CO_2) à la solution acide de pH 6,7 (contenant 2,4 mM de HCO_3^- et gazée à 2,5% de CO_2).

Le principe de cette acidification repose sur la diffusion du CO_2 extracellulaire vers l'intérieur de la cellule. Dans la cellule, l'anhydrase carbonique catalyse la réaction (1) et modifie l'équilibre du système tampon $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$, régi par l'équation d'Henderson-Hasselbalch (2).



$$(2) \quad \text{pH} = \text{p}K_a + \log ([\text{acide}] / [\text{base}])$$

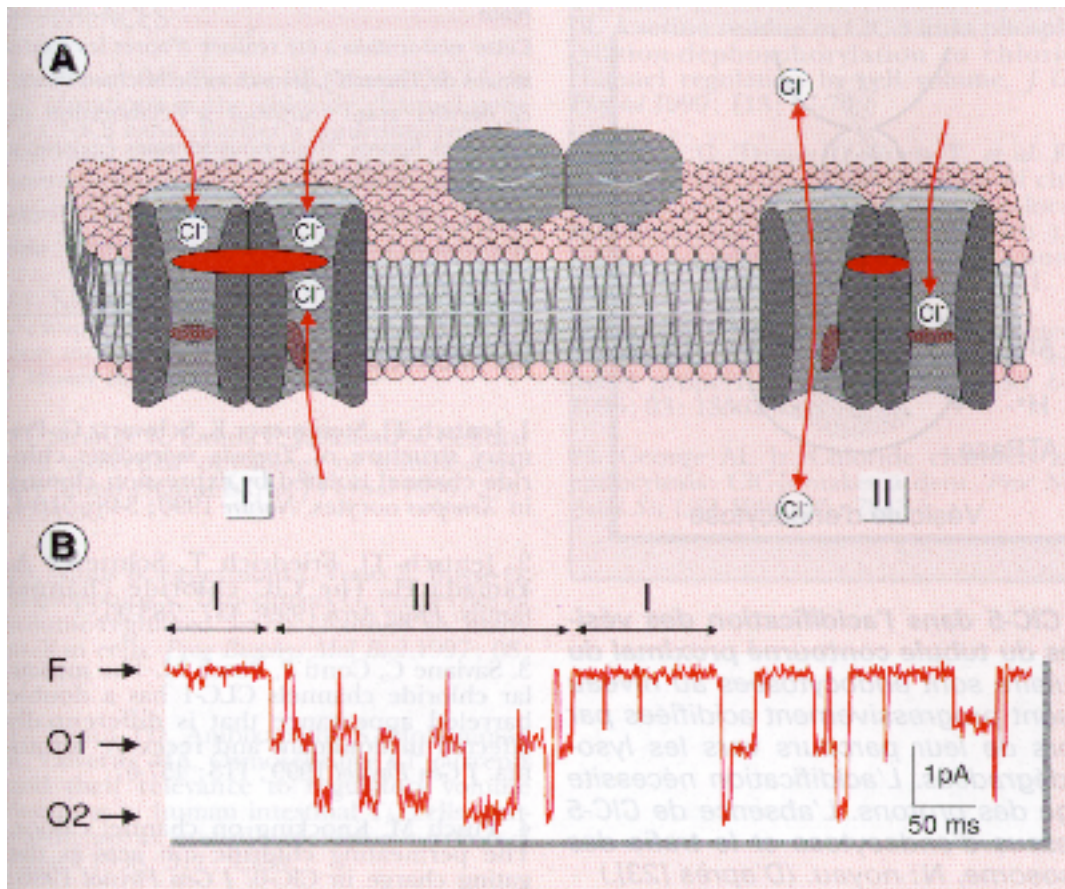


Figure 41: A: modèle structural de dimère, composé de deux sous-unités identiques, chacune formant un canal ionique. B: enregistrement du courant ionique passant à travers un dimère unique situé sur un fragment de membrane d'ovocyte de xénope exprimant le ClC-0 du poison torpille. Les ouvertures des deux canaux se manifestent par des déflexions vers le bas. Les canaux, soit sont tous les deux fermés (phase I, niveau de courant F), soit présentent des pics d'activité pendant lesquels la probabilité d'ouverture des deux canaux est grande (phase II, niveau O1 et O2). Ce type d'activité traduit la présence de deux modes d'ouverture. D'une part, un mode d'ouverture à cinétique lente commun aux deux protopores et induit par l'ion chlorure lui-même. Ce mode, schématisé en A par un mécanisme affectant simultanément les deux canaux (rouge), est responsable des périodes de fermeture longue et des pics d'activité. D'autre part, un mode d'ouverture rapide, indépendant pour chaque canal (porte marron en A), activé par l'ion chlorure externe et stabilisé par l'ion chlorure interne, et qui est responsable des transitions rapides pendant les pics d'activité (l'enregistrement et le modèle ont été aimablement fournis par le Dr. M. Pusch) (d'après Hussy et al., 1999).

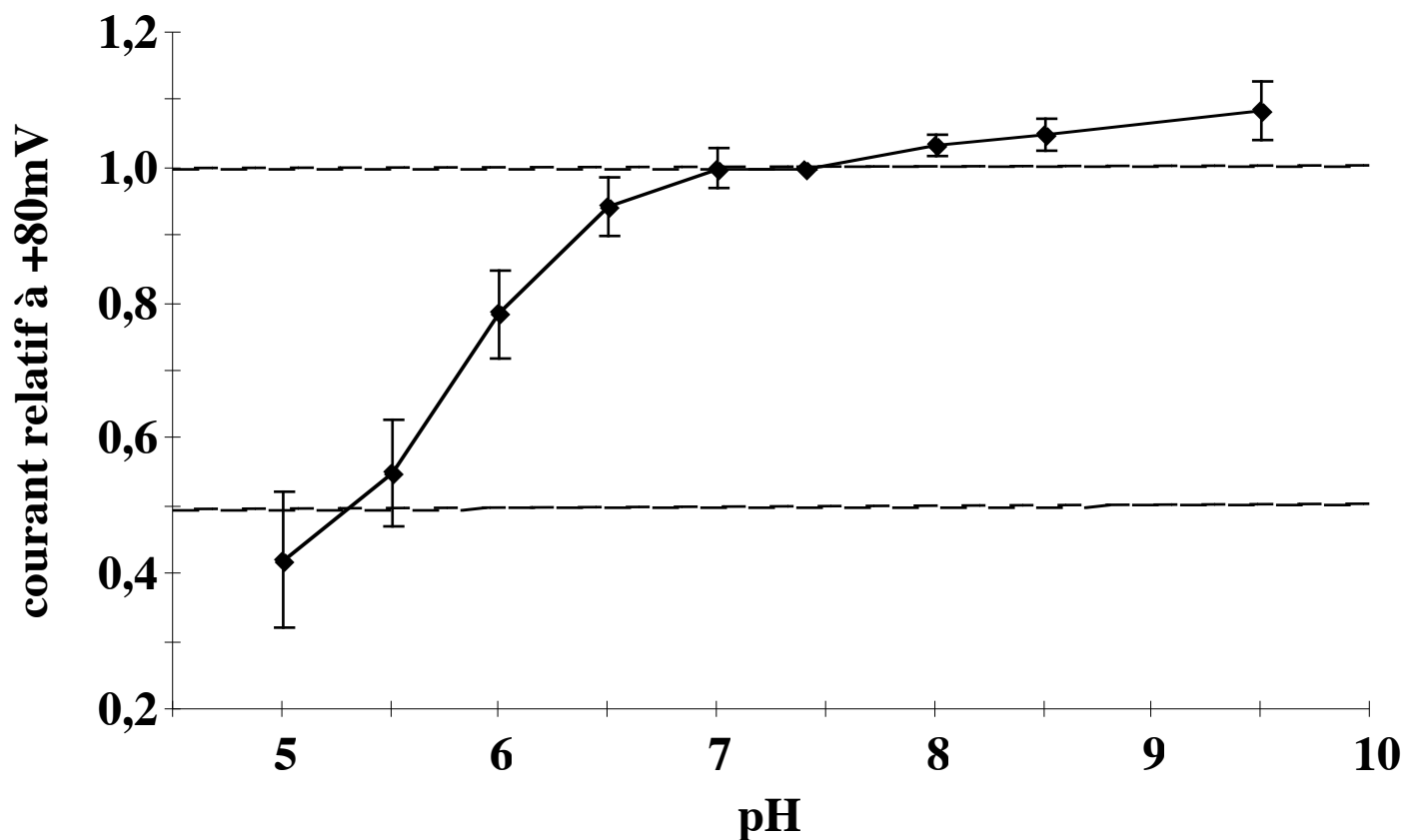


Figure 42: Dépendance du pH extracellulaire du courant xCIC-5 dans l'ovocyte de xénope. Courants à +80 mV enregistrés sur des ovocytes contrôle (n=6) et des ovocytes exprimant le xCIC-5 (n=6) à des pH extracellulaires compris entre 4,5 et 9,5. Les mesures de courant ont été réalisées 2 minutes après la perfusion avec le milieu ISO 95 à différents pH. Le pH a été ajusté aux valeurs choisies avec du MES ou du Trizma base.

Un protocole d'acidification identique a été décrit par Sasaki et al. (1992). Ces auteurs ont mesuré une diminution du pH intracellulaire d'une demie unité de pH lors de la perfusion avec la solution gazée. Précédemment, nous avons vu que l'inhibition de l'activité électrique du xCIC-5 pour un pH extracellulaire de 6,7 est faible (environ 5%) et sa contribution peut donc être considérée comme négligeable.

Dans nos expériences sur les ovocytes contrôle, l'acidification du milieu intracellulaire se traduit par une légère dépolarisation d'environ 3 mV du potentiel de membrane. Une dépolarisation équivalente est observée lorsqu'on perfuse des ovocytes contrôle avec la solution de pH 6,7. Cette dépolarisation correspond probablement à l'inhibition par le pH extracellulaire d'une conductance au potassium de la membrane plasmique (Burckhardt et al., 1992). Les courants enregistrés sur les ovocytes contrôles ne varient pas de manière significative lors de la perfusion avec la solution gazée à 2,5% de CO₂ (résultats non illustrés).

Sur les ovocytes exprimant le xCIC-5, nous avons également observé une légère dépolarisation lors de la perfusion avec la solution gazée. Aucun changement de courant ne s'est produit sur ces ovocytes pendant l'acidification du milieu intracellulaire.

6.3. Discussion

Le CIC-5 est sensible au pH extracellulaire

Nous avons vu que le xCIC-5 est insensible aux variations du pH intracellulaire pour des valeurs proches du pH physiologique. D'autres techniques pourraient être mises en œuvre pour déterminer la sensibilité au pH intracellulaire dans une gamme de pH plus large.

Par contre, l'acidification du milieu extracellulaire inhibe l'activité électrique du xCIC-5. Des résultats similaires aux nôtres (Schmieder et al., 1998) ont récemment été publiés par Mo et al. (1999) et par Friedrich et al. (1999).

L'inhibition par l'acidification extracellulaire est une caractéristique propre au CIC-5

La modulation de l'activité électrique par le pH intra- et/ou extracellulaire a été décrite pour divers canaux ioniques (Tombaugh and Somjen, 1996; Duprat et al., 1997; Chalfant et al., 1999; Abriel and Horisberger, 1999) (**Tableau 11**). Au sein même de la famille des CIC, la dépendance vis-à-vis du pH a pu être mise en évidence pour plusieurs membres. Dès 1983, Hanke et Miller montrent que l'acidification intracellulaire active le courant conduit par les canaux CIC-0 reconstitués dans des bicouches artificielles à partir de l'électroplaque de *Torpedo marmorata*. Contrairement au CIC-0, qui apparaît totalement insensible au pH extracellulaire, le CIC-1, canal majoritaire du muscle squelettique, est activé lors de l'acidification du milieu extracellulaire (Rychkov et al., 1996 et 1997). L'acidification du milieu extracellulaire active également le CIC-2 (Malinowska et al., 1995; Sherry et al., 1997; Jordt and Jentsch, 1997). Puisque l'acidification extracellulaire peut se traduire par une stimulation ou bien par une inhibition, on peut considérer l'effet d'une variation de pH sur l'activité d'un canal comme une

caractéristique propre de ce canal. Ces études montrent aussi que la régulation des canaux ioniques par le pH peut se faire sur l'une et/ou l'autre face de la protéine canal et repose probablement sur des mécanismes divers.

Canal	pH extracellulaire	pH intracellulaire	Références
ENaC	insensible	acidification inhibe	Harvey et al., 1988; Chalfant et al., 1999; Abriel and Horisberger, 1999
TASK	acidification inhibe	insensible	Duprat et al., 1997
CIC-0	insensible	acidification stimule ¹	Hanke and Miller, 1983
CIC-1	sensible ²	sensible ³	Fahlke et al., 1996; Rychkov et al., 1996 et 1997
CIC-2	acidification stimule ¹	n.d.	Malinowska et al., 1995; Sherry et al., 1997; Jordt and Jentsch, 1997
CIC-K1	acidification inhibe	n.d.	Uchida et al., 1995
CIC-5	acidification inhibe	insensible ⁴	Schmieder et al., 1998; Friedrich et al., 1999; Mo et al., 1999

Tableau 11: Effet de variations du pH extracellulaire et intracellulaire sur les courants conduits par différents canaux ioniques. n.d.: non déterminé.

Mécanismes d'action des protons

L'étude de l'influence du pH sur différents paramètres électrophysiologiques peut aider à préciser le mécanisme d'action des protons. D'après Rychkov et al. (1996), la probabilité d'ouverture du CIC-1 augmente avec la concentration de chlorure extracellulaire. La protonation du canal sur sa face extracellulaire augmenterait l'affinité pour le chlorure extracellulaire, empêchant ainsi la fermeture du canal en présence d'un milieu extracellulaire acide.

L'ouverture du canal CIC-2 par l'hyperpolarisation ou le choc hypo-osmotique met en jeu la région N-terminale de la protéine. L'étude réalisée par Jordt et Jentsch (1997) montre que la sensibilité au pH extracellulaire est également portée par la queue N-terminale du canal, qui serait impliquée dans un mécanisme de type "balle et chaîne" (*ball and chain*) dans lequel la région évoquée constituerait une structure permettant la fermeture du canal en se liant sur un autre domaine cytoplasmique de la protéine (Jordt and Jentsch, 1997).

¹ L'acidification intracellulaire augmente la probabilité d'ouverture du canal.

² L'acidification extracellulaire stimule le courant et ralentit la cinétique d'inactivation. La dépendance du pH extracellulaire interfère avec la dépendance de la concentration extracellulaire en chlorure.

³ L'acidification intracellulaire diminue l'inactivation du courant et augmente la probabilité d'ouverture du canal.

⁴ Aucun effet n'a été observé pour des valeurs proches du pH physiologique.

La sensibilité au pH extracellulaire du xCIC-5 que nous décrivons suggère qu'un ou plusieurs sites de liaison aux protons se situent sur la face extracellulaire de la protéine. Comme la courbe de titration a permis de déterminer un pKa de 6,7, le site de fixation pour les protons pourrait être au niveau d'un résidu histidine (De Biasi et al., 1993). D'autre part, un coefficient de Hill d'environ 2,2 pourrait refléter l'existence de plusieurs sites de liaison au niveau du canal (Duprat et al., 1993; Rychkov et al., 1997). Ce résultat est conciliable avec une organisation structurale en homodimère, dans laquelle chaque protomère présente un site de liaison pour un proton. Une telle organisation en dimère a été montrée pour le canal CIC-0 (Hanke and Miller, 1983; Middleton et al., 1996; Ludewig et al., 1996) et a été largement suggérée pour les canaux CIC-1 et CIC-2 (pour revue, voir Jentsch, 1999).

Signification physiologique de la sensibilité au pH

La connaissance de la localisation d'un canal (au niveau tissulaire et sur les différentes membranes et endomembranes cellulaires) aide à la compréhension de la signification du rôle physiologique de sa sensibilité au pH. En effet, les canaux ioniques présents sur les membranes de certains compartiments intracellulaires sont soumis de manière physiologique à un pH éloigné du pH cytosolique au niveau de la lumière du compartiment intracellulaire. Le milieu extracellulaire peut subir des acidifications transitoires et locales de manière physiologique. Par exemple, dans le système nerveux, une acidification transitoire du milieu extracellulaire a été décrite lors de la transmission synaptique au niveau de l'hippocampe (Krishtal et al., 1987). Enfin, des variations du pH extracellulaire peuvent survenir dans des situations pathophysiologiques comme l'ischémie ou les activités épileptiformes (Mutch and Hansen, 1984; Siesjö et al., 1985; Nedergaard et al., 1991). Des conditions d'hypertension oculaire peuvent également aboutir à une acidification intra-rétinale (Yamamoto et al., 1992).

Ainsi, les interprétations de la sensibilité au pH des différents canaux sont variées et parfois divergentes ou controversées. L'inhibition de la conductance au sodium sensible à l'amiloride, identifiée comme le canal sodium ENaC, a été interprétée comme un signal de *cross-talk* dès 1988 par Harvey et al.. La même interprétation en est faite en 1999 par Abriel et Horisberger. Ces auteurs parlent d'un effet de rétrocontrôle négatif. Par contre, l'inhibition de la conductance au sodium est vue comme un effet de régulation du pH intracellulaire par Chalfant et al. (1999). Le canal potassium TASK a été proposé comme senseur du pH extracellulaire par Duprat et al. (1997). Une forme gastrique du CIC-2 serait impliquée dans la sécrétion de HCl au niveau de l'estomac (Malinowska et al., 1995; Sherry et al., 1997). Cette hypothèse est controversée pour deux raisons: les caractéristiques électrophysiologiques du courant étudié ne coïncident pas avec celles du courant CIC-2 exprimé dans différents systèmes cellulaires (Thiemann et al., 1992; Jordt and Jentsch, 1997; Furuwaka et al., 1998) et la spécificité gastrique de la protéine n'est pas établie (Thiemann et al., 1992; Furuwaka et al., 1995; Cid et al., 1995). Etant donné que le rôle physiologique du CIC-2 n'est toujours pas identifié, il est difficile de spéculer sur le rôle physiologique de sa sensibilité au pH. Aussi, on n'explique pas encore

comment l'augmentation du courant ClC-1 en milieu extracellulaire acide peut être conciliée avec la diminution de la conductance au chlorure observée sur les fibres musculaires intactes dans ces conditions (Palade and Barchi, 1977).

Concernant le canal ClC-5, la signification physiologique de sa régulation par le pH extracellulaire sera discutée dans un cadre plus large, tenant compte également de sa localisation et de son lien avec la maladie de Dent (voir chapitre 8).

En bref, il apparaît que l'activité électrique du xClC-5, exprimé dans l'ovocyte de xénope, est régulée par le pH extracellulaire, mais est insensible à une acidification du milieu intracellulaire jusqu'à une demie unité pH en dessous du pH physiologique. L'acidification du milieu extracellulaire inhibe le courant conduit par le xClC-5 avec un pK_a d'environ 5,7. Le site de liaison protonique pourrait impliquer un ou plusieurs résidus histidine sur la face extracellulaire du canal. En effet, le coefficient de Hill de 2,2 pourrait être le reflet de la structure homodimérique du canal.

7. Distribution tissulaire et localisation cellulaire du CIC-5

L'expression de l'ARNm du xCIC-5 chez *Xenopus laevis* a été déterminée par la technique de RNase Protection Assay (RPA) (Lindenthal et al., 1997). Le xCIC-5 possède une distribution tissulaire large, avec une expression forte au niveau de l'ovocyte, du rein et de l'intestin. L'expression a également été montrée au niveau du foie, du sang, du cerveau, du coeur et de la vessie. De faibles quantités d'ARNm ont été détectées dans l'estomac, le muscle squelettique et la peau. D'autres études, utilisant la technique de Northern blot, ont montré que les ARNm des homologues de mammifères rCIC-5 et hCIC-5 sont présents surtout au niveau du rein, bien que de faibles quantités aient été détectées dans d'autres organes (Fisher et al., 1994; Steinmeyer et al., 1995; Sakamoto et al., 1996).

Afin de mieux cerner la fonction assurée par le xCIC-5, nous avons envisagé d'examiner sa distribution tissulaire et sa localisation cellulaire, au niveau protéique, à l'aide de nos anticorps anti-xCIC-5.

7.1. Spécificité des anticorps anti-xCIC-5

Dans un premier temps, j'ai examiné la spécificité de nos anticorps par rapport aux différents membres de l'embranchement CIC-3/4/5 chez l'amphibien et le mammifère, car les extrémités C-terminales de ces protéines possèdent un haut degré d'homologie. La spécificité a été déterminée en Western blot sur des préparations membranaires d'ovocytes exprimant les canaux CIC-3, CIC-4 et CIC-5 de rat (généreusement offerts par Dr. T.J. Jentsch) et d'ovocytes exprimant les homologues amphibiens xCIC-3 et xCIC-5, clonés au laboratoire. Les IgG du sérum immun du lapin 62 détectent des bandes entre 80 et 130 kDa spécifiques du xCIC-5 (**Figure 43 A**) dont une large bande autour de 90 kDa correspondant vraisemblablement au rCIC-5 (Günther et al., 1998) (**Figure 43 B**). On observe également des signaux de moindre intensité, spécifiques des protéines xCIC-3 (**Figure 43 A**) et rCIC-4 (**Figure 43 B**), aux masses moléculaires attendues pour ces protéines. Ces IgG marquent également une protéine à 160 kDa, présente dans toutes les préparations membranaires d'ovocyte. La présence de cette protéine dans les membranes d'ovocytes contrôle suggère que ce marquage est non-spécifique et correspond à une protéine sans rapport avec les différents membres de la famille des CIC. La réduction du temps d'incubation avec les anticorps à 2 heures permet de ne pas révéler cette protéine de 160 kDa. En présence d'un excès de peptide C-terminal, contre lequel sont dirigés les anticorps, ainsi qu'avec le sérum pré-immun du même lapin, aucune des bandes décrites ci-dessus n'est révélée (**Figure 43 A**).

Nos anticorps reconnaissent donc le CIC-5 d'amphibien et de mammifère. Ceci s'explique par la conservation du peptide C-terminal contre lequel les anticorps sont dirigés: seul

deux acides aminés sur seize sont différents chez le mammifère par rapport à l'amphibien. C'est probablement pour la même raison que les anticorps apparaissent également capables de reconnaître le CIC-4, au moins chez le mammifère, ainsi que le xCIC-3. En effet, leurs 16 acides aminés C-terminaux ne diffèrent que par trois acides aminés du peptide C-terminal du xCIC-5. Ne disposant pas de l'homologue amphibien du CIC-4 (s'il existe), nous n'avons pas pu tester l'immunoréactivité de nos anticorps sur cette protéine. Cependant, la reconnaissance de ces autres CIC se fait avec une affinité nettement plus faible.

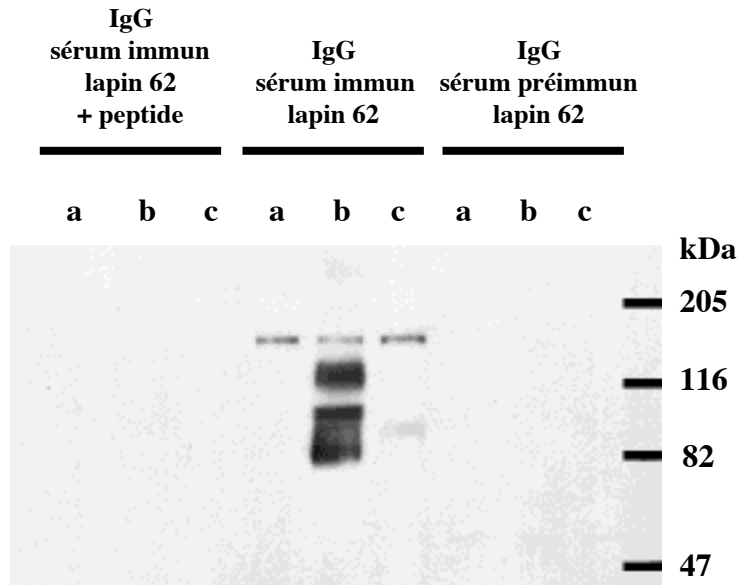
Par conséquent, nos anticorps se prêtent à l'immunodétection du CIC-5 lorsqu'il est surexprimé dans un système cellulaire (par exemple l'ovocyte de xénope). En effet, le haut niveau d'expression de la protéine d'intérêt permet de se placer dans des conditions expérimentales dans lesquelles la protéine d'intérêt surexprimée est détectée, mais pas les éventuels CIC endogènes. De plus, dans certaines conditions on peut éviter de révéler la protéine de 160 kDa, bien qu'en Western blot elle n'interfère pas avec le signal correspondant au CIC-5 ou à d'autres protéines CIC. Par contre, nos anticorps ne se prêtent qu'avec réserve à l'immunodétection du CIC-5 sur des tissus naturels susceptibles d'exprimer simultanément les différentes protéines de cet embranchement des CIC. En effet, les différents CIC ont des masses moléculaires voisines et des migrations sur gel d'électrophorèse très similaires, rendant la distinction des différents CIC sur Western blot quasiment impossible. A fortiori, l'utilisation de nos anticorps dans des expériences d'immunocytochimie ou d'immunohistochimie pose le problème de la spécificité. Au risque d'immunodétection d'autres CIC, s'ajoute la possibilité de marquer la protéine migrant à 160 kDa, qu'on observe dans certains tissus.

En absence d'anticorps plus spécifiques, j'ai tout de même utilisé nos anticorps pour détecter la protéine native, par les techniques de Western blot et d'immunocytochimie, sur des tissus et des cellules, mais l'utilisation d'autres anticorps anti-xCIC-5 sera nécessaire pour confirmer ces résultats.

7.2. Distribution tissulaire du CIC-5

J'ai examiné des préparations membranaires de divers organes de xénope et de souris, par la technique de Western blot. Sur la **Figure 44**, on observe une bande diffuse autour de 80 kDa sur les membranes de rein de souris, mais aucun signal n'est observé sur les membranes d'intestin de souris. Le signal obtenu sur le rein coïncide avec celui obtenu sur le rein de rat et de souris dans d'autres études (Günther et al., 1998; Luyckx et al., 1998; Devuyst et al., 1999) avec d'autres anticorps, dirigés contre le CIC-5 de mammifère. Nous avons vu que nos anticorps anti-xCIC-5 reconnaissent, à un moindre degré, le CIC-4 de mammifère. Or, l'expression de l'ARNm du CIC-4 est restreinte au cerveau, au muscle squelettique et le coeur (van Slegtenhorst et al., 1994; Adler et al., 1997). En absence d'expression de la protéine CIC-4 dans le rein, la bande révélée correspond probablement au CIC-5 de la souris, dont la séquence C-terminale est identique chez la souris et le rat. Au niveau de l'intestin, on ne peut exclure une expression de

A



a: ovocytes contrôle
b: ovocytes exprimant le xCIC-5
c: ovocytes exprimant le xCIC-3

B

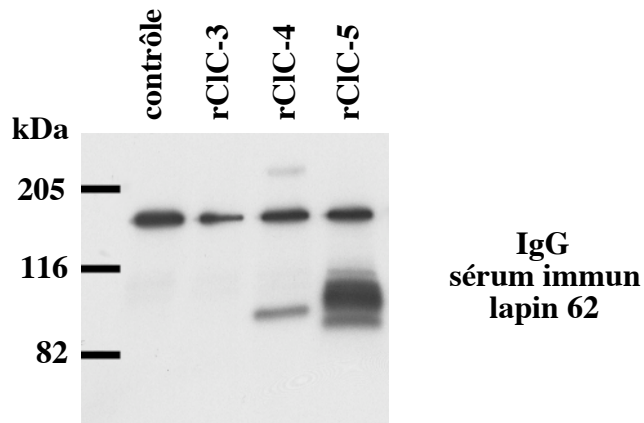


Figure 43: Spécificité des anticorps anti-xCIC-5 (IgG SF 62). A: analyse par Western blot de protéines membranaires d'ovocytes contrôle (pistes a), d'ovocytes exprimant le xCIC-5 (pistes b) et d'ovocytes exprimant le xCIC-3 (pistes c). 15 μ g de protéines ont été séparés par SDS-PAGE (7,5% d'acylamide) et incubés pendant deux heures avec les IgG du sérum immun du lapin 62 (1/1500ème) avec ou sans un excès de peptide C-terminal (contre lequel les IgG sont dirigés) (0,7 μ g/ml) ou bien avec les IgG du sérum préimmun du même lapin (1/1500ème). (B) détermination de la spécificité des anticorps anti-xCIC-5 (IgG SF 62) en Western blot (comme ci-dessus) sur des protéines membranaires préparées à partir d'ovocytes contrôle ou exprimant les protéines rCIC-3, rCIC-4 ou rCIC-5.

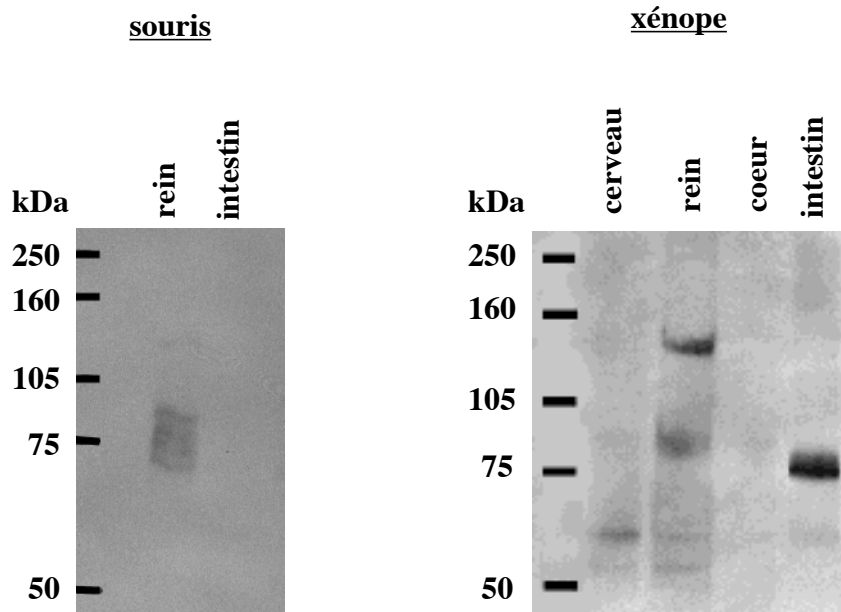


Figure 44: Immunodétection du CIC-5 endogène dans divers organes de souris (rein et intestin) et de xénope (cerveau, rein, coeur et intestin). 40 μ g de protéines membranaires ont été séparés par SDS-PAGE (7,5% d'acrylamide) et analysés par Western blot avec les anticorps anti-xCIC-5 (IgG SF 62) au 1/1500ème (incubation de 15 heures à 4°C).

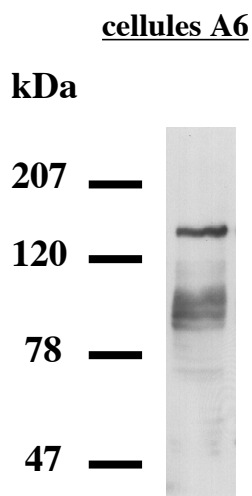


Figure 45: Immunodétection du xCIC-5 endogène des cellules A6. 40 μ g de protéines membranaires ont été séparés par SDS-PAGE (7,5% d'acrylamide) et analysés par Western blot avec les anticorps anti-xCIC-5 (IgG SF 62) au 1/1500ème (incubation de 15 heures à 4°C).

CIC-5 à un niveau inférieur au seuil de détection.

Chez le xénope, des bandes à environ 85 kDa sont présentes dans les préparations membranaires d'intestin et de rein. Des bandes de faible intensité sont détectées au même niveau dans le coeur et le cerveau. La masse moléculaire de ces bandes correspond bien à celle du xCIC-5, légèrement plus élevée que celle de son homologue de mammifère. En effet, le xCIC-5 possède des acides aminés supplémentaires en N-terminal par rapport aux CIC-5 de mammifère (Lindenthal et al., 1997). Etant donné que l'affinité de nos anticorps est meilleure pour le xCIC-5 que pour le xCIC-3, les bandes détectées avec nos anticorps correspondent probablement au xCIC-5, mais nous ne pouvons pas exclure le marquage du xCIC-3 (dont la masse moléculaire est très proche, Lindenthal et al., en préparation) ou même d'un éventuel xCIC-4. Dans certaines préparations membranaires de rein et d'intestin de xénope, les anticorps révèlent aussi une bande à 160 kDa, qui correspond probablement à l'immunomarquage non-spécifique présent dans l'ovocyte de xénope. En effet, le niveau d'expression étant plus faible dans les organes, le marquage des protéines endogènes a nécessité des temps d'incubation plus longs (environ 15 heures). L'apparition de la bande non-spécifique de 160 kDa est liée à la longueur du temps d'incubation.

7.3. Localisation cellulaire

La lignée cellulaire A6, issue du rein de xénope, constitue un modèle d'étude des transports transépithéliaux et de la régulation du volume. Etant donné que les conductances au chlorure impliquées dans ces fonctions cellulaires ont été caractérisées, nous avons choisi d'examiner la localisation cellulaire du xCIC-5 sur cette lignée cellulaire. Bien que le clonage du xCIC-5 ait été réalisé sur les cellules A6, j'ai vérifié par Western blot que les cellules A6 expriment bien le xCIC-5 au niveau protéique. La **Figure 45** montre l'immunodétection de plusieurs bandes dont les masses moléculaires apparentes vont de 85 à 120 kDa. Comme sur les ovocytes et les organes, on observe la bande à 160 kDa. Ces bandes ne sont pas révélées par le sérum pré-immun du même lapin (résultat non illustré). D'après le profil des bandes révélées, il est plausible que l'on révèle différentes formes de xCIC-5. Par analogie avec nos résultats d'expression dans l'ovocyte, il pourrait s'agir de différentes glycoformes de xCIC-5 dans les cellules A6. Cependant, des expériences de déglycosylation enzymatique, analogues à celles menées sur l'ovocyte de xénope, seraient nécessaires pour établir définitivement l'existence de différentes glycoformes. Comme précédemment, nous ne pouvons pas exclure la possibilité d'une réaction croisée avec le xCIC-3, et peut être même avec le xCIC-4 (s'il existe), qui sont susceptibles de donner lieu à des profils de bandes très proches.

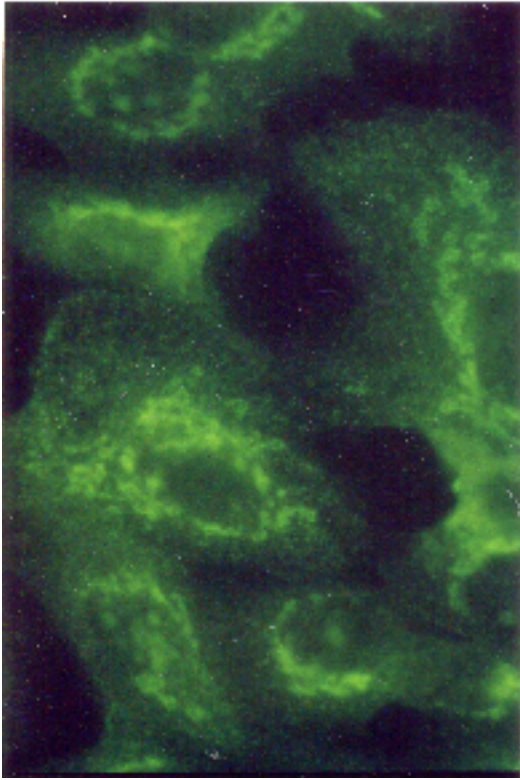
Les cellules A6 utilisées pour les expériences d'immunocytochimie, ont été cultivées sur des lamelles de verre ou bien sur des filtres, ce qui permet de comparer le signal immunodéTECTÉ sur des cellules non-polarisées et sur des cellules confluentes, constituant une monocouche polarisée. Sur des cellules A6 en croissance sur du verre, l'immunomarquage de 2 heures avec

l'anticorps anti-xCIC-5 au 1/20^{ème} met en évidence un marquage intracellulaire qui se localise essentiellement autour du noyau de la cellule (**Figure 46 A, B, C**). Sur la cellule au centre de la **Figure 46 C**, on observe particulièrement bien le caractère individuel et la forme sphérique des structures marquées. Il semble que le marquage porte sur la membrane d'organelles intracellulaires localisées autour du noyau. De plus, un marquage plus diffus est présent sur la totalité des cellules, mais à ce niveau de résolution il n'est pas possible de distinguer entre un marquage membranaire ou intracellulaire. On observe le même type de marquage sur des cellules A6 confluentes, lorsqu'elles sont cultivées sur verre (**Figure 46 E**) ou bien sur filtre (**Figure 46 G**). L'établissement de la polarité épithéliale ne semble donc pas influencer sur la localisation de la (ou des) protéine(s) détectée(s). La localisation péri-nucléaire des structures intracellulaires révélées a été confirmée à l'aide du marquage des noyaux par un agent intercalant (le Hoechst 33342). A titre d'exemple, la **Figure 46 F** illustre l'emplacement des noyaux correspondant à la **Figure 46 E**. Lorsqu'on réalise l'immunomarquage en présence d'un excès de peptide C-terminal, seule une faible autofluorescence des cellules est visible (**Figure 46 D, H**). Le peptide C-terminal entre donc en compétition avec la (ou les) protéine(s) marquée(s) par les anticorps. En raison du manque de spécificité de nos anticorps, nous n'avons pas la certitude absolue que ce marquage de compartiments intracellulaires péri-nucléaires correspond effectivement à la localisation du xCIC-5 dans les cellules A6. Nous ne pouvons pas exclure une reconnaissance simultanée du xCIC-3, certainement exprimé dans les cellules A6 (voir 2^{ème} partie). L'immunodétection de la protéine qui migre à 160 kDa est peu probable dans ces expériences car l'incubation avec les anticorps n'a duré que 2 heures, mais elle ne peut être totalement exclue.

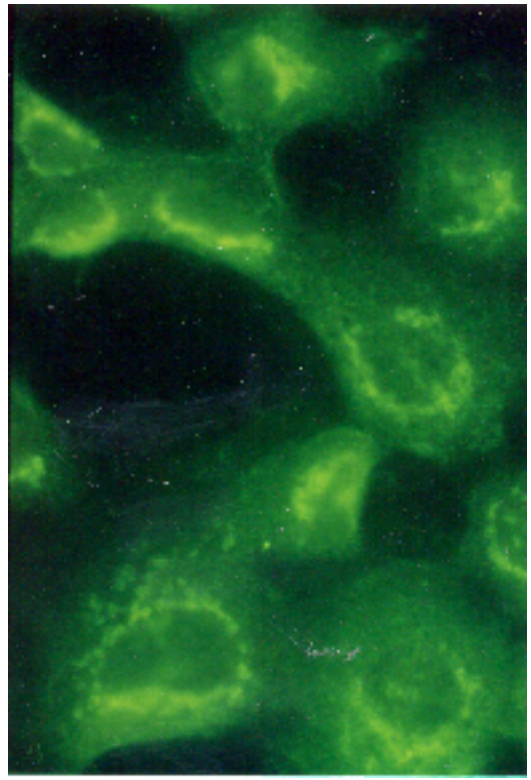
7.4. Discussion

En absence d'anticorps anti-xCIC-5 spécifiques, nous avons tenté d'examiner la distribution et la localisation du xCIC-5 avec nos anticorps en tenant compte du problème de spécificité que cela comporte. Les résultats obtenus demandent donc à être confirmés avec un autre anticorps. Cependant, la comparaison de nos résultats sur des tissus d'amphibien et de mammifère avec ceux obtenus par d'autres équipes sur des tissus de mammifère, en utilisant des anticorps anti-CIC-5 distincts, montre une forte cohérence dans les résultats.

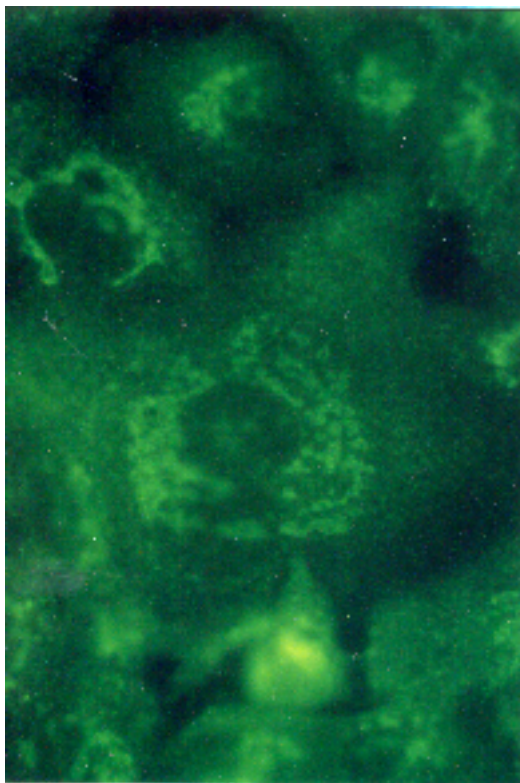
En ce qui concerne la distribution tissulaire, plusieurs études ont montré que l'ARNm du CIC-5 prédomine dans le rein chez le mammifère (Fisher et al., 1994; Steinmeyer et al., 1995; Sakamoto et al., 1996). Plus tard, Günther et al. (1998) confirmaient, au niveau protéique, que l'expression du CIC-5 de mammifère se faisait essentiellement dans le rein. Nous avons pu observer l'expression du CIC-5 dans le rein de souris. Par contre, dans l'intestin de souris, l'expression, si elle existe, n'est pas suffisamment forte pour être détectée avec nos anticorps. Nos observations sont donc en accord avec une expression majoritaire de CIC-5 de mammifère dans le rein. Par contre, chez le xénope, la distribution tissulaire de l'ARNm du xCIC-5 est plus



A: cellules A6 cultivées sur lamelles de verre + IgG SF 62 1/20ème



B: cellules A6 cultivées sur lamelles de verre + IgG SF 62 1/20ème

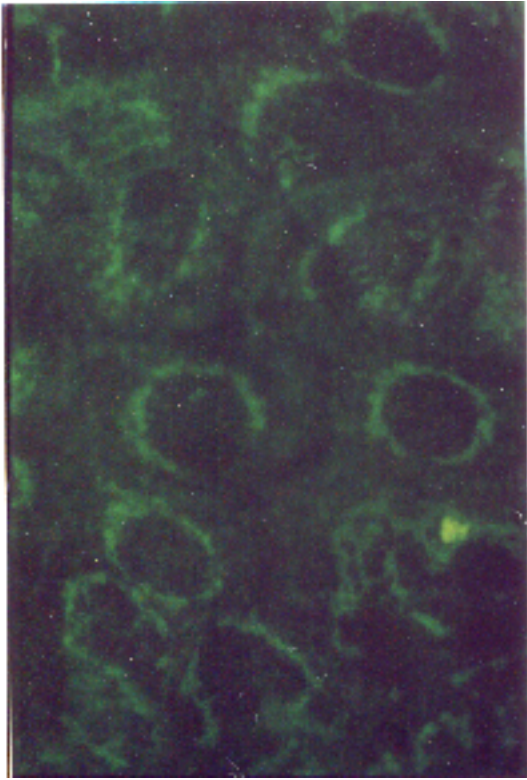


C: cellules A6 cultivées sur lamelles de verre + IgG SF 62 1/20ème

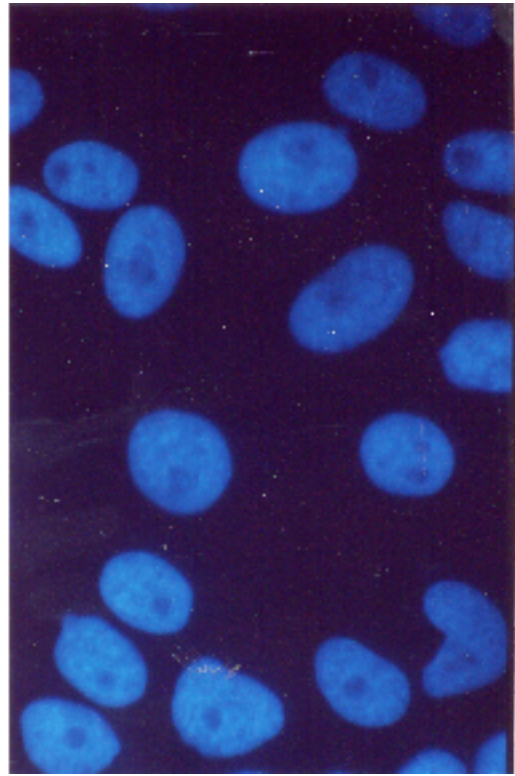


D: cellules A6 cultivées sur lamelles de verre + IgG SF 62 1/20ème + peptide C-terminal

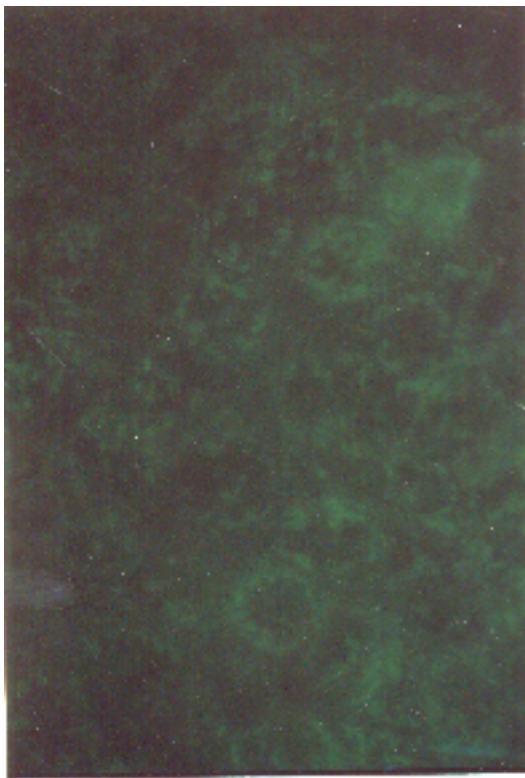
Figure 46: Expériences d'immunocytochimie sur les cellules A6 avec les anticorps anti-xCIC-5. Les cellules A6 ont été cultivées sur lamelles de verre (A-F) ou bien sur filtres (G,H). Les cellules sont fixées au paraformaldéhyde (4%) et perméabilisées au SDS (1%) et au Triton X-100 (0,3%). L'incubation avec les anticorps a duré 2 heures. Le peptide est utilisé à 50 μ g/ml. Grossissement x 1000.



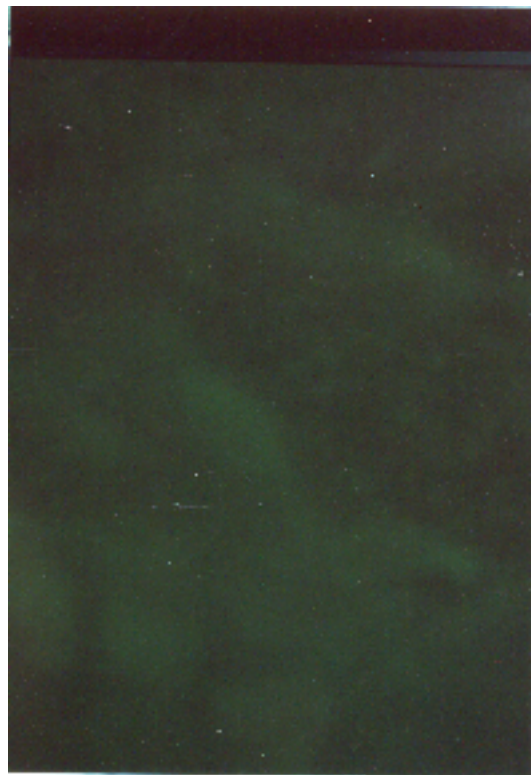
E: cellules A6 cultivées sur lamelles de verre + IgG SF 62 1/20ème



F: cellules A6 cultivées sur lamelles de verre + Hoechst 33342 à 1µg/ml (5 minutes)



G: cellules A6 cultivées sur filtres (clear) + IgG SF 62 1/20ème



H: cellules A6 cultivées sur filtres (clear) + IgG SF 62 1/20ème + peptide C-terminal

Figure 46 (suite)

large (Lindenthal et al., 1997) et cette distribution se retrouve au niveau protéique. Une large distribution tissulaire du CIC-5 a également été décrite chez le tilapia *Oreochromis mossambicus* (Miyazaki et al., 1999). Par conséquent, il semble qu'une distribution restreinte du CIC-5 soit apparue assez tardivement dans l'évolution. Lorsque la fonction du CIC-5 sera élucidée, il sera intéressant de s'interroger sur la signification de cette évolution du point de vue génétique et sur les conséquences sur le plan physiologique.

La localisation cellulaire du CIC-5 a fait l'objet de plusieurs études chez le mammifère (Günther et al., 1998; Luyckx et al., 1998; Devuyst et al., 1999). Ces études établissent que l'expression du CIC-5 dans le rein de rat a lieu au niveau cortical, ainsi qu'au niveau médullaire. Par diverses approches, les trois études montrent que le CIC-5 est présent dans les endosomes des cellules proximales. Le CIC-5 est également détecté dans les endosomes des cellules intercalaires au niveau des tubules collecteurs et dans le segment ascendant de la anse de Henlé. Il est actuellement établi que le CIC-5 est co-localisé avec les ATPases à protons dans les endosomes précoces, du côté apical, sous la bordure en brosse des cellules. D'après ces études, la présence du CIC-5 sur la membrane plasmique apicale est également possible. Nos expériences d'immunocytochimie sur les cellules A6 ont montré un marquage très net sur des compartiments intracellulaires et un marquage diffus, membranaire ou intracellulaire. Le marquage que nous avons obtenu sur les cellules A6, avec nos anticorps anti-xCIC-5, est donc proche de celui du CIC-5 dans le rein de rat. Nos résultats sont en effet compatibles avec une localisation essentiellement intracellulaire et éventuellement membranaire. Bien entendu, cette analogie de résultats est insuffisante pour établir la localisation du xCIC-5 dans les cellules A6 et des expériences complémentaires restent nécessaires. L'utilisation d'anticorps spécifiquement dirigés contre le xCIC-5 apparaît indispensable pour confirmer la localisation obtenue et le double marquage, par exemple avec les ATPases à protons, permettrait d'identifier la nature des endomembranes marquées.

En bref, le xCIC-5 semble avoir une distribution tissulaire assez large, comprenant notamment le rein et l'intestin, alors que chez le mammifère, la distribution du CIC-5 apparaît prédominante dans le rein uniquement. Chez le rat, le CIC-5 est localisé au niveau des endosomes précoces dans le tubule proximal et la branche ascendante de la anse de Henlé, ainsi que dans les cellules intercalaires du tubule collecteur. D'après nos expériences menées sur les cellules A6, le xCIC-5 semble également localisé au niveau de compartiments intracellulaires. Cependant, des expériences complémentaires sont nécessaires pour confirmer la localisation intracellulaire du xCIC-5 et pour identifier la nature des compartiments intracellulaires en question.

8. Vers un modèle fonctionnel du CIC-5

8.1. CIC-5 et pathologies rénales

L'importance physiologique des canaux en général est également illustrée par les pathologies associées à leur dysfonctionnement (*channelopathies*) (Ackerman and Clapham, 1997; Lehmann-Horn and Rüdell, 1997). L'identification de mutations sur le gène codant pour un canal, associées à des phénotypes pathologiques, a largement contribué à la détermination du rôle physiologique du canal en question. A titre d'exemple, on peut citer la mucoviscidose, qui est basée sur le défaut génétique du gène codant pour le canal chlorure CFTR. L'implication du CFTR dans le transport transépithélial a été étudiée dès l'identification de son gène, du fait de la connaissance de la symptomatologie de la maladie. La présence de diverses mutations portant sur le gène CIC-1, dans le génome de patients atteints de diverses myopathies (myotonie de Thomsen et myotonie de Becker) a permis rapidement d'identifier le CIC-1 comme le canal chlorure majoritaire du muscle squelettique, impliqué dans la stabilisation du potentiel de membrane. De même, le syndrome de Bratter et le syndrome de Gittelman observés chez les porteurs de CIC-Kb mutés ont permis d'identifier le rôle du CIC-Kb dans le transport transépithélial de chlorure dans le rein.

Des mutations de divers types portant sur le gène du CIC-5 (**Figure 47**) ont été trouvés chez des patients manifestant quatre symptomatologies assez proches connues sous le nom de maladie de Dent (Pook et al., 1993; Wrong et al., 1994), XRN (*X-linked recessive nephrolithiasis*) (Frymoyer et al., 1991), XLRH (*X-linked recessive hypophosphatemic rickets*) (Bolino et al., 1993) et JILP (*idiopathic low molecular weight proteinuria of japanese children*) (Lloyd et al., 1997). Ces pathologies rénales se présentent comme des variantes autour de deux symptômes communs: la protéinurie des protéines de faible poids moléculaire (*low molecular weight proteinuria*, LMWP) et l'hypercalciurie, responsable de calculs rénaux produisant une néphrocalcinose, qui peut à terme provoquer un blocage rénal. Les autres symptômes, qui diffèrent dans chacune des quatre pathologies, sont résumés dans le **Tableau 12**. Comme ces syndromes ont une origine moléculaire commune elles ont finalement été regroupées sous le nom de XLHN (*X-linked hypercalciuric nephrolithiasis*) (pour revue, voir Scheinman, 1998). La question qui se pose alors est: comment le dysfonctionnement du CIC-5 peut-il se traduire par des symptômes aussi variées sur le plan patho-physiologique?

	Codon	Base change	Amino acid change	Predicted effect	Expression	Source	Phenotype*
Missense							
1	57	GGC→GTC	Gly→Val	D1 helix	Reduced	U.S.A.	1,2,3,4
2	200	CTG→CGG	Leu→Arg	D3 charge distribution	Abolished	U.K.	1,2,3,4,5
3	244	TCG→TTG	Ser→Leu	D5 helix	Reduced	Italy	2,3,4,5
	244	TCG→TTG	Ser→Leu	D5 helix		France	1,2,5
4	280	CGT→CCT	Arg→Pro	at border of D6	Reduced	Japan	1,2,3
5	306	GGG→GAG	Gly→Glu	D11 charge distrib	Abolished	U.S.A.	1,2,3,4
6	512	GGT→CGT	Gly→Arg	D11 charge distrib	Abolished	U.S.A.	1,2,3,4
7	520	TCT→CCT	Ser→Pro	D11 helix	Reduced	U.K.	1,2,3,4,5
8	527	GAA→GAT	Glu→Asp	?[highly conserved]	Abolished	India	1,2,3,4,5
Nonsense							
9	279	TGG→TGA	Trp→Stop	Lose 467 aa	Abolished	U.K.	1,2,3,4
	279	TGG→TGA	Trp→Stop	Lose 467 aa		Japan	1,2,3
10	343	TGG→TAG	Trp→Stop	Lose 404 aa		Japan	1,2,3
11	347	CGA→TGA	Arg→Stop	Lose 399 aa		Japan	1
12	648	CGA→TGA	Arg→Stop	Lose 98 aa	Abolished	U.K.	1,2,3,4,5
	648	CGA→TGA	Arg→Stop	Lose 98 aa		Italy	1,2,3,4
13	704	CGA→TGA	Arg→Stop	Lose 42 aa	Abolished	Canada	1,3,4
Insertion							
14	30	ACC in-frame insertion	30:H insertion	?charge distrib	Reduced	U.K.	1,2
Splice-site							
15	132-172 del	gt→gg	Lose 41 amino acids	Lose D2	Abolished	U.K.	1,2,3,4,5
16	132-172 del	gt→at	Lose 41 amino acids	Lose D2	Abolished	U.K.	1,2,3,4
Deletions							
17	132-241 (2 kb) (ns.) entire gene (515 kb)		Lose 110 amino acids Protein absent	Lose D2-D4 No protein	Abolished	U.K.	1,2,3,4,5
18	695	ΔC	Δ695fs→699 Stop	Lose 47 aa		Japan	1,2,3

* Phenotypic features: 1 = LMW proteinuria; 2 = hypercalciuria; 3 = nephrocalcinosis/stones; 4 = renal insufficiency; 5 = rickets

* Clinical data from Prof. Oliver Wong, personal communication

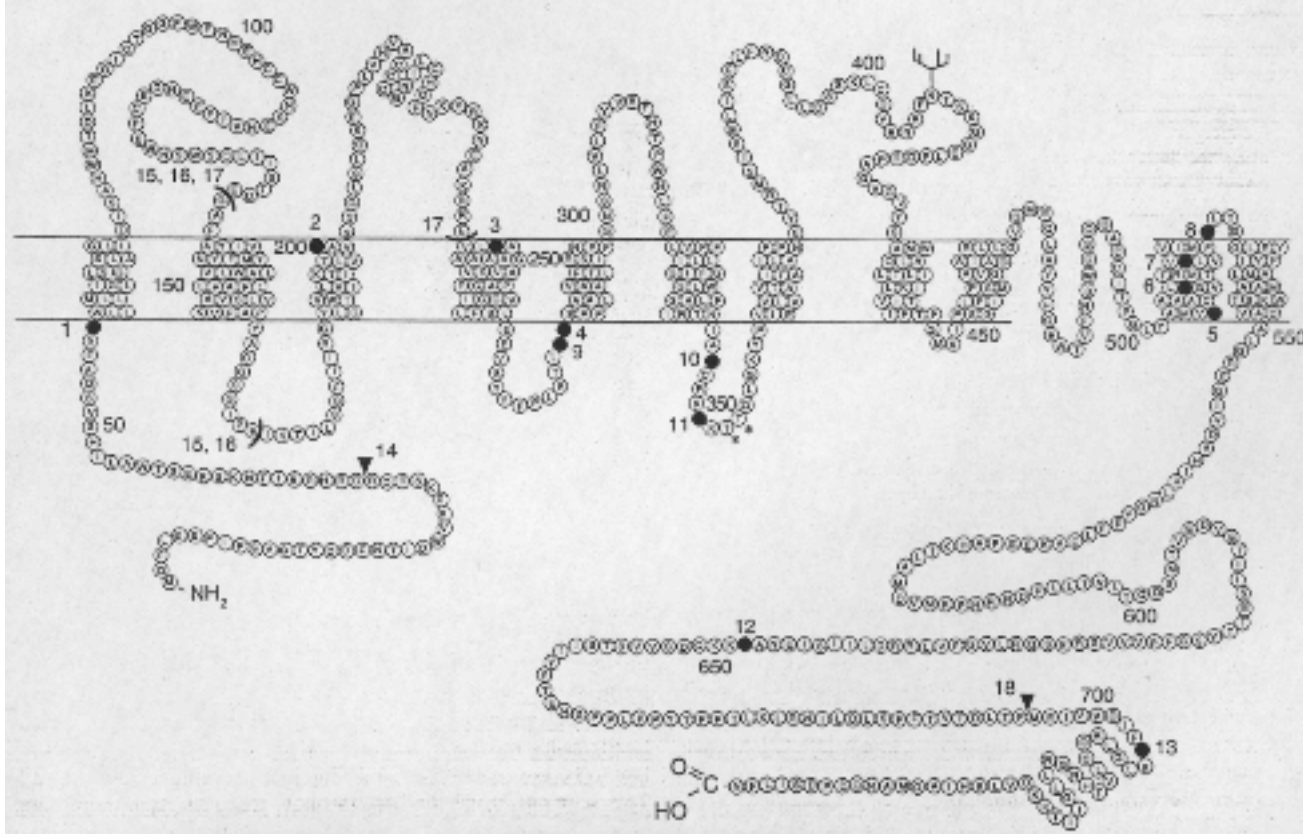


Figure 47: Récapitulatif des différentes mutations portant sur le gène hCIC-5, impliquées dans l'apparition de néphrolithiases, et localisation des mutations sur le modèle topologique du hCIC-5. D'après Scheinman, 1998.

Symptomes	maladie de Dent	XRN	XLRH	JILP
protéinurie	+	+	+	+
hypercalciurie	+	+	+	+
néphrocalcinose	+	+	+	+
calculs calciques	+	+	-	-
blocage rénal	+	+	+	-
prédominance mâle	+	+	+	+
rachitisme	+	-	+	-
mutations du CIC-5	+	+	+	+

Tableau 12: Symptomatologies des différents syndromes associées aux mutations du hCIC-5. D'après Scheinman et al., 1998.

8.2. Apports de la caractérisation fonctionnelle du CIC-5

Les différentes études d'expression fonctionnelle ont identifié le CIC-5 comme une protéine canal, responsable d'une conductance anionique dépendante du voltage. La conductance se caractérise par une forte rectification sortante, une sélectivité anionique de type $Cl^- > I^-$ et l'absence de pharmacologie. L'ensemble de ces caractéristiques n'a pas permis de faire le rapprochement avec une conductance décrite dans la littérature. L'absence de pharmacologie est plutôt inhabituelle et l'extrême rectification sortante constitue également une intrigue. En apparence, le canal est actif à des voltages positifs, mais quasiment inactif aux voltages physiologiques des membranes plasmiques. Il est possible que les caractéristiques du courant observé (rectification, pharmacologie,...) dépendent d'un co-facteur ou d'une sous-unité, absente dans les systèmes d'expression utilisés. En effet, une étude a montré que la co-expression de CIC-1 et de CIC-2 dans l'ovocyte de xénope était capable d'induire la formation de canaux hétéromultimériques responsable de l'apparition d'une conductance nouvelle aux propriétés distinctes (Lorenz et al., 1996). Cependant, les expériences de co-expression du CIC-5 et du CIC-3 n'ont pas donné lieu à un résultat similaire (Steinmeyer et al., 1995).

8.3. Apports des études de localisation tissulaire et cellulaire

Chez l'homme, l'expression du CIC-5 est prédominante dans le rein et son dysfonctionnement perturbe la fonction rénale. Les études de localisation du CIC-5 dans le rein de rat ont montré qu'il est exprimé au niveau des endosomes précoces dans le tubule proximal et la branche ascendante de la anse de Henlé, ainsi que dans les cellules intercalaires du tubule collecteur. De plus, il ressort de ces expériences que le CIC-5 est co-localisé avec l'ATPase à

protons, responsable du transport de H^+ . Les endosomes nouvellement formés sont acidifiés par pompage de H^+ vers la lumière de l'endosome par le fonctionnement d'une ATPase à protons. L'accumulation des charges positives dans l'endosome s'oppose au fonctionnement de l'ATPase, à moins que le transport de protons ne s'accompagne d'un transport simultané de charges négatives. Dans le modèle initialement proposé par Günther et al. (1998), le ClC-5 constituerait la conductance anionique qui permet l'acidification électroneutre des endosomes précoces (**Figure 48**). Dans ce modèle, l'inhibition du ClC-5 par le pH acide pourrait jouer le rôle d'un rétrocontrôle négatif qui limiterait l'acidification des endosomes et permettrait d'en fixer le pH (Friedrich et al., 1999). Au niveau du tubule rénal, les endosomes sont impliquées dans la réabsorption et la dégradation des protéines (de faible poids moléculaire) qui ont passé le filtre glomérulaire. L'endocytose et la protéolyse dépendent de l'acidification de la lumière endosomale. Le dysfonctionnement de l'un des transporteurs impliqués dans le processus d'acidification des endosomes se répercute donc sur l'élimination des protéines de l'urine par réabsorption et dégradation. Ainsi, le modèle proposé permet d'expliquer l'apparition d'une protéinurie chez les individus porteurs de mutations invalidantes au niveau du gène du ClC-5.

Plusieurs études ont décrit des conductances anioniques au niveau des endosomes (Sabolic and Burckhardt, 1986; van Dyke, 1988), mais l'identité moléculaire n'en est pas encore élucidée. Le ClC-5 pourrait constituer cette conductance. En effet, Sabolic et Burckhardt (1986) ont observé une conductance anionique, dans le tubule proximal, dont la sélectivité anionique correspond à celle du ClC-5.

Les potentiels de membrane des compartiments intracellulaires sont mal connus, mais l'acidification intravésiculaire par le fonctionnement de l'ATPase à protons devrait se traduire par un potentiel intravésiculaire positif, ce qui correspond à un potentiel intracellulaire négatif. Or, l'activité électrique du ClC-5 est fortement réduite dans les voltages négatifs. Mis à part la possibilité de l'existence d'une sous-unité additionnelle au ClC-5 qui permettrait de modifier sa dépendance du voltage, il a été suggéré que les courants chlorure, même faibles, seraient suffisants pour permettre le fonctionnement de l'ATPase à protons (Friedrich et al., 1999). En effet, il est connu que le débit à travers un canal est environ 1000 fois plus important que celui à travers un transporteur actif.

8.4. Apport des modèles animaux transgéniques

Si le modèle, impliquant le ClC-5 dans l'acidification des endosomes précoces, fournit une explication pour la protéinurie observée dans les pathologies associées aux mutations du ClC-5, il ne permet pas d'expliquer les autres symptômes observés. Récemment, une lignée de souris possédant une expression réduite de ClC-5 a été établie (Luyckx et al., 1999). Une étude menée sur ces animaux hypercalciuriques a consisté à une privation d'apport calcique par l'alimentation. Dans ce cas, les souris ne présentent plus l'hypercalciurie observée sur les animaux ayant un apport en calcium normal (Luyckx et al., 1999). A la suite de cette observation,

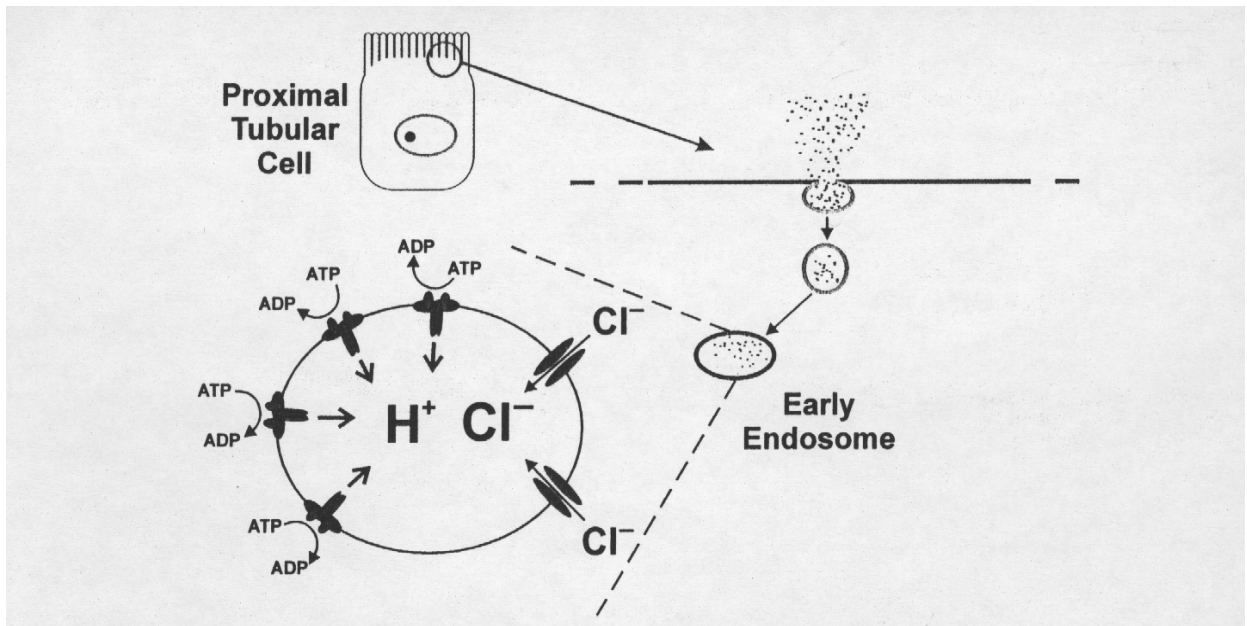


Figure 48: Mécanismes de transport ionique impliqués dans l'acidification des endosomes précoces au niveau des cellules proximales du tubule rénal (schéma emprunté à George, 1998).

les auteurs suggèrent que l'hypercalciurie aurait pour origine une hyperabsorption au niveau gastrointestinal plutôt qu'une fuite calcique au niveau rénal. A ce propos, il est intéressant de rappeler que nos expériences montrent la présence de la protéine xCIC-5 au niveau intestinal chez le xénope.

D'autres expériences sur ce modèle animal, et peut être d'autres modèles animaux en cours d'établissement (comme par exemple *Caenorhabditis elegans*, voir Schriever et al., 1999), permettront à l'avenir d'éclaircir la localisation et la fonction du CIC-5 au niveau gastrointestinal.

RESULTATS & DISCUSSION

B. Expression et distribution du CIC-3

1. Caractéristiques moléculaires du xCIC-3

La stratégie de clonage par homologie réalisée au laboratoire a permis d'isoler un deuxième ADNc de la famille des CIC à partir de la lignée cellulaire A6 (Lindenthal et al., en préparation). Cet ADNc comporte une phase ouverte de lecture de 2373 paires de bases. Les deux premiers codons ATG entrent dans les critères de Kozak (1991) et constituent ainsi des codons initiateurs potentiels. Si on considère que la protéine correspond à la phase ouverte de lecture la plus longue, la protéine est constituée de 791 acides aminés et possède une masse moléculaire calculée de 88 kDa (**Figure 49**). L'analyse d'hydrophobicité selon Kyte et Doolittle (1982) montre que le xCIC-3 possède des régions hydrophobes fortement homologues aux régions hydrophobes d'autres membres de la famille des CIC. Le xCIC-3 semble donc partager l'organisation structurale en 10-12 domaines transmembranaires, caractéristique de la famille des CIC (**Figure 50**). L'examen de la séquence protéique montre que le xCIC-3 porte quatre sites potentiels de N-glycosylation en Asn-39, Asn-424, Asn-452 et Asn-658. Cependant, d'après le modèle topologique proposé seul Asn-424 et Asn-452 seraient localisés dans des régions extracellulaires. Le xCIC-3 possède également des sites consensus pour la phosphorylation par les protéine kinases dépendantes de l'AMPc (PKA) et du GMPc¹ (PKG) aux positions 25, 78, 83/84, 390/391 et 682, ainsi que des sites consensus de phosphorylation par la protéine kinase C (PKC) aux positions Ser-82, Ser-291, Thr-589, Ser-673, Ser-702, Ser-718, Thr-721 et Thr-769. Le xCIC-3 doit son nom à sa forte homologie de séquence avec les autres protéines CIC-3 isolées chez différentes espèces (**Tableau 13**). Comme le xCIC-3 fait partie de l'embranchement CIC-3/4/5 de la famille des CIC, les homologies de séquence nucléotidique avec les autres membres de cet embranchement sont également élevées.

	% d'homologie	Références
humain	91%	Borsani et al., 1995
souris	94%	Borsani et al., 1995
rat	94%	Kawasaki et al., 1994
cochon d'Inde	89%	Duan et al., 1997
tilapia²	89%	Miyazaki et al., 1999

Tableau 13: Pourcentages d'homologie de séquence nucléotidique entre le xCIC-3 et les CIC-3 chez différentes espèces. Les références citées correspondent aux publications des séquences nucléotidiques des CIC-3 des différentes espèces.

¹ guanosine 3', 5'-cyclique monophosphate

² Le tilapia est un poisson téléostéen euryhalin. La protéine OmCIC-3 utilisée pour la comparaison est issue des branchies de *Oreochromis mossambicus*.

2. Expression (fonctionnelle?) du xCIC-3

Après avoir réalisé avec succès l'expression fonctionnelle du xCIC-5 dans l'ovocyte de xénope, nous avons choisi d'utiliser ce système d'expression homologue pour exprimer le xCIC-3 et étudier son activité électrique.

2.1. Approche électrophysiologique

La séquence codant pour le xCIC-3 a été sous-clonée dans le vecteur d'expression utilisé auparavant pour l'expression du xCIC-5 dans l'ovocyte de xénope. Dans cette construction plasmidique l'insert est placé entre les séquences non-codantes de la β -globine de xénope. De plus, un site consensus Kozak (1991) a été introduit en amont du codon initiateur de la traduction. Des ARNc du xCIC-3 ont été synthétisés *in vitro* et injectées, à raison de 15 et 35 ng par ovocyte, dans les ovocytes de xénope. Les ovocytes ont été analysés, avec un protocole de voltage-clamp en double microélectrodes, 3 à 5 jours après l'injection des ARNc (11 ovocytes de trois lots différents). La conductance des ovocytes injectés avec les ARNc ne présente pas de différence significative par rapport à celle des ovocytes contrôle.

L'expression fonctionnelle des homologues de rat, rCIC-3, et de cochon d'Inde, gpCIC-3, dans les fibroblastes NIH/3T3 a donné lieu à des conductances anioniques activées par le choc hypo-osmotique (Duan et al., 1997 et 1999) et inhibées par la protéine kinase C (Kawasaki et al., 1994 et 1995, Duan et al., 1997). Afin de tester l'expression fonctionnelle du xCIC-3 dans les ovocytes injectés avec les ARNc, nous avons alors essayé de stimuler la conductance par ces procédures. Les ovocytes ont été soumis à un milieu hypo-osmotique pendant 30 minutes ou à un traitement avec 500 nM de staurosporine (inhibiteur de la protéine kinase C) pendant 5 minutes. Dans aucun cas, les courants mesurés n'ont pu être distingués significativement de ceux observés sur les ovocytes contrôles.

Nous avons ensuite envisagé la possibilité que la traduction de la protéine xCIC-3 soit initiée à partir du deuxième codon ATG. Nous avons donc sous-cloné la séquence codante à partir du second ATG dans le même vecteur d'expression et injectés les ARNc correspondants. Comme précédemment, nous n'avons pas pu mettre en évidence une conductance nouvelle sur les ovocytes injectés avec ces ARNc.

2.2. Traduction *in vitro* des constructions plasmidiques

En absence d'expression fonctionnelle des ARNc injectés dans les ovocytes, il nous semblait important de vérifier la synthèse protéique à partir de nos constructions plasmidiques. La traduction a été réalisée *in vitro* à partir des deux constructions, présentant la séquence

```

xClC-3          MDISSDP          YLPYDGGGDNIPLRDL
hClC-3 MESEQLFHRGYRNSYNSITSA---EELLDGAGVIMDFQTSEDDNLDDGD

xClC-3 HKRGRTHYTVTNGGAINSTTHLLDLLDEPIPGVGTYYDDFHTIDWVREKCKD
gpClC-3 --M---S---S-----
mClC-3 M---S---S-----
hClC-3 TAV---M---S---S-----

xClC-3 RERHRRINSKKKESAWELAKSLYDAWSGWLVLTLTGLASGALAGFIDIAA
gpClC3 -----MT-----V-----L-----
mClC-3 -----MT-----V-----L-----
hClC-3 -----MT-----V-----L-----

xClC-3 DWMADLKEGICMTAFWFNHEQCCWDSKEATFEERDKCPQWQTWADLIGQ
gpClC-3 ---T-----LS-L-Y-----G-N-T-----K---E-----
mClC-3 ---T-----LS-L-Y-----G-N-T-----K---E-----
hClC-3 ---T-----LS-L-Y-----G-N-T-----K---E-----

xClC-3 AEGPGSYIMNYFMYIFWALSFAFLAVCLVEVFAPYACGSGIPEIKTILSG
gpClC-3 -----I-----S---K-----
mClC-3 -----I-----S---K-----
hClC-3 -----I-----S---K-----

xClC-3 FIIRGYLGKWTLMIKTITLVLAVASGLSLGKEGPLVHVACCGNIFSYLF
gpClC-3 -----
mClC-3 -----
hClC-3 -----

xClC-3 PKYSTNEAKKREVLSAASAAGVSVAFGAPIGGVLFSLLEEVSYFFPLKTLW
gpClC-3 -----G-----
mClC-3 -----
hClC-3 -----

xClC-3 RSFFAALVAAFVLRSLNPFNSRLVLFYVEYHTPWYLFELIPFILLGVFG
gpClC-3 -----F-----
mClC-3 -----F-----
hClC-3 -----F-----

xClC-3 GLWGAFIRANIAWCRRRKSTRFGRYPVLEVIAVAAITAI IAFPNPYTRF
gpClC3 -----K--K-----I-----V---RY---L
mClC-3 -----K--K-----I-----V---L
hClC-3 -----K--K-----I-----V---L

xClC-3 NTSQLIKELFTDCGPLLESSSLCDYKNDMNASKIVDDIPDRPAGTGVYSAI
gpClC-3 ---E-----R-----V-----
mClC-3 ---E-----R-----V-----
hClC-3 ---E-----R-----I-----

xClC-3 WQLCLALVFKIIMTVFTFGIKVPSGLFIP SMAIGA IAGRIVGIAVEQLAY
gpClC-3 -----I-----
mClC-3 -----I-----
hClC-3 -----I-----

xClC-3 YHHDWFIFKEWCEVGADCITPGLYAMVGAAACLGGVTRMTVSLVVIVFEL
gpClC-3 F-----S-----
mClC-3 -----
hClC-3 -----

xClC-3 TGGLEYIVPLMAAVMTSKWVGDAFGREGIYEAHIRLNGYPFLDAKEEF
gpClC-3 -----SW-----
mClC-3 -----
hClC-3 -----EF-----

xClC-3 THTTLARDVMRPRRNDPPLAVLTQDDMTVDDVESLINDTSYNGFPVIMSK
gpClC-3 -P---A---G-S-----N---I-NM--E-----
mClC-3 -A---S-----N---I-NM--E-----
hClC-3 -A-----N---I-NM--E-----

xClC-3 ESQRLVGFALRRDLTLAIENARKKQDGIVGSSRVCFAQHTPSLPAESPRP
gpClC-3 -----I---S---G-----P
mClC-3 -----I---S---E-----P
hClC-3 -----I---S---E-----P

xClC-3 LKLSILDMSPFVTVDQTPMEIVVDIFRKLGLRQCLVTHNGRLLGIITKK
gpClC-3 -----H-----
mClC-3 -----H-----
hClC-3 -----H-----

xClC-3 DILRHMAQMANHDPESILFN
gpClC-3 -----T--Q--A--M--
mClC-3 -----T--Q--A--M--
hClC-3 -----T--Q--A--M--

```

Figure 49: Alignement des séquences d'acides aminés des protéines ClC-3 du xénope (x), du cochon d'Inde (gp), de la souris (m) et de l'homme (h). Les tirets représentent des acides aminés identiques qu'au dessus, laissant apparaître uniquement les différences. La séquence nucléotidique du xClC-3 est déposée à la banque de données de la GenBank/European Molecular Biology Laboratories sous le N° ACY09941.

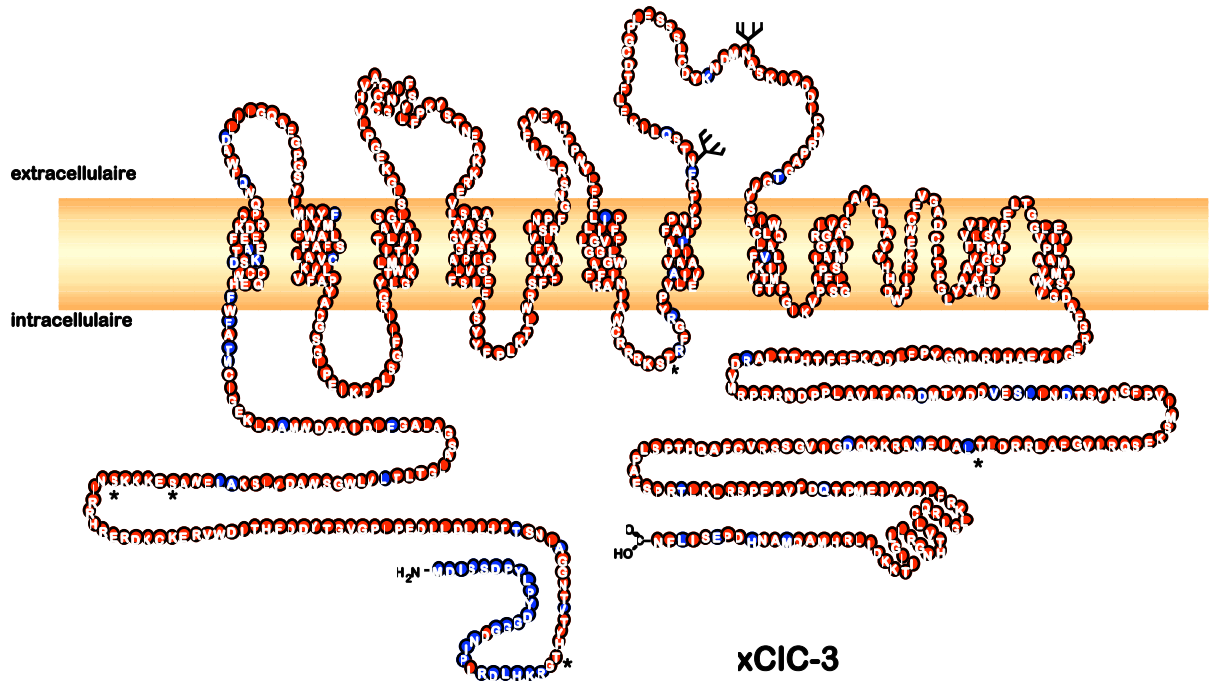


Figure 50: Modèle topologique proposé pour le xClC-3. Les extrémités N- et C-terminales seraient intracellulaires. Le modèle permet de distinguer les acides aminés identiques (en rouge) et différents (en bleu) par rapport à ceux de la protéine hClC-3. Deux sites de N-glycosylation potentiels sont indiqués sur des boucles extracellulaires. Des étoiles marquent la localisation de sites potentiels de phosphorylation.

codante du xCIC-3, initiée à partir du premier ou du second codon ATG. La **Figure 51** montre l'autoradiographie des produits de traduction *in vitro* radioactifs obtenus. La construction contenant la séquence codante la plus longue (commençant au premier ATG) donne lieu à une protéine qui migre à environ 80 kDa ce qui est légèrement inférieur à la masse moléculaire calculée du xCIC-3 (88 kDa). La migration de protéines contenant de nombreuses régions hydrophobes est souvent accélérée sur gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes. La construction plasmidique contenant la séquence tronquée (commençant au second ATG) donne également lieu à la synthèse d'une protéine dont la masse moléculaire apparente est 55 kDa. La migration de cette protéine est davantage accélérée, ce qui peut s'expliquer par une proportion de régions hydrophobes accrue dans la protéine tronquée. Les constructions plasmidiques présentant les séquences codant pour le xCIC-3, à partir du premier ou du deuxième ATG, permettent donc la synthèse *in vitro* des protéines correspondantes.

2.3. Immunodétection du xCIC-3 dans l'ovocyte de xénope

Pour vérifier l'expression de la protéine xCIC-3 dans les ovocytes injectés avec les ARNc, nous avons fait développer des anticorps anti-xCIC-3 chez deux lapins (lapins 65 et 120). Ces anticorps polyclonaux sont dirigés contre les 14 acides aminés de l'extrémité C-terminale du xCIC-3 (AQMANHDPESILFN). L'antisérum du lapin 65 a été purifié en deux étapes. Les IgG totaux ont été obtenus par précipitation des protéines sériques à l'acide caprylique, puis les IgG spécifiques du peptide C-terminal ont été retenus sur une colonne d'affinité et élués par du HCl 0,1N. Les IgG spécifiques de l'antisérum du lapin 120 ont été directement purifiés sur colonne d'affinité.

J'ai alors utilisé ces deux lots d'anticorps anti-xCIC-3 pour déterminer si la protéine xCIC-3 est synthétisée dans les ovocytes injectés avec les ARNc du xCIC-3 (séquence complète). Etant donné que le peptide C-terminal du xCIC-3 ne diffère de celui du xCIC-5 que par deux acides aminés, les anticorps anti-xCIC-3 ont été testés sur des ovocytes exprimant le xCIC-5 afin de déterminer leur spécificité. La **Figure 52** montre l'analyse par Western blot, des préparations membranaires d'ovocytes contrôle et d'ovocytes injectés avec les ARNc du xCIC-5 ou du xCIC-3, avec nos deux lots d'anticorps purifiés. Les anticorps issus du lapin 65 révèlent une bande de masse moléculaire apparente d'environ 105 kDa, ainsi qu'une bande d'intensité plus faible migrant à 85 kDa (**Figure 52 A**). Avec certaines préparations membranaires nous avons également pu observer l'immunodétection d'une bande de masse moléculaire supérieure à 200 kDa. Le même profil de bandes est observé avec les anticorps issus du lapin 120 (**Figure 52 B**). Aucune de ces bandes n'est observée avec les ovocytes contrôle, ou bien après incubation des anticorps avec le peptide C-terminal du xCIC-3 (**Figure 52 A**). L'ensemble de ces résultats suggère que les bandes immunodétectées correspondent à la protéine xCIC-3 synthétisée par l'ovocyte de xénope à la suite de l'injection des ARNc. Les différentes formes protéiques révélées pourraient correspondre à différentes glycoformes de la protéine. Des expériences de

déglycosylation permettant de tester cette hypothèse sont décrites plus loin (voir paragraphe 2.4.). L'injection des ARNc du xCIC-3 permet donc l'expression de la protéine, mais sa fonction n'a pas pu être détectée.

En ce qui concerne la spécificité de nos deux lots d'anticorps, on peut faire plusieurs observations. D'abord, dans ces conditions d'utilisation (incubation de 2 heures sur 15 à 25 μ g de protéines par piste) les deux lots d'anticorps anti-xCIC-3 ne révèlent aucun signal dans les ovocytes contrôle. Par conséquent, il n'y a pas de reconnaissance non-spécifique avec les préparations membranaires d'ovocyte de xénope. Ensuite, on remarque que les deux lots d'anticorps reconnaissent également la protéine xCIC-5 exprimée dans l'ovocyte. Ceci s'explique par la forte homologie de séquence des protéines xCIC-3 et xCIC-5 dans leur région C-terminale, contre laquelle sont dirigés les anticorps. Pour les anticorps du lapin 65, la réaction croisée avec le xCIC-5 est quasiment négligeable, mais elle est appréciable pour les anticorps du lapin 120. Par conséquent, nos anticorps sont utilisables pour étudier le xCIC-3 surexprimé dans un système cellulaire. Par contre, pour étudier le xCIC-3 exprimé naturellement dans des tissus ou lignées cellulaires, seul les anticorps du lapin 65 sont utilisables avec des réserves.

2.4. Mise en évidence de différents glycoformes de xCIC-3

La séquence protéique du xCIC-3 contient quatre sites de N-glycosylation. D'après le modèle topologique proposé, seul les sites Asn-424 et Asn-452 sont localisés sur des boucles extracellulaires et sont donc susceptibles d'être glycosylées au cours de la maturation de la protéine. L'immunodétection du xCIC-3 exprimé dans l'ovocyte a montré l'existence d'au moins deux formes protéiques de masses moléculaires apparentes distinctes. L'immunodétection du xCIC-5 dans l'ovocyte a également révélé plusieurs formes protéiques, qui se sont avérées être des glycoformes de la protéine. J'ai donc mené des expériences de déglycosylation enzymatique similaires à celles réalisées auparavant, dans le cadre de la caractérisation du xCIC-5.

Deux traitements déglycosylants ont été employés:

- * le traitement au mélange N-glycosidase F/ endoglycosidase F, qui clive tous les N-glycanes portés par les protéines;
- * le traitement à l'endoglycosidase H, qui coupe uniquement les groupements mannose de haut poids moléculaire, caractéristiques des protéines core-glycosylées, en cours de maturation et localisé entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi (**Figure 35**).

La **Figure 53** montre l'analyse par Western blot des préparations membranaires d'ovocytes injectés depuis 4 jours avec les ARNc du xCIC-3. A la suite du traitement au mélange enzymatique, on n'observe plus de signal à 85 et 105 kDa mais une bande d'intensité plus forte à 82 kDa (**Figure 53 A**). Ceci suggère qu'une forme protéique unique est obtenue après la coupure enzymatique des N-glycanes. La masse moléculaire apparente de cette forme protéique est légèrement plus faible que la masse moléculaire calculée du xCIC-3 ne portant pas de

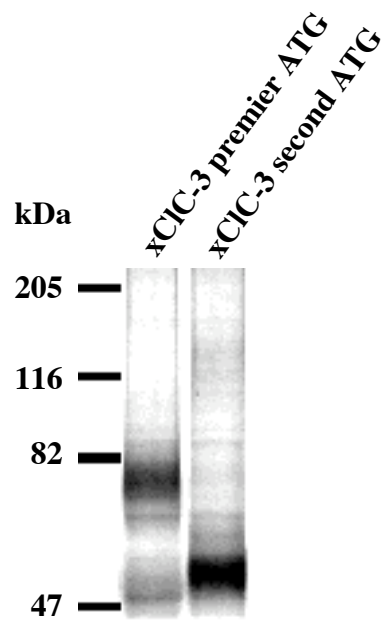


Figure 51: Traduction *in vitro* de l'ADNc du xCIC-3, initié à partir du premier ou du second codon ATG. Les ADNc ont été traduits *in vitro* en présence de méthionine marquée au ^{35}S et les protéines obtenues séparées par SDS-PAGE (7,5% d'acrylamide). Les protéines traduites sont visualisées par autoradiographie.

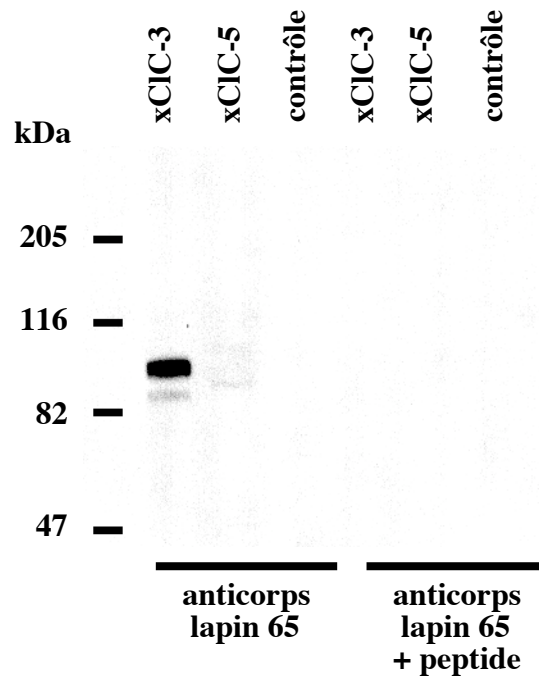
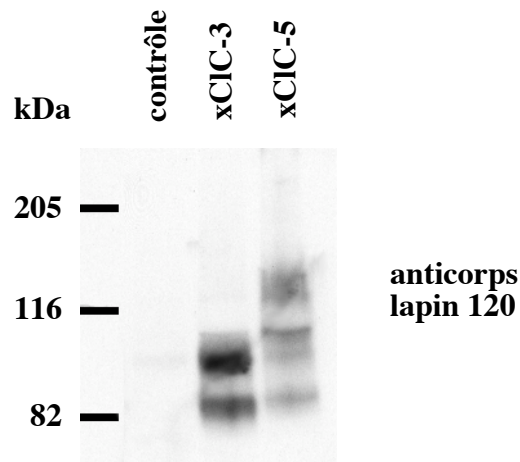
A**B**

Figure 52: Spécificité des anticorps anti-xCIC-3. A: Spécificité des anticorps SF 65, analyse par Western blot, sur des protéines membranaires d'ovocytes contrôle, d'ovocytes exprimant le xCIC-5 et d'ovocytes exprimant le xCIC-3. 15 μg de protéines ont été séparés par SDS-PAGE (7,5% d'acrylamide) et incubés pendant deux heures avec les anticorps du sérum immun du lapin 65 (1/370ème) avec ou sans un excès de peptide C-terminal (contre lequel les anticorps sont dirigés) (0,7 $\mu\text{g}/\text{ml}$). B: Détermination de la spécificité des anticorps SF 120 en Western blot (comme ci-dessus).



Figure 53: Mise en évidence des différentes formes N-glycosylées du xCIC-3 dans l'ovocyte de xénope. 100 μ g de protéines d'ovocytes exprimant le xCIC-3 ont été soumis au traitement déglycosylant au mélange N-glycosidase F/endoglycosidase F (en A) ou bien au traitement déglycosylant à l'endoglycosidase H (en B), puis analysés par Western blot. Les protéines ont été séparées par SDS-PAGE (7,5% d'acrylamide) et incubés 2 heure avec les anticorps SF 65 au 1/370ème. (-): sans enzyme. (+): avec enzyme.

modifications post-traductionnelles. Or, les protéines riches en régions hydrophobes sont connues pour avoir une mobilité électrophorétique accrue. Nous suggérons donc que les bandes à 85 et 105 kDa correspondent à deux formes N-glycosylées du xCIC-3.

Le traitement à l'endoglycosidase H n'affecte pas la migration de la bande à 105 kDa. Par contre, la bande à 85 kDa migre désormais à 82 kDa (**Figure 53 B**). Ceci suggère que la bande migrant à 85 kDa correspond à une forme immature, core-glycosylée du xCIC-3 et que la bande migrant à 105 kDa correspond à une forme N-glycosylée, éventuellement mature.

2.5. Expression du xCIC-3 dans la lignée cellulaire HEK 293

L'expression du xCIC-3 dans l'ovocyte de xénope n'est apparemment pas fonctionnelle. Bien que l'ovocyte soit un système d'expression homologue par rapport au xCIC-3, il est possible que l'ovocyte ne soit pas un système cellulaire adapté à l'expression du xCIC-3. Pour tester cette hypothèse et exprimer le xCIC-3 fonctionnellement, nous avons choisi de réaliser l'expression hétérologue du xCIC-3 dans la lignée cellulaire de mammifère HEK 293, qui dérive de cellules de rein embryonnaire humain. L'expression du xCIC-3 dans ce système cellulaire pose le problème de l'expression endogène du CIC-3 humain. En effet, le CIC-3 est une protéine ubiquitaire chez l'homme et sa présence dans les cellules d'origine rénale HEK 293 est très probable, car chez la souris le CIC-3 est déjà présent dans le mésonéphros de l'embryon (Borsani et al., 1995). Cependant, nos études préliminaires en patch-clamp ont montré une conductance anionique de base suffisamment faible pour espérer surexprimer le xCIC-3 dans ce système cellulaire.

Pour réaliser cette surexpression, l'ADNc codant pour le xCIC-3 a été sous-cloné dans un vecteur d'expression bi-cistronique en amont du gène codant pour la protéine de surface CD8, qui nous servira de témoin pour la transfection. Dans cette construction plasmidique, l'expression des deux ADN est sous le contrôle du promoteur unique CMV. Ainsi, l'expression du CD8 dans une cellule implique théoriquement l'expression simultanée du xCIC-3. Les cellules HEK 293 ont été transfectées transitoirement et l'expression du xCIC-3 et du CD8 a été contrôlée. Le test d'expression du CD8 consiste à mettre les cellules en contact avec des billes couplées à des anticorps anti-CD8. Ces anticorps reconnaissent le CD8 en surface des cellules transfectées. Les billes couplées aux anticorps constituent donc un marquage des cellules transfectées visible au microscope optique. Sur les mêmes cellules, nous avons testé l'expression du xCIC-3 par immunocytochimie à l'aide de nos anticorps anti-xCIC-3. La révélation de ces derniers se fait à l'aide d'anticorps secondaires anti-lapin couplés au fluorochrome Cy3, visible au microscope à fluorescence.

Les cellules HEK 293 ayant subi le protocole de transfection à la lipofectamine sont soumises successivement aux billes anti-CD8 et au protocole d'immunomarquage du xCIC-3. L'observation des cellules montre qu'environ 10% des cellules sont marquées par des billes à leur surface, témoignant de la transfection de ces cellules, car elles n'expriment pas la protéine

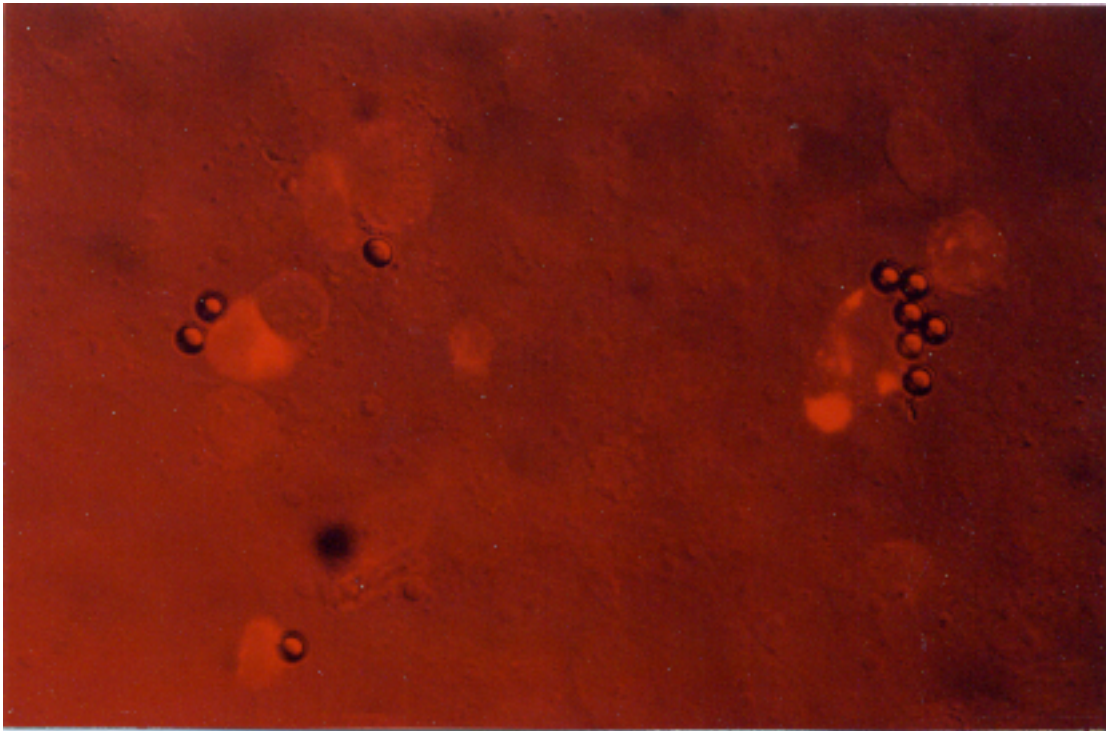
CD8 de manière endogène. L'expression hétérologue du xCIC-3 touche également 10% des cellules et coïncide à 90% avec l'expression du CD8 (**Figure 54**). On peut donc considérer que le marquage des cellules par les billes anti-CD8 constitue un test de transfection relativement fiable, puisque 90% des cellules marquées expriment le xCIC-3. La fluorescence des autres cellules est faible et d'intensité comparable à celle observée sur les cellules HEK 293 contrôle. La localisation du xCIC-3 surexprimé semble être membranaire, mais la résolution optique de la technique utilisée ne permet pas de distinguer entre un marquage membranaire et un marquage sous-membranaire. Pour préciser la localisation du xCIC-3, d'autres expériences sont nécessaires.

L'analyse électrophysiologique des cellules HEK 293 transfectées a été réalisée par le Dr. Umberto Banderali (post-doc de notre équipe). Pour déterminer si la protéine xCIC-3 est fonctionnelle, il a employé la technique de patch-clamp dans la configuration cellule entière (*whole cell*) et un protocole de voltage-clamp. L'analyse de la conductance membranaire des cellules marquées par les billes anti-CD8 n'a pas permis de mettre en évidence une conductance nouvelle par rapport aux cellules HEK 293 contrôle.

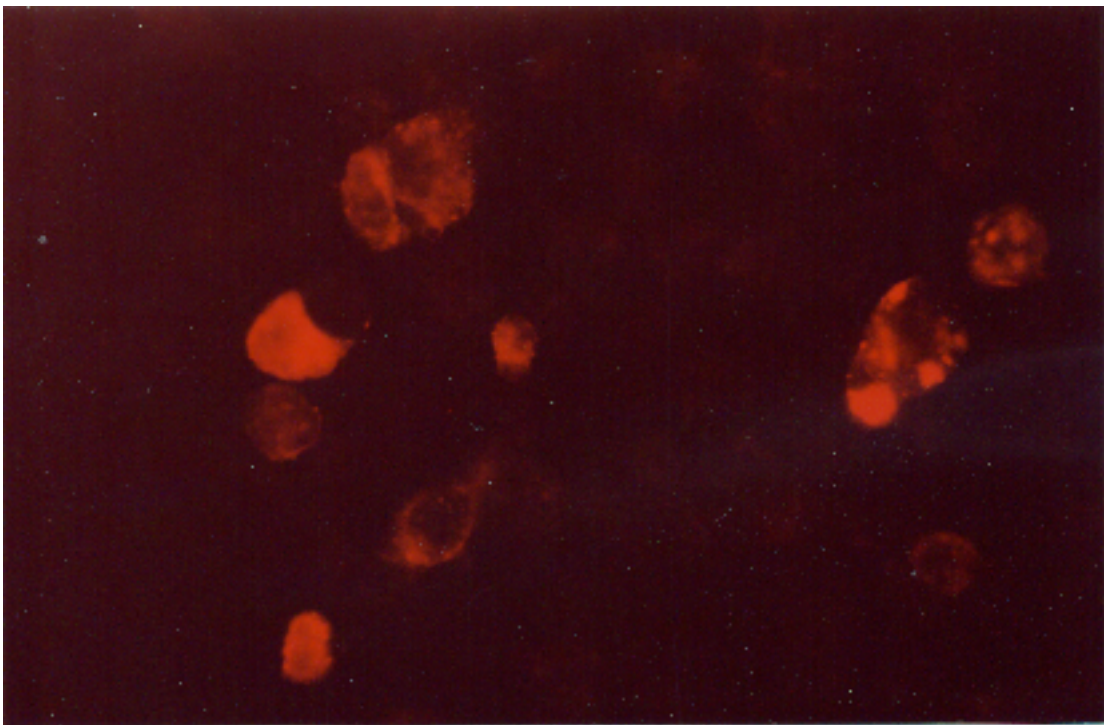
2.6. Discussion

Nous avons utilisé deux systèmes cellulaires, l'ovocyte de xénope et la lignée cellulaire HEK 293, afin d'exprimer la protéine xCIC-3 et de caractériser sa fonction. Il est actuellement admis que les protéines de la famille des CIC sont des canaux anioniques. Nous avons donc recherché une activité électrique nouvelle dans les cellules surexprimant le xCIC-3. D'abord, nous avons vérifié la synthèse de la protéine xCIC-3 dans les cellules injectées avec les ARNc ou transfectées avec l'ADNc, à l'aide d'anticorps polyclonaux dirigés contre le peptide C-terminal du xCIC-3. Puis, les techniques de double microélectrodes ou de patch-clamp ont été employées pour examiner la conductance des membranes cellulaires, mais aucune nouvelle conductance n'a pu être mise en évidence.

L'expression et la caractérisation fonctionnelle du CIC-3 a fait l'objet de plusieurs études réalisées indépendamment dans différents groupes. Plusieurs systèmes cellulaires ont été utilisés pour exprimer les CIC-3 issus de différentes espèces, mais la majorité des groupes ont été incapables de montrer l'apparition d'une conductance nouvelle (Borsani et al., 1995; Miyazaki et al., 1999; Friedrich et al., 1999; Jentsch et al., 1999). Seulement deux groupes ont rapporté des résultats d'expression fonctionnelle. En 1994, Kawasaki et al. expriment le rCIC-3 dans l'ovocyte de xénope. Ils observent un courant anionique, à rectification sortante, de sélectivité $I^- > Cl^-$, inhibé par le DIDS et la protéine kinase C (PKC). Un an plus tard, les mêmes auteurs décrivent l'établissement d'une lignée cellulaire CHO exprimant le rCIC-3 de manière stable. Le courant observé présente les mêmes caractéristiques que celles observées auparavant dans l'ovocyte de xénope. Aussi, le courant caractérisé est inhibé par une augmentation du calcium intracellulaire, sans intervention d'une phosphorylation (Kawasaki et al., 1995). Récemment, l'expression



A: immunodétection de la protéine CD8 (observation des billes en lumière)



B: immunodétection de la protéine xCIC-3 (observation en fluorescence)

Figure 54: Mise en évidence de la co-expression du xCIC-3 et du CD8 dans les cellules HEK 293. Les cellules HEK 293 sont transfectées transitoirement avec le plasmide pIRES1-CD8 contenant l'ADNc du xCIC-3. Trois jours après la transfection, les cellules sont fixées au paraformaldéhyde (4%) et perméabilisées au SDS (1%) et au Triton X-100 (0,3%). A : révélation de la protéine CD8 par des billes couplées à un anticorps anti-CD8 (Dynal). B : immunodétection de la protéine xCIC-3 par les anticorps anti-xCIC-3 (SF 65) (1/20ème pendant 2 heures). Les anticorps primaires sont révélés par un anticorps secondaire anti-lapin couplé à la sonde fluorescente Cy 3 (1 heure à 1/300ème). Il s'agit de la même préparation cellulaire, observée en lumière (en A) et en fluorescence (en B). Grossissement x 1000.

fonctionnelle a également été décrite pour le CIC-3 de cochon d'Inde (gpCIC-3) dans les fibroblastes NIH/3T3 (Duan et al., 1997 et 1999). La conductance anionique décrite par ces auteurs est similaire à celle décrite par Kawasaki et al. (1994 et 1995) en ce qui concerne la rectification sortante, la sélectivité $I^- > Cl^-$ et l'inhibition par le DIDS et la PKC. Par contre, les courants observés par les deux groupes présentent quelques différences au niveau du canal unitaire. De plus, l'inhibition du courant consécutive à l'augmentation du calcium intracellulaire impliquerait une phosphorylation par la PKC dans le cas du gpCIC-3, ce n'est pas le cas pour le rCIC-3. Les courants caractérisés au cours de ces deux études sont donc similaires, mais pas identiques. Se pose alors le problème de savoir si l'expression des deux protéines homologues a réellement conduit à l'apparition de deux conductances aux caractéristiques différentes ou bien si au moins une des deux conductances induites correspond à une conductance endogène au système d'expression. En effet, le phénomène d'induction de courants endogènes aux systèmes d'expression a déjà été évoqué et discuté dans la partie concernant l'expression fonctionnelle du xCIC-5. La conductance décrite par Duan et al. (1997 et 1999) peut être stimulée par un choc hypo-osmotique. Par conséquent, il convient de prêter une attention particulière au phénomène d'induction de courants endogènes, car ces courants sont généralement similaires aux courants sensibles au volume qui existent probablement dans la plupart des cellules.

Les études mutationnelles réalisées par Duan et al. (1997 et 1999) appuient l'idée selon laquelle le courant associé à l'expression du gpCIC-3 ne correspond pas à un courant endogène. En effet, l'expression de mutants du gpCIC-3 a donné lieu à l'apparition de courants dont les caractéristiques sont différentes des celles du courant induit par la protéine sauvage. Le remplacement de l'asparagine 579 par une lysine (N579K) a affecté la dépendance du voltage et la sélectivité du courant. La substitution de la sérine 51 par une alanine a aboli la stimulation du courant par le choc hypo-osmotique.

Malgré le poids de ces études mutationnelles, la controverse concernant ces résultats d'expression fonctionnelle reste alimentée par l'incapacité de plusieurs groupes à reproduire les résultats obtenus. Aussi, il est troublant que la sélectivité des courants décrits soit de type $I^- > Cl^-$, comme pour le courant induit artificiellement (Buyse et al., 1997; Schmieder et al., 1998), alors que tous les autres membres de la famille des CIC (dont l'activité électrique est actuellement caractérisée) possèdent des sélectivités de type $Cl^- > I^-$. Enfin, on peut s'étonner du fait que la mutation N565K sur le rCIC-5, équivalente à la mutation N579K du gpCIC-3, n'ait pas affecté la sélectivité et la rectification du courant associé au rCIC-5, alors que les deux protéines sont identiques à environ 80% (Friedrich et al., 1999).

Comment expliquer l'absence d'une conductance nouvelle suite à l'injection d'ARNc du CIC-3, malgré la synthèse de la protéine d'intérêt?

Il est possible que la protéine synthétisée ne soit pas fonctionnelle dans le système cellulaire utilisé. En effet, une sous-unité nécessaire au fonctionnement du canal peut manquer dans un système d'expression inadapté. Il a été montré que les canaux de la famille des CIC sont capables de s'associer en hétérodimères pour former des canaux fonctionnels (Lorenz et al.,

1996). Pour le moment, les expériences de co-expression du CIC-3 avec d'autres CIC n'ont pas permis d'induire des courants nouveaux (Friedrich et al., 1999). Le système cellulaire peut également manquer d'éléments intracellulaires tel qu'une voie de signalisation ou bien produire des modifications post-traductionnelles incorrectes. Nous avons constaté que l'expression du xCIC-5 dans l'ovocyte donne lieu à une forme protéique migrant à 130 kDa qui n'existe pas pour le xCIC-3, présentant pourtant un profil de bandes en Western blot très similaire. Nos expériences de déglycosylation ont montré que la bande migrant à 130 kDa correspond à une forme N-glycosylée, probablement mature, du xCIC-5¹. Il est tentant de spéculer sur l'existence d'un lien quelconque entre l'absence d'une glycoforme de xCIC-3 et l'absence d'une conductance nouvelle.

Alternativement, il est envisageable que la protéine soit fonctionnelle, mais que la conductance ne soit pas détectée. Il est possible que le stimuli nécessaire à l'activité canal n'ait pas encore été identifié et que la conductance soit silencieuse. La technique employée peut également être en cause, lié à une localisation intracellulaire de la protéine. En effet, les techniques des double microélectrodes et de patch-clamp, telles qu'elles ont été employées, ne permettent d'analyser que la conductance de la membrane plasmique.

En bref, l'expression du xCIC-3, cloné à partir de la lignée cellulaire A6, a été réalisée dans deux systèmes cellulaires d'expression différents: l'ovocyte de xénope et la lignée cellulaire HEK 293. La synthèse protéique du xCIC-3 a pu être vérifiée à l'aide d'anticorps polyclonaux dirigés contre un peptide C-terminal du xCIC-3. La technique de Western blot, combinée à des traitements déglycosylants nous a permis de montrer que le xCIC-3 est N-glycosylé lorsqu'il est surexprimé dans l'ovocyte de xénope. Les approches électrophysiologiques utilisées ne nous ont pas permis de mettre en évidence une conductance nouvelle sur la membrane plasmique des cellules exprimant le xCIC-3. Face à l'incapacité d'un certain nombre d'équipes à obtenir une expression fonctionnelle du CIC-3, les résultats d'expression fonctionnelle rapportés par seulement deux équipes restent controversés. Plusieurs hypothèses, dont celle de la localisation intracellulaire du CIC-3, ont été avancées pour expliquer l'apparente absence d'expression fonctionnelle.

¹ Il est possible qu'une telle forme protéique de xCIC-3 existe, mais n'est pas reconnue par nos anticorps anti-xCIC-3. Cette hypothèse est peu probable, car les profils obtenus avec les deux lots d'anticorps anti-xCIC-3 sont identiques. De plus, les anticorps du lapin 120, qui reconnaissent également le xCIC-5, détectent bien la forme de xCIC-5 qui migre à 130 kDa. Il semble donc qu'il n'existe pas de glycoforme de xCIC-3 de masse moléculaire apparente de 130 kDa.

3. Distribution tissulaire et localisation cellulaire du CIC-3

L'étude de la distribution et de la localisation du CIC-3 peut constituer une approche susceptible de pouvoir mieux cerner sa fonction. Plusieurs études ont porté sur la distribution tissulaire et cellulaire des ARNm du CIC-3 chez différentes espèces. Des expériences utilisant les techniques de Northern blot et d'hybridation *in situ* ont permis de montrer une large distribution du CIC-3 chez le rat (Kawasaki et al., 1994, Obermüller et al., 1998), la souris et l'homme (Borsani et al., 1995) et chez le tilapia *Oreochromis mossambicus* (Miyazaki et al., 1999). Au laboratoire, le Dr. Sabine Lindenthal a examiné la distribution tissulaire du xCIC-3 par RPA (*RNase Protection Assay*). Ses résultats (Lindenthal et al., en préparation) montrent une distribution large chez l'amphibien *Xenopus laevis*. Parmi les organes exprimant le CIC-3, on trouve le système nerveux central, le rein, l'intestin, le poumon, le muscle squelettique et le muscle lisse vasculaire. L'expression du CIC-3 est particulièrement forte au niveau du système nerveux central.

Trois études apportent des précisions sur la distribution cellulaire du CIC-3. Au niveau du cerveau, le CIC-3 est exprimé essentiellement au niveau de l'hippocampe, du bulbe olfactif et du cérébellum (Kawasaki et al., 1994; Borsani et al., 1995). Dans le rein, l'expression du CIC-3 a été mise en évidence dans les tubules collecteurs, plus précisément dans les cellules intercalaires de type β (Obermüller et al., 1998).

Nous avons envisagé d'étudier la distribution du CIC-3 au niveau protéique. Pour cela nous disposons de deux types d'anticorps: des anticorps polyclonaux, dirigés contre le peptide C-terminal du xCIC-3 (amphibien), et des anticorps polyclonaux, dirigés contre une protéine de fusion contenant 70 acides aminés du rCIC-3 (mammifère).

3.1. Spécificité des anticorps anti-CIC-3

Anticorps anti-xCIC-3

Les anticorps polyclonaux anti-xCIC-3 que nous avons fait développer par deux lapins (lapins 65 et 120) ont été purifiées et testés sur des préparations membranaires d'ovocytes contrôle et d'ovocytes exprimant le xCIC-3 ou le xCIC-5 (voir paragraphe 2.3.). Nous avons constaté que nos deux lots d'anticorps reconnaissaient effectivement le xCIC-3 exprimé dans l'ovocyte et qu'il reconnaissent également le xCIC-5 (**Figure 52**). La réaction croisée avec le xCIC-5, due à la forte homologie de séquence des deux protéines dans la région antigénique, est plus forte avec les anticorps du lapin 120 qu'avec ceux du lapin 65. Nous avons conclu que nos anticorps sont adaptés pour étudier le xCIC-3 surexprimé dans un système cellulaire, mais qu'il ne se prêtent que difficilement à l'étude du xCIC-3 natif dans des tissus ou lignées cellulaires.

Nous avons également examiné la spécificité de nos anticorps au sein de l'embranchement CIC-3/4/5 chez le mammifère (rat). Les deux lots d'anticorps ont été testés sur des préparations membranaires d'ovocytes contrôle et d'ovocytes exprimant les différents membres de cet embranchement. La **Figure 55** montre l'immunodétection par Western blot avec nos anticorps anti-xCIC-3 sur les différentes préparations membranaires. Si on suppose que l'expression des différentes protéines CIC dans les préparations membranaires utilisées est comparable, il apparaît que nos anticorps ont une bonne affinité pour le rCIC-4, une affinité moyenne pour le rCIC-5 et une affinité faible pour le rCIC-3. De plus, on note que les anticorps reconnaissent des bandes non-spécifiques sur toutes les préparations membranaires (y compris celle des ovocytes contrôle). Ces bandes n'apparaissent jamais avec nos préparations d'ovocyte. Nous n'avons pas d'explication à cela.

Par conséquent, chez le mammifère, nos anticorps ne permettent pas de discriminer le CIC-3 par rapport aux autres membres de l'embranchement CIC-3/4/5, du fait de la grande homologie de séquence des extrémités C-terminales de ces protéines. De plus, ils risquent de révéler des protéines qui ne sont pas apparentées. L'utilisation de ces anticorps pour l'immunodétection du CIC-3 natif dans des tissus ou lignées cellulaires paraissait donc hasardeuse.

Anticorps anti-rCIC-3

La collaboration avec Dr. G. H. Idelson des laboratoires Alomone (Jérusalem) nous a permis d'obtenir des anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre la queue cytoplasmique C-terminale du rCIC-3. L'immunisation des lapins a été réalisée à l'aide d'une protéine de fusion constituée de la GST (glutathione-S-transférase) et des acides aminés 592-661 du rCIC-3. Les anticorps totaux ont été purifiés par précipitation avec 50% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, puis, les anticorps dirigés contre la GST ont été éliminés par une incubation avec des billes couplées à la GST et les anticorps anti-rCIC-3 ont finalement été purifiés sur une colonne d'affinité présentant la protéine de fusion.

J'ai testé la spécificité de ces anticorps, en Western blot, en utilisant des préparations membranaires d'ovocytes contrôles et d'ovocytes exprimant les CIC-3, CIC-4 et CIC-5 de rat. Il apparaît que ces anticorps détectent deux bandes diffuses de masse moléculaires 82 kDa et 110-120 kDa sur les membranes d'ovocytes exprimant le rCIC-3 (**Figure 56**) (Schmieder et al., 1999). Aucun signal équivalent n'apparaît sur les autres préparations membranaires, ce qui suggère que le signal détecté correspond au rCIC-3. De plus, on peut observer une bande plus fine au niveau de 80 kDa qui est présente dans toutes les préparations membranaires y compris celle des ovocytes contrôle. Ce signal correspond donc à la reconnaissance non-spécifique d'une protéine endogène à l'ovocyte de xénope. Nous avons également testé ces anticorps sur les protéines d'amphibien xCIC-3 et xCIC-5 exprimés dans l'ovocyte. Les anticorps se sont révélées incapables de détecter ces protéines (résultat non illustré). Par conséquent, la bande de 80 kDa

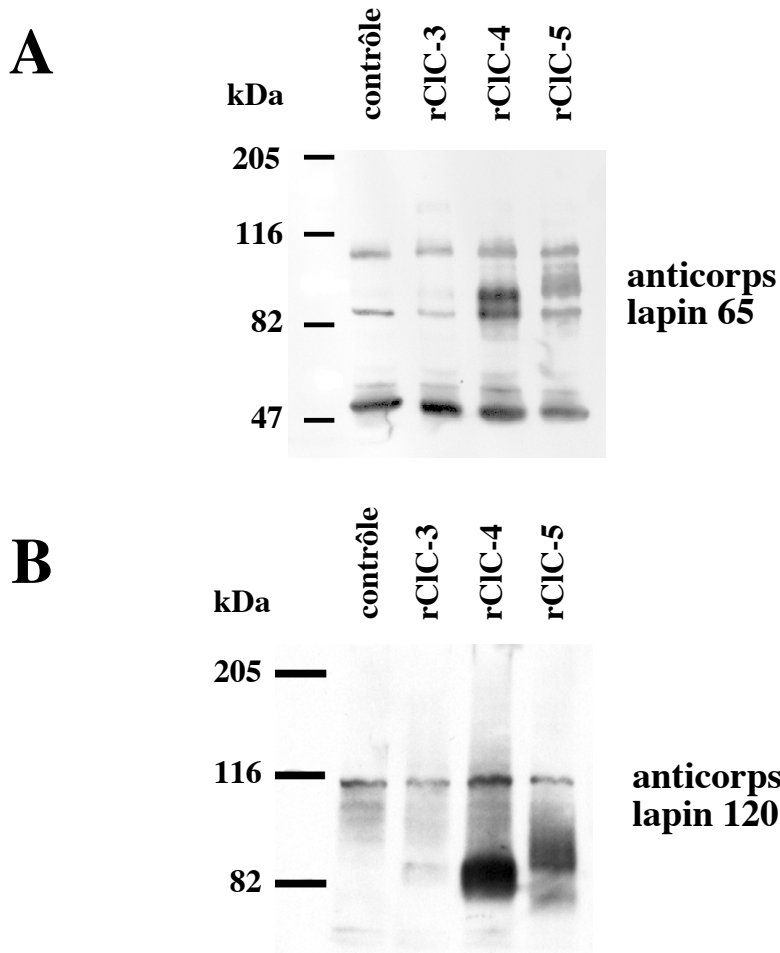


Figure 55: Spécificité des anticorps anti-xCIC-3 chez le mammifère. Analyse menée par Western blot sur des protéines membranaires préparées à partir d'ovocytes contrôle ou exprimant les protéines rCIC-3, rCIC-4 ou rCIC-5. Les protéines ont été séparées par SDS-PAGE (7,5% d'acrylamide) et incubées pendant deux heures avec les anticorps anti-xCIC-3 du lapin 54 (en A, 1/370ème) et du lapin 120 (en B, 1/20000ème).

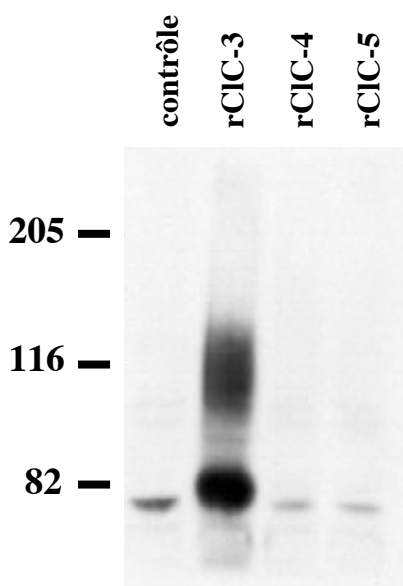


Figure 56: Spécificité des anticorps anti-rCIC-3 chez le mammifère. Analyse menée par Western blot sur des protéines membranaires préparées à partir d'ovocytes contrôle ou exprimant les protéines rCIC-3, rCIC-4 ou rCIC-5. Les protéines ont été séparées par SDS-PAGE (7,5% d'acrylamide) et incubées pendant deux heures avec les anticorps anti-rCIC-3 (à 1,5µg/ml).

reconnue par les anticorps ne correspondrait, à priori, pas à une protéine de type CIC endogène à l'ovocyte.

Ces anticorps anti-rCIC-3 permettent donc de discriminer le rCIC-3 parmi les protéines de l'embranchement CIC-3/4/5 chez le rat, mais ne permettent pas l'immunodétection du CIC-3 chez l'amphibien. Ceci s'explique par le degré d'homologie de séquence trop faible entre les CIC-3 de rat et de xénope (**Tableau 14**). Du fait des homologies observées entre les différentes protéines de l'embranchement CIC-3/4/5 chez les différentes espèces, il est très probable que la spécificité des anticorps soit identique chez le rat et la souris. En effet, les séquences des CIC-3 de rat et de souris sont identiques à 100% dans la région choisie pour construire la protéine de fusion.

Ces anticorps anti-rCIC-3 semblent donc adaptés pour l'étude par Western blot du CIC-3 chez le rat et la souris. Par contre, les expériences d'immunocytochimie pourraient paraître plus délicates du fait de la reconnaissance d'une bande à 80 kDa, correspondant vraisemblablement à une protéine inapparentée aux CIC. Cependant, l'intensité de cette bande reste relativement faible et ce signal n'est pas nécessairement conservé en immunocytochimie.

	CIC-3	CIC-4	CIC-5
rat		46/70	49/70
souris	70/70	46/70	49/70
homme	69/70	46/70	49/70
xénope	61/70	?	48/70

Tableau 14: Identité des acides aminés entre les protéines indiquées et le rCIC-3 dans la région choisie pour la construction de la protéine de fusion GST-rCIC-3.

3.2. Etude du CIC-3 chez la souris

Etant donné que seuls les anticorps anti-rCIC-3 se sont révélés suffisamment spécifiques pour l'étude du CIC-3 sur des tissus naturels, nous avons entrepris la détermination de la distribution tissulaire au niveau protéique, qui n'avait pu être réalisé à ce jour. L'étude a donc été réalisée chez le mammifère.

Distribution tissulaire du mCIC-3

La distribution tissulaire du CIC-3 a été examinée chez la souris, par Western blot, avec les anticorps anti-rCIC-3. L'expression du CIC-3 au niveau de l'ARNm est élevée dans le système nerveux central (Kawasaki et al., 1994; Borsani et al., 1995). J'ai donc examiné en premier lieu l'expression de la protéine CIC-3 dans le cerveau et le cervelet de souris. Une bande diffuse migrant entre 90 et 110 kDa est révélée sur les deux préparations membranaires (**Figure**

57 A). On observe également une bande plus fine à 80 kDa qui rappelle la bande non-spécifique, de même masse moléculaire, observée dans l'ovocyte de xénope. La préincubation des anticorps, pendant 2-3 heures à température ambiante, avec un excès (30 moles pour 1 mole) de protéine de fusion empêche les anticorps de révéler ces bandes. L'étude s'est ensuite étendue au rein et à l'intestin de souris avec les mêmes anticorps. Des bandes diffuses ont été détectées de 90 à 110 kDa dans le rein (cortex et médulla) et de 100 à 130 kDa dans l'intestin (duodénum, jéjunum et colon) (**Figure 57 B**).

Etude de la glycosylation du mCIC-3

Le mCIC-3 a une masse moléculaire calculée d'environ 84 kDa et présente un seul site potentiel de N-glycosylation sur une boucle présumée extracellulaire. Afin de déterminer si la N-glycosylation de la protéine pouvait expliquer les masses moléculaires variables des bandes révélées selon les différents organes, j'ai réalisé des expériences de déglycosylation. Le traitement des préparations membranaires de cerveau, de médulla et de colon par le mélange enzymatique de N-glycosidase F/endoglycosidase F augmente la mobilité électrophoretique des bandes révélées (**Figure 58 A**). Après déglycosylation, les bandes diffuses migrent, toujours de manière diffuse, au niveau de 80-90 kDa, ce qui est proche de la masse moléculaire calculée pour le mCIC-3. La mobilité de la bande fine n'est pas affectée par le traitement déglycosylant. Il semble donc que les bandes diffuses correspondent au mCIC-3, alors que la bande fine correspond probablement à la protéine inapparentée également observée sur les ovocytes contrôle. La protéine mCIC-3 est donc N-glycosylée dans le système nerveux central, le rein et l'intestin. La migration électrophorétique du mCIC-3 glycosylé varie selon les tissus, alors qu'elle est identique pour les mCIC-3 déglycosylés. Ceci suggère que les N-glycanes portés par le mCIC-3 varient en fonction des tissus.

Le traitement enzymatique associant la neuraminidase et la O-glycosidase permet de cliver les O-glycanes portés par les protéines. L'application de ce traitement aux préparations membranaires de cerveau de souris n'a pas affecté la mobilité électrophorétique du mCIC-3 (**Figure 58 B**). Par conséquent, la protéine mCIC-3 ne semble pas faire l'objet d'une O-glycosylation et l'aspect diffus du signal en Western blot ne peut pas être expliqué par une O-glycosylation de la protéine.

Conclusions. Discussion.

Nos résultats (voir aussi Schmieder et al., 1999) montrent que le mCIC-3 est exprimé au niveau du système nerveux central, ainsi que dans le rein et l'intestin. Notre étude montre pour la première fois au niveau protéique que le CIC-3 a une large distribution tissulaire chez un mammifère. En accord avec les études antérieures portant sur la distribution tissulaire de l'ARNm du CIC-3, l'expression de la protéine CIC-3 apparaît particulièrement forte au niveau du système nerveux central. Il se pose donc la question du rôle physiologique du CIC-3 dans le système nerveux central.

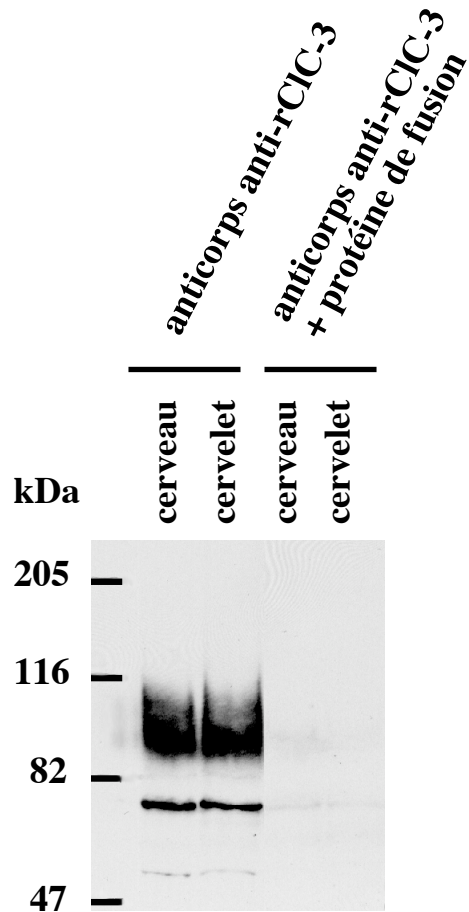
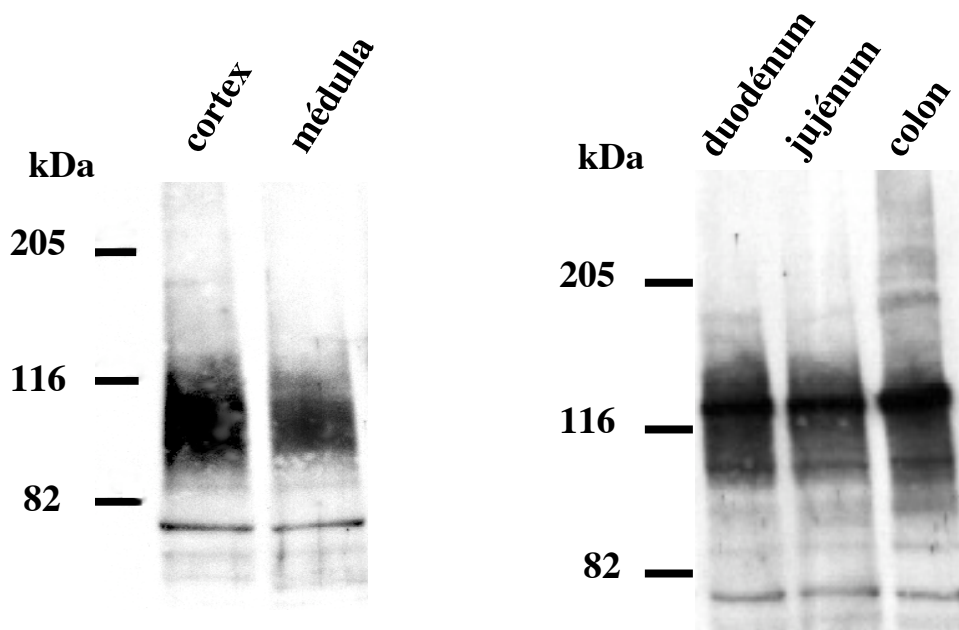
A**B**

Figure 57: Immunodétection du mCIC-3 dans divers organes de souris (A : système nerveux central, B : rein et intestin). 60 μg de protéines membranaires ont été séparées par SDS-PAGE (7,5% d'acrylamide) et incubées pendant 15 heures avec les anticorps anti-rCIC-3 (1,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). En A, la protéine de fusion a été utilisée avec un excès de 30 moles pour 1 mole d'anticorps.

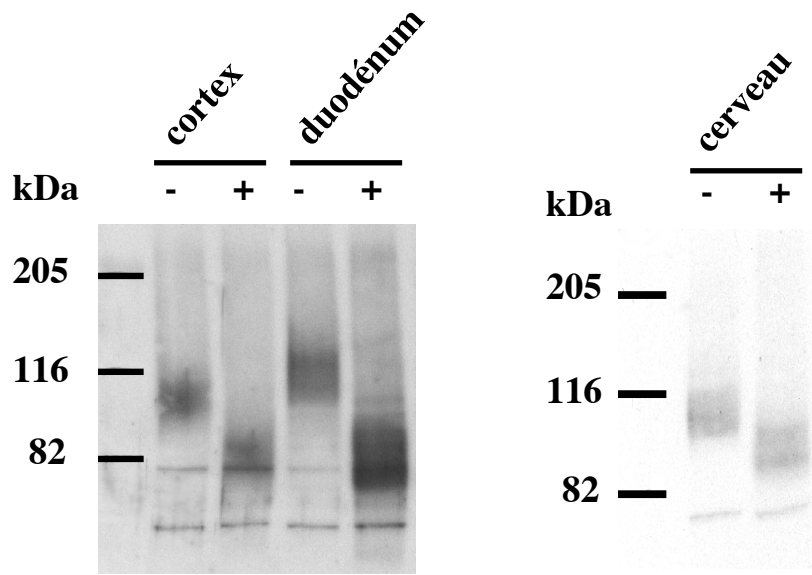
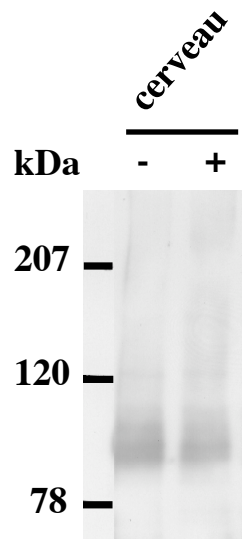
A**B**

Figure 58: Etude de la glycosylation du mCIC-3 dans divers organes de souris (cerveau, cortex rénal, duodénum). 100 μg de protéines d'ovocytes exprimant le xCIC-3 ont été soumis au traitement déglycosylant au mélange N-glycosidase F/endo-glycosidase F (en A) ou bien au traitement déglycosylant à la neuraminidase/O-glycosidase (en B), puis analysés par Western blot. Les protéines ont été séparées par SDS-PAGE (7,5% d'acrylamide) et incubées 15 heures avec les anticorps anti-rCIC-3 (1,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). (-): sans enzyme. (+): avec enzyme.

Nos résultats suggèrent qu'une N-glycosylation différentielle soit à l'origine de masses moléculaires différentes selon les tissus. Il sera intéressant de déterminer la signification physiologique de l'existence de différentes glycoformes du CIC-3, spécifiques des différents tissus. Des glycoformes différentes peuvent être générées par l'utilisation d'un nombre variable de sites de glycosylation ou bien par l'attachement de glycanes distincts. Comme le mCIC-3 ne présente qu'un seul site de glycosylation, seul la deuxième hypothèse est possible. La détermination de la nature des N-glycanes portés permettrait de confirmer cette hypothèse. Il serait également intéressant de déterminer si la glycosylation différentielle est simplement le résultat de capacités de glycosylation distinctes des différents tissus (Williams et al., 1993) ou si elle correspond à une diversité fonctionnelle de la protéine (Shi and Trimmer, 1999). En effet, la glycosylation est une modification post-traductionnelle de la protéine qui aboutit à sa diversification structurale et fonctionnelle (les glycoformes). Divers rôles fonctionnels, tels que l'adressage, la transduction du signal et l'adhésion cellulaire, ont été attribués aux N-glycanes (Rodriguez-Boulan and Powell, 1992; Opdenakker et al., 1993; Matter and Mellman, 1994; Scheiffele et al., 1995; Keller and Simons, 1997; Gut et al., 1998). Ainsi, la N-glycosylation du CIC-3 pourrait moduler sa fonction ou son adressage dans les différents tissus.

La localisation du CIC-3 au niveau cellulaire dans les différents tissus sera un pas déterminant à réaliser dans le cadre de la détermination du rôle physiologique du CIC-3. Elle permettra éventuellement de comprendre la signification physiologique de l'existence de ces différentes glycoformes.

En bref, nous apportons la première étude au niveau protéique de la distribution tissulaire du CIC-3. Chez la souris, le mCIC-3 est exprimé dans le système nerveux central, le rein et l'intestin. Cette distribution protéique est en accord avec le profil d'expression très large de son ARNm. La N-glycosylation du mCIC-3 semble générer différentes glycoformes selon les tissus. Il sera intéressant de déterminer si cela correspond à une diversité fonctionnelle de la protéine dans les différents tissus.

4. Discussion générale

4.1. Le CIC-3 est-il impliqué dans la régulation du volume?

Depuis l'identification moléculaire du CIC-3, plusieurs groupes s'investissent dans la détermination de la fonction de cette protéine, qui n'a été impliquée dans aucune pathologie humaine. Il est maintenant admis que les protéines CIC-4 et CIC-5, qui partagent plus de 80 % d'identité avec le CIC-3, forment des canaux chlorure. Du fait de l'homologie structurale de ces protéines, il est très probable que le CIC-3 fonctionne également comme une protéine canal et possède des propriétés électrophysiologiques voisines.

Dans le but de définir le modèle fonctionnel du CIC-3 des expériences d'expression de CIC-3 de différentes espèces ont été réalisées dans plusieurs systèmes cellulaires. Les résultats d'expression fonctionnelle rapportés par deux groupes (Kawasaki et al., 1994 et 1995; Duan et al., 1997 et 1999) décrivent deux conductances similaires, qui présentent des caractéristiques proches de celles qui caractérisent les courants sensibles au volume cellulaire dans de nombreux types cellulaires. Notamment, le courant associé à l'expression du gpCIC-3 (Duan et al., 1997) est stimulé par un choc hypo-osmotique et présente des caractéristiques proches de celles du courant impliqué dans la régulation du volume dans les cellules cardiaques à partir desquelles le gpCIC-3 a été cloné (Vandenberg et al., 1994; Shuba et al., 1996). Par conséquent, Duan et al. (1997) proposent que le CIC-3 soit le canal responsable de $I_{Cl\ swell}$.

Récemment, un nombre croissant d'autres groupes ont caractérisé des courants de type $I_{Cl\ swell}$ et détecté l'ARNm du CIC-3 par RT-PCR au sein d'un même type cellulaire (Yamazaki et al., 1998; Dick et al., 1998; Schmid et al., 1998; Du et al., 1999; von Weikersthal et al., 1999). Ces auteurs soulignent également la possibilité de l'implication du CIC-3 dans la régulation du volume. L'ensemble de ces spéculations illustre à quel point l'identification moléculaire du canal chlorure impliqué dans la régulation du volume est recherchée. Au cours de ces dix dernières années, plusieurs protéines identifiées au niveau moléculaires ont été proposées comme le canal chlorure impliqué dans la régulation du volume. Parmi ces protéines, je citerai le pICln (Paulmichl et al., 1992; Gschwentner et al., 1995), le phospholemman (Moorman et al., 1992), la p-glycoprotéine (Valverde et al., 1992; Gill et al., 1992; Diaz et al., 1993) et le CIC-2 (Thiemann et al., 1992; Gründer et al., 1992). L'expression de ces protéines a donné lieu à des courants sensibles au volume cellulaire. Plus tard, les résultats d'expression fonctionnelle ont souvent fait l'objet de controverses, favorisant un rôle de régulateur de canaux pour certaines de ces protéines (Wine and Luckie, 1996; Buyse et al., 1997; Strange, 1998). Actuellement, aucune de ces protéines n'a pu être formellement identifiée comme étant le canal impliqué dans la régulation du volume.

Au cours de ces études, il est clairement apparu que la difficulté majeure dans l'établissement d'un lien direct entre une entité moléculaire et un courant sensible au volume est inhérente à la méthodologie utilisée. En effet, la caractérisation fonctionnelle d'une protéine dont le gène a été cloné se fait habituellement dans un système d'expression cellulaire. Les cellules utilisées sont de nature variées, mais présentent probablement toutes des conductances endogènes sensibles au changement de la pression osmotique du milieu extracellulaire. De plus, l'expression de protéines dans des systèmes cellulaires peut entraîner l'activation de courants endogènes (Moorman et al., 1992; Attali et al., 1993; Tzounopoulos et al., 1995), dont les caractéristiques sont également similaires à celles des courants sensibles au volume (Buyse et al., 1997, Schmieder et al., 1998). Malgré les études mutationnelles présentées par Duan et al. (1997 et 1999), les résultats d'expression fonctionnelle restent controversés face à l'incapacité de la plupart des autres groupes à les reproduire. D'autres expériences restent nécessaires pour confirmer l'implication du CIC-3 dans la régulation du volume cellulaire.

Notre étude de la distribution du CIC-3 a montré que la protéine, comme l'ARNm, est largement exprimée. L'ubiquité apparente du CIC-3 serait en accord avec une implication dans un processus cellulaire fondamental tel que la régulation du volume. Cependant, les études de localisation cellulaire du CIC-3, par hybridation *in situ*, montrent que l'expression ne se fait qu'au niveau de certains types cellulaires. Dans le rein, le CIC-3 est présent dans les cellules intercalaires de type β (Obermüller et al., 1998), et dans le cerveau il se situe au niveau de l'hippocampe et du bulbe olfactif (Kawasaki et al., 1994; Borsani et al., 1995). Ces observations n'appuient pas l'hypothèse selon laquelle le CIC-3 constitue le canal chlorure ubiquitaire impliqué dans la régulation du volume. Néanmoins, la diversité des caractéristiques des conductances sensibles au volume décrites dans différents types cellulaires laisse penser qu'il existe plusieurs entités moléculaires responsables de ces conductances. Il n'est pas exclu que le CIC-3 constitue un des canaux chlorure sensibles au volume, mais cela reste à être démontré.

4.2. Le CIC-3 constitue-t-il un canal intracellulaire?

Plusieurs hypothèses ont donc été avancées pour expliquer l'échec de la mise en évidence d'une activité canal dans certains systèmes d'expression comme l'ovocyte de xénope et la lignée cellulaire HEK. Il est possible qu'un élément indispensable au fonctionnement du CIC-3 manque aux systèmes cellulaires d'expression testés. Il peut s'agir d'une voie de signalisation intracellulaire ou d'une protéine régulatrice ou bien encore d'une sous-unité fonctionnelle. L'association de CIC en hétéromultimères formant des canaux fonctionnels a été décrite (Lorenz et al., 1996) et il est possible que le fonctionnement du CIC-3 requiert une association de ce type. Le système cellulaire peut également être inadapté pour réaliser une maturation post-transcriptionnelle correcte. Enfin, il est envisageable que l'activité du CIC-3 ne soit pas détectée du fait de sa localisation intracellulaire ou bien parce qu'on n'a pas encore identifié le stimuli indispensable à son activation.

L'hypothèse de la localisation intracellulaire est intéressante dans la mesure où ce type de localisation a déjà été montré pour plusieurs membres de la famille des CIC. En effet, nous avons déjà vu que plusieurs études récentes ont localisé le CIC-5 dans les endosomes précoces dans différents types cellulaires du rein (Günther et al., 1998; Devuyst et al., 1999; Luyckx et al., 1999) (voir chapitre 8 de la partie A.).

Le ScCIC constitue un autre exemple de CIC intracellulaire. Cette protéine, initialement appelée *gef1*, est l'unique membre de la famille des CIC présent chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Le défaut génétique de *gef1* (*gef1*⁻) est responsable d'un phénotype particulier appelé *petite*. Les levures présentant ce phénotype ont une croissance ralentie sur des milieux ne contenant pas de source de carbone fermentable. Or, ce défaut de croissance peut être supprimé en présence de fortes concentrations de fer, ce qui indique l'implication du ScCIC dans le métabolisme du fer chez la levure (Greene et al., 1993). De manière intéressante, un phénotype très similaire peut être provoqué par le défaut génétique portant sur une ATPase à protons localisée au niveau vacuolaire (Greene et al., 1993). Pour cela, il a été suggéré initialement que la ScCIC coopère avec l'ATPase à protons dans l'acidification vacuolaire. Cependant, des études de localisation du ScCIC réalisées par la suite montrent une localisation au niveau de l'appareil de Golgi (Gaxiola et al., 1998; Schwappach et al., 1998). Le ScCIC interviendrait donc plutôt dans l'acidification de l'appareil de Golgi. Actuellement, ce sont les résultats des expériences de complémentation, réalisées avec le AtCIC-d (Hechenberger et al., 1996), le OmCIC-3 et le OmCIC-5 (Miyazaki et al., 1999) sur la levure *gef1*⁻, qui laissent penser que plusieurs autres canaux chlorure de la famille des CIC pourraient avoir une localisation intracellulaire. En effet, l'introduction de ces CIC dans la levure *gef1*⁻, déficiente pour le gène *ScCLC*, a permis de supprimer le phénotype *petite*. Les CIC exprimés semblent donc se substituer fonctionnellement au ScCIC défaillant. D'après les auteurs de ces expériences, ces résultats suggèrent la localisation intracellulaire de ces CIC, ce qui expliquerait par ailleurs leur incapacité à détecter une activité électrique nouvelle sur la membrane plasmique des ovocytes exprimant ces CIC. On peut noter que phylogéniquement, l'embranchement le plus proche du ScCIC est celui des CIC-3/4/5. Le AtCIC-d partage un maximum d'homologie avec le CIC-6 (Brandt and Jentsch, 1995), dont l'expression dans l'ovocyte n'a pas donné lieu à une activité électrique au niveau de la membrane plasmique. Or, des expériences d'immunolocalisation du CIC-6 montrent une localisation intracellulaire au niveau du réticulum endoplasmique (Buyse et al., 1998). Enfin, l'expression fonctionnelle du CIC-7 à la membrane plasmique de l'ovocyte de xénope est également un échec. L'ensemble de ces observations serait en accord avec une localisation intracellulaire pour les canaux des embranchements CIC-3/4/5 et CIC-6/7.

L'élément moléculaire qui pourrait être responsable de la localisation intracellulaire de ces protéines est un motif consensus d'adressage présenté par les protéines de ces deux embranchements. Il s'agit du motif $\ddot{E}\text{--}\pi$, dans lequel \ddot{E} représente un acide aminé aromatique et π correspond à un acide aminé avec une longue chaîne aliphatique (Trowbridge et al., 1993). Ce

motif a été identifié dans plusieurs protéines dans lesquelles il jouerait le rôle de séquence signal pour l'adressage de la protéine à l'appareil de Golgi ou au système vésiculaire de recyclage entre l'appareil de Golgi et la membrane plasmique (Canfield et al., 1991; Piper et al., 1993; Nothwehr and Stevens, 1994). Les séquences des différents CIC qui correspondraient à ce motif sont situées près de l'extrémité N-terminale des protéines (**Tableau 15**) et sont conservés entre les espèces. Chez la levure, la mutation du motif désigné (F36A et/ou I39G) altère la fonction du ScCIC (Schwappach et al., 1998). Ce résultat est en accord avec un rôle du motif dans l'établissement de la fonction, mais l'intervention du motif dans la localisation du ScCIC n'a pas encore été montrée.

ScCIC	CIC-3	CIC-4	CIC-5	CIC-6	CIC-7
<u>FVTI</u>	<u>FHTI</u>	<u>ENTI</u>	<u>FVTI</u>	<u>YLEV</u> *	<u>FRTV</u>

Tableau 15: Séquences de la région N-terminale des différents CIC indiqués, correspondant au motif $\ddot{E}\text{-}\pi$ qui a été identifié comme signal d'adressage intracellulaire dans différentes protéines (\ddot{E} : acide aminé aromatique; π : acide aminé avec une longue chaîne aliphatique).

* Le CIC-6 possède une deuxième séquence qui correspond au motif $\ddot{E}\text{-}\pi$ (YEAV), mais elle est située à l'entrée du premier domaine présumé transmembranaire.

Enfin, j'évoquerai le travail de recherche mené par Claire Sandre-Lurin dans le cadre de sa thèse (Sandre-Lurin, C., 1998), réalisée sous la direction du Dr. C. Maurel au sein de l'équipe de H. Brygoo-Barbier sur la protéine CIC-Nt1, clonée chez le tabac *Nicotiana tabacum* (Lurin et al., 1996). Ces travaux suggèrent la localisation intracellulaire du CIC-Nt1, au niveau des mitochondries (Lurin et al., 2000). D'autres canaux chlorure ont été décrits sur la membrane mitochondriale. Il s'agit des porines mitochondriales (Colombini, 1994, Yu et al., 1995), également appelés VDAC (*voltage dependent anion channel*), qui possèdent une forte conductance peu sélective. Ces canaux chlorure sont perméables à d'autres anions et permettraient d'alimenter les mitochondries en pyruvate. Ainsi, ils joueraient un rôle dans le métabolisme mitochondrial.

L'ensemble des résultats évoqués ci-dessus sont autant d'arguments qui suggèrent ou seraient en accord avec une localisation intracellulaire des protéines des embranchements CIC-3/4/5 et CIC-6/7.

RESUME & PERSPECTIVES

1. Variété fonctionnelle des canaux chlorure

Les cellules utilisent des conductances chlorure aux caractéristiques fonctionnelles variées pour assurer la stabilité du potentiel membranaire, pour réguler le pH et le volume et éventuellement pour réaliser des transports transépithéliaux. En raison de l'absence d'inhibiteurs de haute affinité, la caractérisation pharmacologique des conductances chlorure apparaît peu spécifique. Néanmoins, on distingue les conductances chlorure sur la base de leur caractéristiques biophysiques, tels que la conductance unitaire, la sélectivité anionique, la dépendance du voltage... Aussi, l'étude des voies de régulation de ces conductances a fait apparaître une variété d'éléments de régulation qui contribuent à la distinction de ces voies de conductance. Par exemple, l'activité d'un canal chlorure peut dépendre d'un ligand extracellulaire, d'un messager secondaire, du potentiel de membrane ou encore du volume cellulaire. Les situations pathologiques consécutives au dysfonctionnement de différents canaux chlorure (mucoviscidose, néphrolithiases, myopathies...) constituent une illustration de l'importance physiologique de l'activité des canaux chlorure.

2. Variété moléculaire des canaux chlorure

Les caractéristiques distinctes des conductances chlorure sont le reflet de l'existence de différentes entités moléculaires. La caractérisation moléculaire des canaux chlorure par des stratégies de clonage par expression est apparue difficile. En effet, ces canaux sont généralement silencieux et leur activité n'est détectable qu'après leur stimulation. La difficulté vient de la distribution très large de ces canaux, qui implique la présence de canaux chlorure similaires, endogènes aux systèmes d'expression. Ainsi, la stimulation d'un canal exogène implique généralement la stimulation d'un canal endogène, ce qui complique considérablement l'analyse du courant. Par conséquent, le clonage par expression de canaux chlorure n'a été possible que pour des canaux dont les caractéristiques sont très particulières, comme par exemple le CIC-0 (Jentsch et al., 1990).

D'autres canaux chlorure ont été clonés en criblant des banques d'ADNc avec des anticorps spécifiques du canal. L'emploi de cette stratégie est conditionnée par l'obtention d'anticorps dirigés spécifiquement contre le canal préalablement purifié. Cette stratégie a permis de cloner le bCLCA1 (Cunningham et al., 1995), ainsi que le p64 (Landry et al., 1993). Une autre possibilité est le clonage de position en comparant les génomes de personnes atteintes d'une pathologie avec ceux d'individus sains. Ce type de clonage a permis d'identifier les gènes codant pour le CFTR (Rommens et al., 1989; Riordan et al., 1989) et le CIC-5 (Fisher et al., 1994 et 1995). Les stratégies de clonage par homologie contribuent à l'expansion des différentes familles de gènes, mais la caractérisation fonctionnelle et la détermination du rôle physiologique de la plupart de ces protéines restent à être déterminés.

3. Apports de notre étude

Les deux études présentées dans ce manuscrit ont été réalisées dans le cadre de l'identification moléculaire des conductances chlorure des les cellules A6, menée au sein de l'équipe du Professeur J. Ehrenfeld. Deux membres de la famille des CIC, le xCIC-5 et le xCIC-3, ont été clonés à partir des cellules A6, simultanément aux clonages de différents homologues de mammifère de CIC-5 et de CIC-3 réalisés dans d'autres groupes. La fonction et le rôle physiologique de ces protéines n'étant pas déterminés, nous avons initié ces études afin de contribuer à la caractérisation fonctionnelle de ces protéines.

La première partie des nos résultats, traite de la caractérisation électrophysiologique et biochimique du xCIC-5. L'expression fonctionnelle de la protéine a été réalisée dans l'ovocyte de xénope, puis examinée à l'aide de la technique de voltage-clamp en double microélectrodes. Nos premières expériences ont conduit à l'apparition d'une conductance en absence de synthèse de la protéine. Le phénomène d'induction d'une conductance endogène, auquel nous nous sommes confrontés, a également été observé dans d'autres études. Cette difficulté mérite d'être soulignée face à la généralisation de l'utilisation de l'ovocyte de xénope en tant que système d'expression. L'utilisation d'un vecteur d'expression optimisé, présentant les régions non-codantes de la β -globine de xénope et un site consensus Kozak, nous a finalement permis d'exprimer le xCIC-5 de manière fonctionnelle dans l'ovocyte.

L'analyse de l'activité électrique du xCIC-5 a montré que le xCIC-5 est un canal à rectification sortante (*outward rectifier*) et possédant une sélectivité anionique de type $Cl^- > I^-$ comme les autres membres de la famille de CIC qui ont fait l'objet de ce type d'étude. Malgré le grand nombre d'inhibiteurs des conductances anioniques testés, nous n'avons pas pu identifier un agent pharmacologique capable d'inhiber le xCIC-5. Par contre, nous avons mis en évidence sa sensibilité au pH extracellulaire et aux ions métalliques. D'autre part, nous avons montré qu'il possédait une sensibilité à certains inhibiteurs des tyrosine protéines kinases.

Notre approche immunologique a permis de montrer, par la technique de Western blot, que le xCIC-5 est synthétisé dans l'ovocyte à la suite de l'injection des ARNc et qu'il porte différentes N-glycosylations. Les anticorps que nous avons développés ont également été utilisés pour tenter de localiser le xCIC-5 au sein des cellules A6. Nous avons pu observer une localisation intracellulaire prédominante qui concorde avec les résultats obtenus par d'autres équipes. Cette observation nécessite cependant d'être confirmée à l'aide d'anticorps plus spécifiques que ceux utilisés dans cette étude ou par d'autres approches.

Récemment, le CIC-5 a été localisé dans les endosomes précoces dans différents types cellulaires dans le rein de mammifère (Günther et al., 1998; Devuyt et al., 1999; Luyckx et al., 1999). Un modèle fonctionnel impliquant le CIC-5 dans l'acidification des endosomes est apparu et s'appuie sur le fait que le CIC-5 a été co-localisé avec une ATPase à protons (Günther et al., 1998). Ce modèle permet d'expliquer la protéinurie qui apparaît lors d'un défaut génétique

portant sur le CIC-5. D'autres études restent nécessaires pour confirmer ce modèle, qui ne fournit pas d'explication à l'apparition des autres symptômes liés au même défaut (par exemple l'hypercalciurie). Les résultats que nous avons obtenus ouvrent à de nouvelles perspectives, concernant en particulier la régulation du CIC-5, qui pourront contribuer à l'avenir à étayer notre compréhension du fonctionnement et du rôle physiologique du CIC-5.

La deuxième partie est consacrée à l'étude du CIC-3. Nos tentatives d'expression fonctionnelle du xCIC-3 dans l'ovocyte de xénope, ainsi que dans les cellules HEK 293, se sont soldées par des échecs. Les anticorps anti-xCIC-3 que nous avons développés nous ont permis de montrer la synthèse protéique du xCIC-3 dans les deux systèmes cellulaires, mais l'analyse électrophysiologique des membranes plasmiques de cellules n'a pas mis en évidence une conductance nouvelle. Actuellement, l'expression fonctionnelle du CIC-3 pose problème à plusieurs équipes. L'approche immunologique développée parallèlement a eu plus de succès. Disposant d'anticorps dirigés contre le xCIC-3 et d'anticorps dirigés contre son homologue de mammifère, le rCIC-3, j'ai pu étudier l'état de glycosylation de ces protéines homologues, ainsi que la distribution tissulaire du CIC-3 chez la souris. Le CIC-3 est largement distribué chez le mammifère, comme chez l'amphibien. Chez la souris, le mCIC-3 porte des N-glycosylations de masse moléculaires différentes selon les tissus. ce qui suggère qu'il existe de glycoformes spécifiques aux différents tissus.

4. Perspectives

Dans la mesure où l'étude du fonctionnement et des rôles physiologiques des protéines CIC-5 et CIC-3 en est encore relativement à ses débuts, il reste encore de nombreux aspects à examiner. En considérant l'ensemble de nos résultats et ceux des autres groupes, de nombreuses pistes intéressantes sont ouvertes, dans l'optique de poursuivre la caractérisation fonctionnelle des protéines CIC-5 et CIC-3 et d'en déterminer les rôles physiologiques. Cependant, je n'évoquerai que les perspectives qui me semblent les plus réalisables à court et moyen terme.

4.1. Perspectives concernant l'étude du CIC-5

Voies de régulation

L'ovocyte de xénope permet un fort niveau d'expression fonctionnelle du xCIC-5. Ce système cellulaire constitue donc un outil pour aller plus loin dans la caractérisation fonctionnelle de la protéine. Les voies de régulation de l'activité canal pourraient être étudiées dans l'ovocyte, en particulier l'implication d'une voie tyrosine protéine kinase. Il est possible d'examiner l'état de phosphorylation de la protéine à l'aide d'anticorps anti-phosphotyrosine disponibles dans le commerce. Si celle-ci est effectivement phosphorylée sur un résidu tyrosine, l'implication d'une voie tyrosine protéine kinase pourrait être examinée plus en détail en

déterminant si les inhibiteurs des tyrosine protéines kinases génistéine et tyrphostine 51 affectent l'état de phosphorylation de la protéine. Ces expériences feraient appel à des techniques couramment utilisées au laboratoire tel que l'immunoprécipitation et le Western blot. Si le xCIC-5 s'avère être régulé par une voie tyrosine protéine kinase, il est envisageable de se lancer dans la détermination plus précise de la (des) kinase(s) impliquée(s) bien que cela représente un travail fastidieux du fait de la multitude des tyrosine protéines kinases.

Relation structure/fonction

L'étude du xCIC-5 exprimé dans l'ovocyte de xénope, nous a permis de mettre en évidence sa sensibilité au pH extracellulaire, ainsi qu'aux ions métalliques. On pourrait déterminer les sites de liaison des protons et des ions métalliques par mutagenèse dirigée de la protéine, ce qui fournirait des informations d'ordre structural sur la protéine. L'analyse des courbes dose-réponse de ces effets inhibiteurs pourraient également fournir des renseignements sur la structure quaternaire de la protéine, à savoir si la protéine s'associe en homodimères, selon le modèle proposé pour d'autres protéines de la famille des CIC. Des expériences de *cross-link*, avec des agents de pontage réversibles, pourraient aider à déterminer la structure quaternaire de la protéine ou éventuellement mettre en évidence d'autres protéines associées au xCIC-5. La détermination des caractéristiques unitaires de la conductance induite dans les ovocytes pourrait être entreprise par patch-clamp ou éventuellement par analyse de bruit. La caractérisation électrophysiologique du canal unitaire est intéressante en elle-même et peut contribuer à la connaissance de la relation structure/fonction de la protéine. Toujours dans le cadre de l'étude structure/fonction, on pourrait déterminer les sites de glycosylation utilisés, par mutagenèse dirigée des sites de glycosylation potentiels. La détermination de ces sites contribue à confirmer le modèle topologique qui a été proposé.

Localisation et rôle physiologique

Grâce à la co-localisation du CIC-5 avec une ATPase à protons dans le rein, un modèle fonctionnel a pu être proposé. Ceci illustre l'apport des études de localisation dans la détermination du rôle physiologique d'une protéine. A l'aide d'anticorps anti-CIC-5, plus spécifiques que ceux dont nous disposons actuellement, il serait intéressant de confirmer la localisation intracellulaire du xCIC-5 dans la lignée cellulaire A6 et de déterminer la nature du compartiment intracellulaire à l'aide d'une co-localisation avec des marqueurs spécifiques des différents compartiments. La co-localisation avec une ATPase à protons serait également intéressante à réaliser. Le rôle physiologique du xCIC-5 pourrait être étudié sur une lignée cellulaire A6 dans laquelle l'expression du gène du xCIC-5 aurait été invalidée de manière permanente.

La peau de grenouille pourrait constituer un autre modèle d'étude du rôle physiologique du CIC-5. En effet, la peau de grenouille constitue un organe essentiel à l'homéostasie chez la grenouille, en particulier lors d'adaptations à des milieux de salinité et de pH particuliers. Ainsi,

l'épithélium de la peau de grenouille a largement été utilisé pour étudier les mécanismes de transport impliqués dans les transports transépithéliaux et la régulation du pH. Au sein de cet épithélium, on trouve les cellules riches en mitochondries (MRC) qui possèdent une ATPase à protons (V-ATPase) sur leur membrane apicale et dans des vésicules intracellulaires (Klein et al., 1997). Il serait intéressant d'examiner la localisation du CIC-5 dans les différents types cellulaires de cet épithélium. En effet, si le CIC-5 était co-localisé avec la V-ATPase des MRC, l'épithélium constituerait un modèle d'exploration du fonctionnement du CIC-5.

La localisation cellulaire du CIC-5 devrait également être réalisée dans d'autres organes chez le mammifère. Chez ces derniers, l'expression du CIC-5 prédomine dans le rein, mais son expression dans l'intestin n'est pas exclue. Nos expériences montrent que le xCIC-5 est présent dans l'intestin chez le xénope. Récemment, il a été proposé que le défaut génétique du CIC-5 interviendrait au niveau intestinal dans l'apparition de l'hypercalciurie (Luyckx et al., 1999). Pour tester le rôle physiologique du CIC-5 dans l'intestin, on pourrait déterminer l'effet de divers régimes alimentaires sur le niveau d'expression du CIC-5, par la technique de Western blot.

4.2. Perspectives concernant l'étude du CIC-3

Caractérisation fonctionnelle

L'expression du xCIC-3 dans l'ovocyte de xénope ou dans les cellules HEK 293 ne nous a pas permis de mettre en évidence une activité électrique nouvelle bien que la protéine soit synthétisée. L'absence de conductance nouvelle peut être due à la localisation intracellulaire de la protéine. Pour tester cette hypothèse il serait possible de mener des expériences de biotinylation des protéines de la membrane plasmique. Si le xCIC-3 se révélait être intracellulaire, le fractionnement cellulaire des ovocytes pourrait être utile dans la détermination de la localisation du xCIC-3. Une étude en patch-clamp du compartiment intracellulaire déterminé peut ensuite être envisagée afin de détecter l'activité électrique de la protéine (si elle en a une). Alternativement, l'absence de conductance nouvelle pourrait être due à l'absence d'un facteur cellulaire particulier. Dans ce cas, l'utilisation d'un autre système d'expression ou bien la recherche d'autres voies d'activation pourrait conduire à une expression fonctionnelle. L'expression du rCIC-3 dans la lignée cellulaire Sf 9 est actuellement en cours au laboratoire.

La recherche de protéines d'interaction peut constituer un moyen pour élucider la fonction du CIC-3. Ceci nécessiterait la mise en oeuvre d'une stratégie de double hybride à moins de réaliser la recherche en combinant l'utilisation d'agents de pontage (*cross-linking*) et l'immunoprécipitation du CIC-3.

Etude des glycoformes

Nous avons montré que le CIC-3 est une glycoprotéine lorsqu'elle est exprimée dans l'ovocyte de xénope, ainsi que naturellement dans différents organes de la souris. La masse moléculaire des N-glycanes portés par le CIC-3 varie selon les organes. Dans un premier temps, on pourrait déterminer les sites de glycosylation utilisés par mutagenèse dirigée. Dans un deuxième temps, la détermination de la nature des N-glycanes spécifiques aux différents organes et la localisation du CIC-3 dans ces organes contribuerait à élucider le rôle de la glycosylation différentielle.

Localisation et rôle physiologique

Comme pour l'étude du CIC-5, la localisation cellulaire du CIC-3 au niveau des différents organes peut être un moyen pour établir un modèle fonctionnel. Le rôle physiologique du CIC-3 peut également être examinée par Western blot sur des préparations membranaires des différents organes (cerveau, rein, intestin...) d'animaux soumis à des conditions particulières. L'étude du niveau d'expression du CIC-3 sur l'intestin d'animaux ayant reçu un régime alimentaire particulier, ou bien sur le rein d'animaux déshydratés, peut suggérer l'implication du CIC-3 dans la fonction intestinale ou bien rénale. La localisation précise du xCIC-3 sur la lignée cellulaire A6, à l'aide de techniques microscopiques performantes ou bien à l'aide du fractionnement cellulaire, permettrait de vérifier si la localisation du xCIC-3 est compatible avec celle des canaux chlorure impliqués dans la régulation du volume. Une lignée cellulaire A6 défailante pour l'expression du xCIC-3 pourrait constituer un outil pour la détermination du rôle physiologique du CIC-3 et pour tester son éventuelle implication dans la régulation du volume.

Dans les années à venir, la caractérisation fonctionnelle de protéines diverses et la compréhension de leur rôles physiologiques feront sûrement encore l'objet d'un grand nombre d'études du fait de l'avancement rapide de nombreux programmes de décryptage génomique, en particulier de celui de l'homme qui s'achève dans quelques mois, alors que son issue était initialement prévue pour 2010.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abriel, H. and Horisberger, J.D. 1999. Feedback inhibition of rat amiloride-sensitive epithelial sodium channels expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *J. Physiol. (Lond.)* 516: 31-43.
- Ackerman, M.J., Wickman, K.D. and Clapham, D.E. 1994. Hypotonicity activates a native chloride current in *Xenopus* oocytes. *J. Gen. Physiol.* 103: 153-179.
- Ackerman, M.J. and Clapham, D.E. 1997. Ion channels. Basic science and clinical disease. *N. Engl. J. Med.* 336: 1575-1586.
- Adachi, S., Uchida, S., Ito, H., Hata, M., Hiroe, M., Marumo, F. and Sasaki, S. 1994. Two isoforms of a chloride channel predominantly expressed in thick ascending limb of Henle's loop and collecting ducts of rat kidney. *J. Biol. Chem.* 269: 17677-17683.
- Adler, D.A., Rugarli, E.I., Lingenfelter, P.A., Tsuchiya, K., Poslinski, D., Liggitt, H.D., Chapman, V.M., Elliott, R.W., Ballabio, A. and Disteché, C.M. 1997. Evidence of evolutionary up-regulation of the single active X chromosome in mammals based on *Clc4* expression levels in *Mus spretus* and *Mus musculus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 9244-9248.
- Adrian, R.H. and Bryant, S.H. 1974. On the repetitive discharge in myotonic muscle fibres. *J. Physiol. (Lond.)* 240: 505-515.
- Akiyama, T., Ishida, J., Nakagawa, S., Ogawara, H., Watanabe, S., Itoh, N., Shibuya, F. and Fukami, Y. 1987. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J. Biol. Chem.* 262: 5592-5595.
- Akiyama, T. and Ogawara, H. 1991. Use and specificity of genistein as inhibitor of protein-tyrosine kinases. In *Methods in Enzymology*, vol. 201, ed. T. Hunter and B. M. Sefton, pp 362-370. Academic Press. Inc. San Diego, CA, USA.
- Al-Awqati, Q. 1994. An IAA-sensitive vacuolar chloride channel. In *Chloride channels*. W.B., editor. pp 35-57. Academic Press, San Diego.
- Al-Awqati, Q. 1995. Chloride channels of intracellular organelles. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7: 504-508.
- Arellano, R.O. and Miledi, R. 1995. Functional role of follicular cells in the generation of osmolarity-dependent Cl⁻ currents in *Xenopus* follicles. *J. Physiol. (Lond.)* 488: 351-357.
- Attali, B., Guillemare, E., Lesage, F., Honoré, E., Romey, G., Lazdunski, M. and Barhanin, J. 1993. The protein IsK is a dual activator of K⁺ and Cl⁻ channels. *Nature* 365: 850-852.
- Bae, H.-R. and Verkman, A. S. 1990. Protein kinase A regulates chloride conductance in endocytic vesicles from proximal tubule. *Nature* 348: 637-639.
- Banderali, U. and Roy, G. 1992a. Activation of K⁺ and Cl⁻ channels in MDCK cells during volume regulation in hypotonic media. *J. Membrane Biol.* 126: 219-234.
- Banderali, U. and Roy, G. 1992b. Anion channels for amino acids in MDCK cells. *Am. J. Physiol.* :263: C1200-C1207.
- Banderali, U. and Ehrenfeld, J. 1996. Heterogeneity of volume-sensitive chloride channels in basolateral membranes of A6 epithelial cells in culture. *J. Membrane Biol.* 154: 23-33.
- Banderali, U., Brochiero, E., Lindenthal, S., Raschi, C., Bogliolo, S. and Ehrenfeld, J. 1999. Control of apical membrane chloride permeability in the renal A6 cell line by nucleotides. *J. Physiol. (Lond.)* 519: 737-751.

- Barasch, J., Kiss, B., Prince, A., Saiman, L., Grunert, D. and Al-Awqati, Q. 1991. Defective acidification of intracellular organelles in cystic fibrosis. *Nature* 352: 70-73.
- Bauer, C.K., Steinmeyer, K., Schwarz, J.R. and Jentsch, T.J. 1991. Completely functional double-barreled chloride channel expressed from a single *Torpedo* cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 11052-11056.
- Beron, J. and Verrey, F. 1994. Aldosterone induces early activation and late accumulation of Na-K-ATPase at surface of A6 cells. *Am. J. Physiol.* 266: C1278-C1290.
- Bernard, C. 1857. *An introduction to the study of experimental medicine*. Trans. H.C. Greene, Dover, New York. 226 p.
- Betz, H., Kuhse, J., Schmieden, V., Laube, B., Kirsch, J. and Harvey, R.J. 1999. Structure and functions of inhibitory and excitatory glycine receptors. *Ann. N Y Acad. Sci.* 868: 667-676.
- Blatz, A.L. 1991. Properties of single fast chloride channels from rat cerebral cortex neurons. *J. Physiol. (Lond.)* 441: 1-21.
- Blatz, A.L., and Magleby, K.L. 1983. Voltage dependent Cl⁻ selective channels of large conductance in cultured rat muscle. *Biophys. J.* 43: 237-241.
- Blatz, A.L., and Magleby, K.L. 1985. Single chloride-selective channels active at resting membrane potentials in cultured rat skeletal muscle. *Biophys. J.* 47: 119-123.
- Blazer-Yost, B.L., Cox., M. and Furlanetto, R. 1989. Insulin and IGF I receptor-mediated Na⁺ transport in toad urinary bladders. *Am. J. Physiol.* 257: C612-C620.
- Block, M.L. and Moody, W.J. 1990. A voltage-dependent chloride current linked to the cell cycle in ascidian embryos. *Science* 247: 1090-1092.
- Boat, T.F., Welsh, M.J. and Beaudet, A.L. 1989. Cystic fibrosis. In *The metabolic basis of inherited disease*. Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. and Valle, D. eds. 6th ed., vol. II, pp 2649-2680. McGraw-Hill, New York.
- Bolino, A., Devoto, M., Enia, G., Zoccali, C., Weissenbach, J. and Romeo, G. 1993. Genetic mapping in the Xp11.2 region of a new form of X-linked hypophosphatemic rickets. *Eur. J. Hum. Genet.* 1: 269-279.
- Bond, T.D., Ambikapathy, S., Mohammad, S. and Valverde, M.A. 1998. Osmosensitive Cl⁻ currents and their relevance to regulatory volume decrease in human intestinal T84 cells: outwardly vs. inwardly rectifying currents. *J. Physiol. (Lond.)* 511: 45-54.
- Borsani, G., Rugarli, E.I., Tagliatela, M., Wong, C. and Ballabio, A. 1995. Characterization of a human and murine gene (CLCN3) sharing similarities to voltage-gated chloride channels and to a yeast integral membrane protein. *Genomics* 27: 131-141.
- Bowen, K.A., Tam, K. and Colomini, M. 1985. Evidence for titrable charges controlling the voltage dependence of the outer mitochondrial membrane channel, VDAC. *J. Membrane Biol.* 86: 51-60.
- Brandt, S. and Jentsch, T. 1995. ClC-6 and ClC-7 are two novel broadly expressed members of the ClC chloride channel family. *FEBS Lett.* 377: 15-20.
- Bretag, A.H. 1987. Muscle chloride channels. *Physiol. Rev.* 67: 618-724.

- Brochiero, E., Banderali, U., Lindenthal, S., Raschi, C. and Ehrenfeld, J. 1995. Basolateral membrane chloride permeability of A6 cells: implication in cell volume regulation. *Pflügers Arch.* 431: 32-45.
- Brune, W., Weber, R.G., Saul, B., von Knebel Doeberitz, M., Grond-Grinsbach, C., Kellerman, K., Meinck, H.M. and Becker, C.M 1996. A GLRA1 null mutation in recessive hyperekplexia challenges the functional role of glycine receptors. *Am. J. Hum. Genet.* 58: 989-997.
- Bubien, K.J., Kirk, K.L., Rado, T.A. and Frizzell, R.A. 1990. Cell cycle dependence of chloride permeability in normal and cystic fibrosis lymphocytes. *Science* 248: 1416-1419.
- Burckhardt, B.C., Kroll, B. and Frömter, E., 1992. Proton transport mechanism in the cell membrane of *Xenopus laevis* oocytes. *Pflügers Arch.* 420: 78-82.
- Burg, M.B. 1995. Molecular basis of osmotic regulation. *Am. J. Physiol.* 268: F983-F996.
- Burt, D.R. 1994. GABA_A receptor-activated chloride channels. In *Chloride channels*. W.B. Guggino, editor. pp 215-263. Academic Press, San Diego.
- Buyse, G., Voets, T., Tytgat, J., De Greefs, C., Droogmans, G. and Nilius, B. 1997. Expression of human pICln and ClC-6 in *Xenopus* oocytes induces an identical endogenous chloride conductance. *J. Biol. Chem.* 272: 3615-3621.
- Buyse, G., Trouet, D., Voets, T., Missiaen, L., Droogmans, G., Nilius, B. and Eggermont, J. 1998. Evidence for the intracellular location of chloride channel (ClC)-type proteins: co-localization of ClC-6a and ClC-6c with the sarco/endoplasmic-reticulum Ca²⁺ pump SERCA2b. *Biochem. J.* 330: 1015-1021.
- Cala, P.M. 1980. Volume regulation in *Amphiuma* red blood cells. The membrane potential and its implications regarding the nature of the ion-flux pathways. *J.Gen. Physiol.* 76: 683-708.
- Cala, P.M. 1983. Cell volume regulation by *Amphiuma* red blood cells. *J. Gen. Physiol.* 82: 761-784.
- Canfield, W.M., Johnson, K.F., Ye, R.D., Gregory, W. and Kornfeld, S. 1991. Localization of the signal for rapid internalization of the bovine cation-independent mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor to amino acids 24-29 of the cytoplasmic tail. *J. Biol. Chem.* 266: 5682-5688.
- Cannon, W.B. 1929. Organization for physiological homeostasis. *Physiol. Rev.* 9:399-431.
- Cannon, W.B. 1939. *The wisdom of the body*. Norton, New York. 312p.
- Casavola, V., Guerra, L., Reshkin, S.J., Jacobson, K.A., Verrey, F. and Murer, H. 1996. Effect of adenosine on Na⁺ and Cl⁻ currents in A6 monolayers. Receptor localization and messenger involvement. *J. Membrane Biol.* 151: 237-345.
- Chalfant, M.L., Coupaye-Gerard, B. and Kleyman, T.R. 1993. Distinct regulation of Na⁺ reabsorption and Cl⁻ secretion by arginine vasopressin in the amphibian cell line A6. *Am. J. Physiol.* 264: C1480-C1488.
- Chalfant, M.L., Denton, J.S., Berdiev, B.K., Ismailov, I.I., Benos, D.J. and Stanton, B.A. 1999. Intracellular H⁺ regulates the alpha-subunit of ENaC, the epithelial Na⁺ channel. *Am. J. Physiol.* 276: C477-C486.
- Chen, T.Y. 1998. Extracellular zinc ion inhibits ClC-0 chloride channels by facilitating slow gating. *J. Gen. Physiol.* 112: 715-726.

- Chu, S., Murray, C.B., Liu, M.M. and Zeitlin, P.L. 1996. A short ClC-2 mRNA transcript is produced by exon-skipping. *Nucleic Acids Res.* 24: 3453-3457.
- Chu, S. and Zeitlin, P.L. 1997. Alternative mRNA splice variants of the rat ClC-2 chloride channel gene are expressed in lung: genomic sequence and organisation of ClC-2. *Nucleic Acids Res.* 25: 4153-4159.
- Christensen, O. and Hoffman, E.K. 1992. Cell swelling activates K⁺ and Cl⁻ channels as well as non-selective stretch-activated cation channels in Ehrlich ascites tumor cells. *J. Membrane Biol.* 129: 13-36.
- Cid, L.P., Montrose-Rafizadeh, C., Smith, D.I., Guggino, W.B. and Cutting, G.R. 1995. Cloning of a putative human voltage-gated chloride channel (ClC-2) cDNA widely expressed in human tissues. *Hum. Mol. Genet.* 4: 407-413.
- Clark, S, Jordt, S.E., Jentsch, T.J. and Mathie, A. 1998. Characterization of the hyperpolarization-activated chloride current in dissociated rat sympathetic neurons. *J. Physiol. (Lond.)* 506: 665-678.
- Clayton, G.H., Staley, J., Wilcox, C.L., Owens, G.C. and Smith, R.L. 1998. Developmental expression of ClC-2 in the rat nervous system. *Brain Res. Dev.* 108: 307-318.
- Clemo, H.F., Feher, J.J. and Baumgarten, C.M. 1992. Modulation of rabbit ventricular cell volume and Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransport by cGMP and atrial natriuretic factor. *J. Gen. Physiol.* 100: 89-114.
- Coca-Prados, M., Sanchez-Torres, J., Peterson-Yantorno, K. and Civan, M.M. 1996. Association of ClC-3 channel with Cl⁻ transport by human nonpigmented ciliary epithelial cells. *J. Membrane Biol.* 150: 197-208.
- Colombini, M. 1994. Anion channels in the mitochondrial outer membrane. In *Chloride channels*. W.B. Guggino, editor. pp 73-101. Academic Press, San Diego.
- Conte Camerino, D., De Luca, A., Mambrini, M. and Vrbová, G. 1989. Membrane ionic conductances in normal and denervated skeletal muscle of rat during development. *Pflügers Arch.* 413: 568-570.
- Cox, J.S.G. 1967. Disodium cromoglycate (FPL 670) ('Intal'): a specific inhibitor of reaginic antibody-antigen mechanisms. *Nature* 216: 1328-1329.
- Cox, J.S.G., Beach, J.E., Blair, A.M., Clarke, A.J., King, J., Lee, T.B., Loveda, D.E.E., Moss, G.F., Orr, T.S.C., Ritchie, J.T. and Sheard, P. 1970. Disodium cromoglycate (Intal). *Adv. Drug Res.* 5: 115-195.
- Cunningham, S.A., Awayda, M.S., Bubien, J.K., Ismailov, I.I., Arrate, M.P., Berdiev, B.K., Benos, D.J. and Fuller, C.M. 1995. Cloning of an epithelial channel from bovine trachea. *J. Biol. Chem.* 270: 31016-31026.
- Cuppoletti, J., Baker, A.M. and Malinowska, D.H. 1993. Cl⁻ channels of the gastric parietal cell that are active at low pH. *Am. J. Physiol.* 264: C1609-C1618.
- Darlison, M.G. and Harvey, R.J. 1996. GABA-, glycine-, and glutamate-gated channels and their possible involvement in neurological and psychiatric illness. In *Molecular biology of membrane transport disorders* (ed.S.G. Schultz *et al.*), pp.169-180. Plenum Press, New York.
- De Biasi, M., Drewe, J.A., Kirsch, G.E. and Brown, A.M. 1993. Histidine substitution identifies a surface protein and confers Cs⁺ selectivity on a K⁺ pore. *Biophys. J.* 65: 1235-1242.

- De Greef, C., van der Heyden, S., Viana, F., Eggermont, J., De Bruijn, Raeymaekers, L., Droogmans, G. and Nilius, B. 1995. Lack of correlation between *mdr-1* expression and volume-activation of chloride currents in rat colon cancer cells. *Pflügers Arch.* 430: 296-298.
- De Smet, P., Simaels, J. and Van Driessche, W. 1995. Regulatory volume decrease in a renal distal tubular cell line (A6). I. Role of K^+ and Cl^- . *Pflügers Arch.* 430: 936-944.
- Devuyst, O., Christie, P.T., Courtoy, P.J., Beauwens, R. and Thakker, R.V. 1999. Intra-renal and subcellular distribution of the human chloride channel, *ClC-5*, reveals a pathophysiological basis for Dent's disease. *Hum. Mol. Genet.* 8: 247-257.
- Diaz, M., Vaverde, M.A., Higgins, C.F., Rucareanu, C. and Sepulveda, F.V. 1993. Volume-activated chloride channels in HeLa cells are blocked by verapamil and dideoxyforskolin. *Pflügers Arch.* 422: 347-353.
- Dick, G.M., Kuenzli, K.A., Horowitz, B., Hume, J.R. and Sanders, K.M. 1998. Functional and molecular identification of a novel chloride conductance in canine colonic smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 275: C940-C950.
- Dinudom, A., Young, J.A. and Cook, D.I. 1993. Na^+ and Cl^- conductances are controlled by cytosolic Cl^- concentration in the intralobular duct cells of mouse mandibular glands. *J. Membrane Biol.* 165: 289-295.
- Du, X.Y. and Sorota, S. 1999. Protein kinase C stimulates swelling-induced chloride current in canine atrial cells. *Pflügers Arch.* 437: 227-234.
- Duan, D., Winter, C., Cowley, S., Hume, J.R. and Horowitz, B. 1997. Molecular identification of a volume-regulated chloride channel. *Nature* 390: 417-421.
- Duan, D., Cowley, S., Horowitz, B. and Hume, J.R. 1999. A serine residue in *ClC-3* links phosphorylation-dephosphorylation to chloride channel regulation by cell volume. *J. Gen. Physiol.* 113: 57-70.
- Dubois, J.M. and Rouzair-Dubois, B. 1993. Role of potassium channels in mitogenesis. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 59: 1-21.
- Dumont, J.N. 1972. Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin): I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J. Morphol.* 136: 153-180.
- Duncan, R.R., Westwood, P.K., Boyd, A. and Ashley, R.H. 1997. Rat brain p64H1, expression of a new member of the p64 chloride channel protein family in endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 272: 23880-23886.
- Duprat, F., Lesage, F., Fink, M., Reyes, R., Heurteaux, C. and Lazdunski, M. 1997. TASK, a human background K^+ channel to sense external pH variations near physiological pH. *EMBO J.* 16: 5464-5471.
- Ehrenfeld, J., Raschi, C. and Brochiero, E. 1994. Basolateral potassium membrane permeability of A6 cells and cell volume regulation. *J. Membrane Biol.* 138: 181-195.
- Ehrenfeld, J. and Bogliolo, S. 1999. Cell volume regulation: control of taurine permeability in kidney cells. *J. Physiol. (Lond.)* 517: 57P (abstr.).
- Elble, R., Widom, A.D., Gruber, M., Abdel-Ghany, R., Levine, A., Cheng, H.C. and Pauli, B.U. 1997. Cloning and characterization of lung-endothelial cell adhesion molecule-1 suggest it is an endothelial chloride channel. *J. Biol. Chem.* 272: 27853-27861.

- Emma, F., Breton, S., Morrison, R., Wright, S.H. and Stange, K. 1998. Effect of cell swelling on membrane and cytoplasmic distribution of pICln. *Am. J. Physiol.* 274: C1545-1551.
- Fahlke, C., Rosenbohm, A., Mitrovic, N., George, A.L. and Rüdell, R. 1996. Mechanisms of voltage-dependent gating in skeletal muscle chloride channels. *Biophys. J.* 71: 695-706.
- Fahlke, C., Knittle, T., Gurnett, C.A., Campbell, K.P. and George, A.L. Jr. 1997. Subunit stoichiometry of human muscle chloride channels. *J. Gen. Physiol.* 109: 93-104.
- Fahlke, C., Rhodes, T.H., Desai, R.R. and George, A.L. Jr. 1998. Pore stoichiometry of a voltage-gated chloride channel. *Nature* 394: 687-690.
- Fiévet, B., Gabillat, N., Borgese, F. and Motais, R. 1995. Expression of band 3 anion exchanger induces chloride current and taurine transport: structure-function analysis. *EMBO J.* 14: 5158-5169.
- Fisher, S.E., Black, G.C.M., Lloyd, S.E., Hatchwell, E., Wrong, O., Thakker, R.V. and Craig, I.W. 1994. Isolation and partial characterization of a chloride channel gene which is expressed in kidney and is a candidate for Dent's disease (an X-linked hereditary nephrolithiasis). *Hum. Mol. Genet.* 3: 2053-2059.
- Fisher, S.E., Van Bakel, I., Lloyd, S.E., Pearce, S.H.S., Thakker, R.V. and Craig, I.W. 1995. Cloning and characterization of CLCN5, the human kidney chloride channel gene implicated in Dent's disease (an X-linked hereditary nephrolithiasis). *Genomics* 29: 598-606.
- Fong, P. and Jentsch, T.J. 1995. Molecular basis of epithelial Cl⁻ channels. *J. Membrane Biol.* 144: 189-197.
- Foskett, J.K. 1998. ClC and CFTR chloride channel gating. *Annu. Rev. Physiol.* 60: 689-717.
- Franciolini, F. and Nonner, W. 1987. Anion and cation permeability of a chloride channel in rat hippocampal neurons. *J. Gen. Physiol.* 90: 453-478.
- Franciolini, F. and Petris, A. 1988. Single chloride channels in cultured rat neurons. *Arch. Biochem. Biophys.* 261: 97-102.
- Friedrich, T., Breiderhoff, T. and Jentsch, T.J. 1999. Mutational analysis demonstrates that ClC-4 and ClC-5 directly mediate plasma membrane currents. *J. Biol. Chem.* 274: 896-902.
- Frizzell, R.A., Field, M. and Schultz, S.G. 1979. Sodium-coupled chloride transport by epithelial tissues. *Am. J. Physiol.* 236: F1-F8.
- Frizzell, R.A. and Morris, A.P. 1994. Chloride conductances of salt-secreting cells. In *Chloride channels*. W.B. Guggino, editor. pp 173-214. Academic Press, San Diego.
- Frömter, E. and Diamond, J. 1972. Route of passive ion permeation in epithelia. *Nat. New Biol.* 235: 9-13.
- Frymoyer, P.A., Scheinman, S.J., Dunham, P.B., Jones, D.B., Hueber, D.B. and Schroeder, E.T. 1991. X-linked recessive nephrolithiasis with renal failure. *N. Engl. J. Med.* 325: 681-686.
- Fuller, C.M., Ismailov, I.I., Keeton, D.A. and Benos, D.J. 1994. Phosphorylation and activation of a bovine tracheal anion channel by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *J. Biol. Chem.* 269: 26642-26650.
- Furukawa, T., Horikawa, S., Terai, T., Ogura, T., Katayama, Y. and Hiraoka, M. 1995. Molecular cloning and characterization of a novel truncated form (ClC-2β) of ClC-2α (ClC-2G) in rabbit heart. *FEBS Lett.* 375: 56-62. [Erratum: *FEBS Lett.* 403: 111 (1997)]

- Furukawa, T., Ogura, T., Katayama, Y. and Hiraoka, M. 1998. Characterization of rabbit ClC-2 current expressed in *Xenopus* oocytes and its contribution to volume regulation. *Am. J. Physiol.* 274: C500-C512.
- Gadsby, D.C., Nagel, G. and Hwang, T-C. 1995. The CFTR chloride channel of mammalian heart. *Annu. Rev. Physiol.* 57: 387-416.
- Galiotta, L.J.V., Falzoni, S., Di Virgilio, F., Romeo, G. and Zegarra-Moran, O. 1997. Characterization of volume-sensitive taurine- and Cl⁻-permeable channels. *Am. J. Physiol.* 273: C57-C66.
- George, A.L. Jr. 1998. Chloride channels and endocytosis: ClC-5 makes a Dent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 7843-7845.
- Gerencser, G.A., White, J.F., Gradmann, D. and Bonting, S.L. 1988. Is there a Cl⁻ pump? *Am. J. Physiol.* 255: R677-R692.
- Gandhi, R., Elble, R.C., Gruber, A.D., Schreur, K.D., Ji, H-L., Fuller, C.M. and Pauli, B.U. 1998. Molecular and functional characterization of a calcium-sensitive chloride channel from mouse lung. *J. Biol. Chem.* 273: 32096-32101.
- Gaxiola, R.A., Yuan, D.S., Klausner, R.D. and Fink, G.R. 1998. The yeast CLC chloride channel functions in cation homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 4046-4050.
- Gazit, A., Yaish, P., Gilon, C. and Levitzki, A. 1989. Tyrophostins I: synthesis and biological activity of protein tyrosine kinase inhibitors. *J. Med. Chem.* 32: 2344-2352.
- Gill, D.R., Hyde, S.C., Higgins, C.F., Valverde, M.A., Mintenig, G.M. and Sepulveda, F.V. 1992. Separation of drug transport and chloride channel functions of the human multidrug resistance P-glycoprotein. *Cell* 71: 23-32.
- Gingrich, K.J. and Burkat, P.M. 1998. Zn²⁺ inhibition of recombinant GABA_A receptors: an allosteric, state-dependent mechanism determined by the α -subunit. *J. Physiol. (Lond.)* 506: 609-625.
- Goldstein, L., Davis-Amaral, E.M., Vandeburgh, H.H. and Musch, M.W. 1997. Hypotonic exposure stimulates translocation of the swelling-activated channel protein pI_{Cl_{in}} in neonatal rat myocytes (Abstract). *J. Gen. Physiol.* 110: 36a.
- Gordon, J. 1991. Use of vanadate as Protein-Phosphotyrosine Phosphatase Inhibitor. In *Methods in Enzymology*, vol. 201, ed. T. Hunter and B. M. Sefton, pp 477-482. Academic Press. Inc. San Diego, CA, USA.
- Gottesman, M.M. and Pastan, I. 1993. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu. Rev. Biochem.* 62: 385-427.
- Gray, L.S. and Russel, J.H. 1986. Cytolytic T lymphocyte effector function requires plasma membrane chloride flux. *J. Immunol.* 136: 3032-3037.
- Greene, J.R., Brown, N.H., DiDomenico, B.J., Kaplan, J. and Eide, D. 1993. The GEF1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an integral membrane protein; mutations in which have effects on respiration and iron-limited growth. *Mol. Gen. Genet.* 241: 542-553.
- Gruber, A.D., Elble, R.C., Ji, H-L., Schreur, K.D., Fuller, C.M. and Pauli, B.U. 1998a. Genomic cloning, molecular characterization, and functional analysis of human CLCA1, the first human member of the family of Ca²⁺-activated Cl channel proteins. *Genomics* 54: 200-214.

- Gruber, A.D., Gandhi, R. and Pauli, B.U. 1998b. The murine calcium-sensitive chloride channel (mCaCC) is widely expressed in secretory epithelia and in other select tissues. *Histochem. Cell Biol.* 110: 43-49.
- Gruber, A.D., Schreur, K.D., Ji, H-L., Fuller, C.M. and Pauli, B.U. 1999. Molecular cloning and transmembrane structure of hCLCA2 from human lung, trachea, and mammary gland. *Am. J. Physiol.* 276: C1261-C1270.
- Gründer, S., Thiemann, A., Pusch M. and Jentsch, T. 1992. Regions involved in the opening of the ClC-2 chloride channel by voltage and cell volume. *Nature.* 360: 759-762.
- Gschwenter, M., Nagl, U.O., Wöll, E., Schmarda, A., Ritter, M. and Paulmichl, M. 1995. Antisense oligonucleotides suppress cell volume-induced activation of chloride channels. *Pflügers Arch.* 430: 464-470.
- Guizouarn, H., Harvey, B.J., Borgese, F., Gabillat, N., Garcia-Romeu, F. and Motais, R. 1993. Volume-activated Cl⁻-independent and Cl⁻-dependent K⁺ pathways in trout red blood cells. *J. Physiol. (Lond.)* 462: 609-626.
- Günther, W., Lüchow, A., Cluzeaud, F., Vandewalle, A. and Jentsch, T.J. 1998. ClC-5, the chloride channel mutated in Dent's disease, colocalizes with the proton pump in endocytotically active kidney cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 8075-8080.
- Gut, A., Kappeler, F., Hyka, N., Balda, M.S., Hauri, H.P. and Matter, K. 1998. Carbohydrate-mediated Golgi to cell surface transport and apical targeting of membrane proteins. *EMBO J.* 17: 1919-1929.
- Hainsworth, A.H., Henderson, R.M., Hickman, M.E., Hladky, S.B., Rowlands, T., Twentyman, P.R. and Barrand, M.A. 1996. Hypotonicity-induced anion fluxes in cells expressing the multidrug-resistance-associated protein, MRP. *Pflügers Arch.* 432: 234-240.
- Halm, D.R. and Frizzell, R.A. 1992. Anion permeation in an apical membrane chloride channel of a secretory epithelial cell. *J. Gen. Physiol.* 99: 339-366.
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. and Sigworth, F.J. 1981. Improved patch-clamp techniques for high resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.* 391: 85-100.
- Han, E.S., Vanoye-Trevido, C., Altenberg, G.A. and Reuss, L. 1994. Different properties of swelling-activated Cl⁻ currents in P-glycoprotein (Pgp) expressing and control cells (Abstract). *Biophys. J.* 66: A273.
- Handler, J.S., Steele, R.E., Sahib, M.K., Wade, J.B., Preston, A.S., Lawson, N.S.L. and Johnson, J.P. 1979. Toad urinary bladder epithelial cells in culture: maintenance of epithelial structure, sodium transport and response to hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4151-4155.
- Hanke, W. and Miller, C. 1983. Single chloride channels from *Torpedo* electroplax: activation by protons. *J. Gen. Physiol.* 82: 25-45.
- Hanley, M.J. and Kokko, J.P. 1978. Study of chloride transport across the rabbit cortical collecting tubule. *J. Clin. Invest.* 62: 39-44.
- Hardy, S.P., Goodfellow, H.R., Valverde, M.A., Gill, D.R., Sepulveda, F.V. and Higgins, C.F. 1995. Protein kinase C-mediated phosphorylation of the human multidrug resistance P-glycoprotein regulates cell volume-activated chloride channels. *EMBO J.* 14: 68-75.
- Harrison, N.L. and Gibbons, S.J. 1994. Zn²⁺: an endogenous modulator of ligand- and voltage-gated ion channels. *Neuropharmacology* 33: 935-952.

- Harvey, B.J., Thomas, S.R. and Ehrenfeld, J. 1988. Intracellular pH controls cell membrane Na⁺ and K⁺ conductances and transport in frog skin epithelium. *J. Gen. Physiol.* 92: 767-791.
- Hechenberger, M., Schwappach, B., Fischer, W.N., Frommer, W.B., Jentsch, T.J. and Steinmeyer, K. 1996. A family of putative chloride channels from *Arabidopsis* and functional complementation of a yeast strain with a *CIC* gene disruption. *J. Biol. Chem.* 271: 33632-33638.
- Hedrich, R. 1994. Voltage-dependent chloride channels in plant cells: identification, characterization, and regulation of a guard cell anion channel. In *Chloride channels*. W.B. Guggino, editor. pp 1-33. Academic Press, San Diego.
- Heinz, E. and Durbin, R. 1959. *Biochim. Biophys. Acta* 31: 246.
- Higgins, C.F. 1995. The ABC of channel regulation. *Cell* 82: 693-696.
- Hilden, S.A., Johns, C.A. and Madias, N.E. 1988. Cl⁻-dependent ATP-driven H⁺ transport in rabbit renal cortical endosomes. *Am J. Physiol.* 255: F885-F897.
- Hoffman, E.K., Sjøholm, C. and Simonsen, L.O. 1983. Na⁺, Cl⁻ cotransport in Ehrlich ascites tumor cells activated during volume regulation (regulatory volume increase). *J. Membrane Biol.* 76: 269-280.
- Hogben, C.A.M. 1955. *Am J. Physiol.* 180: 841.
- Holtmeier, H.J. 1991. Das Zink-Mangelsyndrom beim Menschen. In *Zink: Biochemie, Physiologie, Pathophysiologie und Klinik des Zinkstoffwechsels des Menschen*. Holtmeier H.J., Kruse-Jarres J., editors. pp 101-121. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart.
- Hughes, D., McBurney, R.N., Smith, S.M. and Zortec, R. 1987. Caesium ions activate chloride channels in rat cultured spinal cord neurons. *J. Physiol. (Lond.)* 392: 231-251.
- Hussy, N., Forestier, C., Vavasseur, A., Becq, F. and Valmier, J. 1999. Les canaux chlorure ou comment un poisson électrique éclaire la pathologie humaine. *médecine/sciences* 15: 1003-1007.
- Jackson, P.S. and Strange, K. 1993. Volume-sensitive anion channels mediate swelling-activated inositol and taurine efflux. *Am. J. Physiol.* 265: C1489-C1500.
- Jentsch, T.J., Steinmeyer, K. and Schwarz, G. 1990. Primary structure of *Torpedo marmorata* chloride channel isolated by expression cloning in *Xenopus* oocytes. *Nature* 348: 510-514.
- Jentsch, T.J., Pusch, M., Rehfeldt, A. and Steinmeyer, K. 1993. The CIC family of voltage-gated chloride channels: structure and function. *Ann. N Y Acad. Sci.* 707: 285-293.
- Jentsch, T.J. 1994. Molecular biology of voltage-gated chloride channels. In *Chloride channels*. W.B. Guggino, editor. pp 35-57. Academic Press, San Diego.
- Jentsch, T.J., Günther, W., Pusch, M. and Schwappach, B. 1995. Properties of voltage-gated chloride channels of the CIC gene family. *J. Physiol. (Lond.)* 482: 19S-25S.
- Jentsch, T.J., Friedrich, T., Schriever, A. and Yamada, H. 1999. The CIC chloride channel family. *Pflügers Arch.* 437: 783-795.
- Ji, H-L., DuVall, M.D., Patton, H.K., Satterfield, C.L., Fuller, C.M. and Benos, D.J. 1998. Functional expression of a truncated Ca²⁺-activated Cl⁻ channel and activation by phorbol ester. *Am. J. Physiol.* 274: C455-C464.

- Jirsch, J., Deeley, R.G., Cole, S.P.C., Stewart, A.J. and Fedida, D. 1993. Inwardly rectifying K⁺ channels and volume regulated anion channels in multidrug resistant small cell lung cancer cells. *Cancer Res.* 53: 4156-4160.
- Jordt, S.-E. and Jentsch, T.J. 1997. Molecular dissection of gating in the ClC-2 chloride channel. *EMBO J.* 16: 1582-1592.
- Karolyi, L., Koch, M.C., Grzeschik, K.H. and Seyberth, H.W. 1998. The molecular genetic approach to "Bartter's syndrome". *J. Mol. Med.* 76: 317-325.
- Kawasaki, M., Uchida, S., Monkawa, A., Mikoshiba, K., Marumo, F. and Sasaki, S. 1994. Cloning and expression of a protein kinase C-regulated chloride channel abundantly expressed in rat brain neuronal cells. *Neuron* 12: 597-604.
- Kawasaki, M., Suzuki, M., Uchida, S., Sasaki, S. and Marumo, F. 1995. Stable and functional expression of the ClC-3 chloride channel in somatic cell lines. *Neuron* 14: 1285-1291.
- Keeler, R. and Wong, N.L.M. 1986. Evidence that prostaglandin E2 stimulates chloride secretion in cultured A6 renal epithelial cells. *Am. J. Physiol.* 250: F511-F515.
- Keller, P. and Simons, K. 1997. Post-Golgi biosynthetic trafficking. *J. Cell Sci.* 110: 3001-3009.
- Kieferle, S., Fong, P., Bens, M., Vandewalle, A. and Jentsch, T. 1994. Two highly homologous members of the ClC chloride channel family in both rat and human kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 6943-6947.
- Kirk, K., Ellory, J.C. and Young, J.D. 1992. Transport of organic substrates via a volume-activated channel. *J. Biol. Chem.* 267: 23475-23478.
- Kirk, K. and Kirk, J. 1993. Volume regulatory taurine release from a human lung cancer cell line: evidence for amino acid transport via a volume-activated chloride channel. *FEBS Lett.* 336: 153-158.
- Klein, U., Timme, M., Zeiske, W. and Ehrenfeld, J. 1997. The H⁺ pump in frog skin (*Rana esculenta*): identification and localization of a V-ATPase. *J. Membrane Biol.* 157: 117-136.
- Klocke, R., Steinmeyer, K., Jentsch, T.J. and Jockusch, H. 1994. Role of innervation, excitability, and myogenic factors in the expression of the muscular chloride channel ClC-1. A study on normal and myotonic muscle. *J. Biol. Chem.* 269: 27635-27639.
- Koch, M.C., Steinmeyer, K., Lorenz, C., Ricker, K., Wolf, F., Otto, M., Zoll, B., Lehmann-Horn, F., Grzeschik, K.-H. and Jentsch, T.J. 1992. The skeletal muscle chloride channel in dominant and recessive human myotonia. *Science* 257: 797-800.
- Koefoed-Johnsen, V. and Ussing, H.H. 1958. The nature of the frog skin potential. *Acta Physiol. Scand.* 42: 298-308.
- Kowdley, G.C., Ackerman, S.J., John, J.E., Jones, L.R. and Moorman J.R. 1994. Hyperpolarisation-activated chloride currents in *Xenopus* oocytes. *J. Gen. Physiol.* 103: 217-230.
- Kozak, M. 1991. An analysis of vertebrate mRNA sequences: intimations of translational control. *J. Cell Biol.* 115: 887-903.
- Krapivinsky, G.B., Ackerman, M.J., Gordon, E.A., Krapivinsky, L.D. and Clapham, D.E. 1994. Molecular characterization of a swelling-induced chloride conductance regulatory protein, pICln. *Cell* 76: 439-448.

- Krieg, P.A. and Melton, D.A. 1984. Functional messenger RNAs are produced by SP6 in vitro transcription of cloned cDNAs. *Nucleic Acids Res.* 12: 7057-7070.
- Krishtal, O.A., Osipchuk, Y.V., Shelest, T.N. and Smirnov, S.V. 1987. Rapid extracellular pH transients related to synaptic transmission in rat hippocampal slices. *Brain Res.* 436: 352-356.
- Krogh, A. 1939. *Osmotic regulation in aquatic animals.* Cambridge University Press.
- Kunzelman, K., Allert, N., Kubitz, R., Breuer, W.V., Cabantchik, Z.I., Normann, C., Schumann, S., Leipziger, J. and Greger, R. 1994a. Forskolin and PMA pretreatment of HT29 cells alters their chloride conductance induced by cAMP, Ca²⁺ and hypotonic cell swelling. *Pflügers Arch.* 428: 76-83.
- Kunzelman, K., Slotki, I.N., Klein, P., Koslofsky, T., Ausiello, D.A., Greger, R. and Cabantchik, Z.I. 1994b. Effects of P-glycoprotein expression on cyclic AMP and volume-activated ion fluxes and conductances in HT-29 colon adenocarcinoma cells. *J. Cell Physiol.* 161: 393-406.
- Kunzelman, K. and Schreiber, R. 1999. CFTR, a regulator of channels. *J. Membrane Biol.* 168: 1-8.
- Kürz, L.L., Wagner, S., George Jr, A.L. and Rüdell, R. 1997. Probing the major skeletal muscle chloride channel with Zn²⁺ and other sulfhydryl-reactive compounds. *Pflügers Arch.* 433: 357-363.
- Kyte, J. and Doolittle, R.F. 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Membrane Biol.* 157: 105-132.
- Laich, A., Fürst J., Nagl, U.O., Gschwentner, M. and Paulmichl, M. 1996. The transposition of the swelling-dependent chloride channel I_{Cl_{in}} from the cytosol to the membrane is regulated by the cell volume (Abstract). *J. Gen. Physiol.* 108: 24a.
- Landry, D.W., Akabas, M.H., Redhead, C., Edelman, A., Cragoe, E.J., and Al-Awqati, Q. 1989. Purification and reconstitution of chloride channels from kidney and trachea. *Science* 244:1469-1472.
- Landry, D.W., Sullivan, S., Nicolaides, M., Redhead, C., Edelman, A., Field, M. and Al-Awqati, Q. 1993. Molecular cloning of p64, a chloride channel protein. *J. Biol. Chem.* 268: 14948-14955.
- Lang, M.A., Preston, A.S., Handler, J.S. and Forrest, J.N. 1985. Adenosine stimulates sodium transport in kidney A6 epithelia in culture. *Am. J. Physiol.* 249: C330-C336.
- Lauf, P.K. 1982. Evidence for a chloride-dependent potassium and water transport induced by hypo-osmotic stress in erythrocytes of the marine teleost *Opsanus tau*. *J. Comp. Physiol.* 146: 9-16.
- Leaf, A. 1959. Maintenance of concentration gradients and regulation of cell volume. *Ann. N Y Acad. Sci.* 72: 396-404.
- Lehmann-Horn, F. and Rüdell Reinhardt 1997. Channelopathies: their contribution to our knowledge about voltage-gated ion channels. *News Physiol. Sci.* 12: 105-112.
- Li, C., Morrison, R., Cannon, C.L., Emma, F., Sanchez-Olea, R., Bear, C. and Strange, K. 1998. Recombinant pICln forms highly cation-selective channels when reconstituted into artificial and biological membranes. *J. Gen. Physiol.* 112: 727-36.

- Lindenthal, S., Schmieder, S., Ehrenfeld, J. and Wills, N.K. 1997. Cloning and functional expression of a ClC Cl⁻ channel from the renal cell line A6. *Am. J. Physiol.* 273: C1176-C1185.
- Ling, B.N., Zuckerman, J.B., Lin, C., Harte, B.J., McNulty, K.A., Smith, P.R., Gomez, L.M., Worrell, R.T., Eaton, D.C. and Kleyman, T.R. 1997. Expression of the cystic fibrosis phenotype in a renal amphibian epithelial cell line. *J. Biol. Chem.* 272: 594-600.
- Lloyd, S.E., Pearce, S.H.S., Fischer, S.E., Steinmeyer, K., Schwappach, B., Scheinman, S.J., Harding, B., Bolino, A., Devoto, M., Goodyer, P., Rigden, S.P.A., Wrong, O., Jentsch, T.J., Craig, I.W. and Thakker, R.V. 1996. A common molecular basis for three inherited kidney stone diseases. *Nature* 379: 445-449.
- Lloyd, S.E., Pearce, S.H.S., Günther, W., Kawaguchi, H., Igarashi, T., Jentsch, T.J. and Thakker, R.V. 1997. Idiopathic low molecular weight proteinuria associated with hypercalciuric nephrocalcinosis in Japanese children is due to mutations of the renal chloride channel (CLCN5). *J. Clin. Invest.* 99: 967-974.
- Lorenz, C., Pusch, M. and Jentsch, T. 1996. Heteromultimeric ClC chloride channels with novel properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 13362-13366.
- Ludewig, U., Pusch, M. and Jentsch, T.J. 1996. Two physically distinct pores in the dimeric ClC-0 chloride channel. *Nature* 383: 340-343.
- Lundberg, A. 1957. *Acta Physiol. Scand.* 40:35.
- Lurin, C., Geelen, D., Barbier-Brygoo, H., Guern, J. and Maurel, C. 1996. Cloning and functional expression of a plant voltage-dependent chloride channel. *The Plant Cell* 8: 701-711.
- Lurin, C., Güclü, J., Cheniclet, C., Cardet, J.P., Barbier-Brygoo, H. and Maurel, C. 2000. CLC-Nt1, a putative chloride channel protein of tobacco, co-localizes with mitochondrial membrane markers. *Biochem. J.*, sous presse.
- Luyckx, V.A., Goda, F.O., Mount, D.B., Nishio, T., Hall, A., Hebert, S.C., Hammond T.G. and Yu, A.S.L. 1998. Intrarenal and subcellular localization of rat ClC-5. *Am. J. Physiol.* 275: F761-F769.
- Luyckx, V.A., Leclercq, B., Dowland, L.K. and Yu, A.S.L. 1999. Diet-dependent hypercalciuria in transgenic mice with reduced CLC-5 chloride channel expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 12174-12179.
- Malinowska, D., Kupert, E.Y., Bahinski, A., Sherry, A.M. and Cupoletti, J. 1995. Cloning and functional characterization of a PKA-activated gastric Cl⁻ channel. *Am. J. Physiol.* 268: C191-C200.
- Manella, C.A. 1992. The 'ins' and 'outs' of mitochondrial membrane channels. *Trends Biochem. Sci.* 17: 315-320.
- Marunaka, Y. and Eaton, D.C. 1990. Chloride channels in the apical membrane of a distal nephron A6 cell line. *Am. J. Physiol.* 258: C352-C368.
- Matsumura, Y., Uchida, S., Kondo, Y., Miyazaki, H., Ko, S.B.H., Hayama, A., Morimoto, T., Liu, W., Arisawa, M., Sasaki, S. and Marumo, F. 1999. Overt nephrogenic diabetes insipidus in mice lacking the CLC-K1 chloride channel. *Nature Genet.* 21: 95-98.
- Matter, K. and Mellman, I. 1994. Mechanisms of cell polarity: sorting and transport in epithelial cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6: 545-554.

- McCarty, N.A. and O'Neil, R.G. 1992. Calcium signaling in cell volume regulation. *Physiol. Rev.* 72: 1037-1061.
- McDowell, W. and Schwarz, R.T. 1988. Dissecting glycoprotein biosynthesis by the use of specific inhibitors. *Biochimie* 70: 1535-1549.
- McIntosh, I. and Cutting, G.R. 1992. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and the etiology and pathogenesis of cystic fibrosis. *FASEB J.* 6: 2775-2782.
- McManus, M.L., Churchwell, K.B. and Strange, K.S. 1995. Regulation of cell volume in health and disease. *N. Engl. J. Med.* 333: 1260-1266.
- Meldrum, B.S. 1989. GABAergic mechanisms in the pathogenesis and treatment of epilepsy. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 27: 3S-11S.
- Mellman, I., Fuchs, R. and Helenius, A. 1986. Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Annu. Rev. Biochem.* 55: 663-700.
- Middleton, R.E., Pheasant, D.J. and Miller, C. 1994. Purification, reconstitution, and subunit composition of a voltage-gated chloride channel from *Torpedo* electroplax. *Biochemistry*: 33: 13189-13198.
- Middleton, R.E., Pheasant, D.J. and Miller, C. 1996. Homodimeric architecture of a ClC-type chloride ion channel. *Nature* 383: 337-340.
- Miledi, R. and Parker, I. 1984. Chloride current induced by injection of calcium into *Xenopus* oocyte. *J. Physiol. (Lond.)* 357: 173-183.
- Miyazaki, H., Uchida, S., Takei, Y., Hirano, T., Marumo, F. and Sasaki, S. 1999. Molecular cloning of CLC chloride channels in *Oreochromis mossambicus* and their functional complementation of yeast CLC gene mutant. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 255: 175-181.
- Mo, L., Hellmich, H.L., Fong, P., Wood, T., Embesi, J. and Wills, N.K. 1999. Comparison of amphibian and human ClC-5: similarity of functional properties and inhibition by external pH. *J. Membrane Biol.* 168: 253-264.
- Moorman, J.R., Palmer, C.J., John, J.E., Durieux, M.E. and Jones, L.R. 1992. Phospholemman expression induces a hyperpolarisation-activated chloride current in *Xenopus* oocyte. *J. Biol. Chem.* 267: 14551-14554.
- Moorman, J.R., Ackerman, S.J., Kowdley, G.C., Griffin, M.P., Mounsey, J.P., Chen, Z., Cala, S.E., O'Brian, J.J., Szabo, G. and Jones, L.R. 1995. Unitary anion currents through phospholemman channel molecules. *Nature* 377: 737-740.
- Morin, X.K., Bond, T.D., Loo, T.W., Clarke, D.M. and Bear, C.E. 1995. Failure of P-glycoprotein (MDR1) expressed in *Xenopus* oocytes to produce swelling-activated channel activity. *J. Physiol. (Lond.)* 486: 707-714.
- Mülhardt, C., Fischer, M., Gass, P., Simon-Chazottes, D., Guenet, J.L., Kuhse, J., Betz, H. and Becker, C.M. 1994. The spastic mouse: Aberrant splicing of glycine receptor β subunit mRNA caused by intronic insertion of L1 element. *Neuron* 13: 1003-1015.
- Musch, M.W., Luer, C.A., Davis-Amaral, E.M. and Goldstein, L. 1997. Hypotonic stress induces translocation of the osmolyte channel protein pICln in embryonic skate (*Raja eglanteria*) heart. *J. Exp. Biol.* 277: 460-463.
- Mutch, W.A.C. and Hansen, A.J. 1984. Extracellular pH changes during depression and cerebral ischemia: mechanisms of brain pH regulation. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 4: 17-27.

- Nelson, J.D., Tang, J.M. and Palmer, L.G. 1984. Single-channel recordings of apical membrane chloride conductance in A6 cells. *J. Membrane Biol.* 80: 81-89.
- Nedergaard, M., Kraig, R.P., Tanabe, J. and Pulsinelli, W.A. 1991. Dynamics of interstitial and intracellular pH in evolving brain infarct. *Am. J. Physiol.* 260: R581-R588.
- Neher, E. and Sakmann, B. 1976. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260: 799-802.
- Nernst, W. 1888. Zur Kinetik in der Lösung befindlichen Körper. Theorie zur Diffusion. *Z. Phys. Chem.* 2: 613-637.
- Nilius, B. and Droogmans, G. 1994. A role for K⁺ channels in cell proliferation? *News Physiol. Sci.* 9: 105-110.
- Nilius, B., Eggermont, J., Voets, T. and Droogmans, G. 1996. Volume-activated Cl⁻ channels. *Gen. Pharmacol.* 27: 1131-1140.
- Nothwehr, S.F. and Stevens, T.H. 1994. Sorting of membrane proteins in the yeast secretory pathway. *J. Biol. Chem.* 269: 10185-10188.
- Obermüller, N., Gretz, N., Kriz, W., Reilly, R. and Witzgall, R. 1998. The swelling-activated chloride channel ClC-2, the chloride channel ClC-3, and ClC-5, a chloride channel mutated in kidney stone disease, are expressed in distinct subpopulations of renal epithelial cells. *J. Clin. Invest.* 101: 635-642.
- Okada, Y. 1997. Volume expansion-sensing outward-rectifier Cl⁻ channel: fresh start to the molecular identity and volume sensor. *Am. J. Physiol.* 273: C755-C789.
- Opdenakker, G., Rudd, P.M., Ponting, C.P. and Dwek, R.A. 1993. Concepts and principles of glycobiology. *FASEB J.* 7: 1330-1337.
- Palade, P.T. and Barchi, R.L. 1977. Characteristics of the chloride conductance in muscle fibers of the rat diaphragm. *J. Gen. Physiol.* 69: 325-342.
- Paulmichl, M., Li, Y., Wickman, K., Ackerman, M., Peralta, E. and Clapman, D. 1992. New mammalian chloride channel identified by expression cloning. *Nature* 356: 238-241.
- Penner, R., Matthews, G. and Neher, E. 1988. Regulation of calcium influx by second messengers in rat mast cells. *Nature* 334: 499-504.
- Perkins, F.M. and Handler, J.S. 1981. Transport properties of toad kidney epithelium in culture. *Am. J. Physiol.* 241: C154-C159.
- Piechaczyk, M., Blanchard, J.M., Marty, L., Dani, C., Panabieres, F., El Sabouty, S., Fort, P. and Jeanteur, P. 1984. Post-transcriptional regulation of glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase gene expression in rat tissues. *Nucleic Acids Res.* 12: 6951-6963.
- Piper, R.C., Tai, C., Kulesza, P., Pang, S., Warnock, D., Baenziger, J., Slot, J.W., Geuze, H.J., Puri, C. and James, D.E. 1993. GLUT-4 NH₂ terminus contains a phenylalanine-based targeting motif that regulates intracellular sequestration. *J. Cell Biol.* 121: 1221-1232.
- Pook, M.A., Wrong, O.M., Wooding, C., Norden, A.G.W., Feest, T.G. and Thakker, R.V. 1993. Dent's disease, a renal Fanconi syndrome with nephrocalcinosis and kidney stones, is associated with a microdeletion involving DXS255 and maps to Xp11.22. *Hum. Mol. Genet.* 2: 2129-2134.

- Prochazka, G., Landon, C. and Dennert, G. 1988. Transmembrane chloride flux is required for target cell lysis but not for Golgi reorientation in cloned cytolytic effector cells. *J. Immunol.* 141: 1288-1294.
- Puoti, A., May, A., Canessa, C.M., Horisberger, J.D., Schild, L. and Rossier, B.C. 1995. The highly selective low-conductance epithelial Na channel of *Xenopus laevis* A6 kidney cells. *Am. J. Physiol.* 269: C188-C197.
- Pusch, M., Steinmeyer, K. and Jentsch, T.J. 1994. Low single channel conductance of the major skeletal muscle chloride channel, ClC-1. *Biophys. J.* 66: 149-152.
- Pusch, M., Steinmeyer, K., Koch, M.C. and Jentsch, T.J. 1995. Mutations in dominant human myotonia congenita drastically alter the voltage dependence of the ClC-1 chloride channel. *Neuron* 15: 1455-1463.
- Rafferty, K.A. 1969. Mass culture of amphibian cells: methods and observation concerning stability of cell type. In Mizzel, M. (ed.), *Biology of amphibian tumors*. New York: Springer-Verlag, 52-81.
- Ran, S., Fuller, C.M., Arrate, M.P., Latorre, R. and Benos, D.J. 1992. Functional reconstitution of a chloride channel protein from bovine trachea. *J. Biol. Chem.* 267: 20630-20637.
- Rasola, A., Galiotta, L.J., Gruenert, D.C. and Romeo, G. 1994. Volume-sensitive chloride currents in four epithelial cell lines are not directly correlated to the expression of the MDR-1 gene. *J. Biol. Chem.* 269: 1432-1436.
- Redhead, C., Sullivan, S.K., Koseki, C., Fujiwara, K. and Edwards, J.C. 1997. Subcellular distribution and targeting of the intracellular chloride channel p64. *Mol. Biol. Cell* 8: 691-704.
- Reenstra, W.W. and Forte, J.G. 1990. Characterization of K⁺ and Cl⁻ conductances in apical membrane vesicles from stimulated rabbit oxyntic cells. *Am. J. Physiol.* 259: G850-G858.
- Reeves, W. B. and Andreoli, T. 1992. Renal epithelial chloride channels. *Annu. Rev. Physiol.* 54: 29-50.
- Riordan, J.R., Rommens, J.M., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielinski, J., Lok, S., Plavsic, N., Chou, J.L., Drumm, M.L., Iannuzzi, M.C., Collins, F.S. and Tsui, L.C. 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245: 1066-1073.
- Rodriguez-Boulan, E. and Powell, S.K. 1992. Polarity of epithelial and neuronal cells. *Annu. Rev. Cell Biol.* 8: 395-427.
- Rodriguez-Soriano, J. 1998. Bartter and related syndromes: the puzzle is almost solved. *Pediatr. Nephrol.* 12: 315-327.
- Romanin, C., Reinsprecht, M., Pecht, I. and Schindler, H. 1991. Immunologically activated chloride channels involved in degranulation of rat mucosal mast cells. *EMBO J.* 10: 3603-3608.
- Rommens, J.M., Iannuzzi, M.C., Kerem, B-S., Drumm, M.L., Melmer, G., Dean, M., Rozmahel, R., Cole, J.L., Kennedy, D., Hidaka, N., Zsiga, M., Buchwald, M., Riordan, J.R., Tsui, L-C. and Collins, F.S. 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 245: 1059-1065.
- Rudnick, G. 1985. Acidification of intracellular organelles. Mechanism and function. In *Physiology of membrane disorders*. ed. T.E. Andreoli, D.D. Fanestil, J.F. Hoffman, S.G. Schultz, vol. 25. New York: Plenum. 2. ed.

- Ryan, S.G., Buckwalter, M.S., Lynch, J.W., Handford, C.A., Segura, L., Shiang, R., Wasmuth, J.J., Camper, S.A., Schofield, P. and O'Connell, P. 1994. A missense mutation in the gene encoding the alpha1 subunit of the inhibitory glycine receptor in the *spasmodic* mouse. *Nature Genet.* 7: 131-135.
- Rychkov, G.Y., Pusch, M., Astill, D.S.J., Roberts, M.L., Jentsch, T.J. and Bretag, A.H. 1996. Concentration and pH dependence of skeletal muscle chloride channel ClC-1. *J. Physiol. (Lond.)* 497: 423-435.
- Rychkov, G.Y., Astill, D.S.J., Bennetts, B., Hughes, B.P., Bretag, A.H. and Roberts, M.L. 1997. pH-dependent interactions of Cd²⁺ and a carboxylate blocker with the rat ClC-1 chloride channel and its R304E mutant in the Sf-9 insect cell line. *J. Physiol. (Lond.)* 501: 355-362.
- Sabolic, I. and Burckhardt, G. 1986. Characteristics of the proton pump in rat renal cortical endocytotic vesicles. *Am. J. Physiol.* 250: F817-F826.
- Sacomani, G., Psarras, C.G., Smith, P.R., Kirk, K.L. and Shoemaker, R.L. 1991. Histamine-induced chloride channels in apical membrane of isolated rabbit parietal cells. *Am. J. Physiol.* 260: C1000-C1011.
- Sakamoto, H., Kawasaki, M., Uchida, S., Sasaki, S. and Marumo, F. 1996. Identification of a new outwardly rectifying Cl⁻ channel that belongs to a subfamily of the ClC Cl⁻ channels. *J. Biol. Chem.* 271: 10210-10216.
- Sakamoto, H., Sado, Y., Naito, I., Kwon, T.H., Inoue, S., Endo, K., Kawasaki, M., Uchida, S., Nielsen, S., Sasaki, S. and Marumo, F. 1999. Cellular and subcellular immunolocalization of ClC-5 channel in mouse kidney: colocalization with H⁺-ATPase. *Am. J. Physiol.* 277: F957-F965.
- Sanchez Olea, R., Pena, C., Moran, J., Pasantes-Morales, H. 1993. Inhibition of volume regulation and efflux osmoregulatory amino acids by blockers of Cl⁻ transport in cultured astrocytes. *Neurosci. Lett.* 156: 141-144.
- Sanchez Olea, R., Coghlan, M. and Strange, K. 1997. ClCln binds selectively to myosin light chain and a protein kinase (Abstract). *Biophys. J.* 72: A5.
- Sandre-Lurin, C. 1998. Caractérisation moléculaire et fonctionnelle de canaux anioniques de type CLC chez les plantes. Thèse en Sciences de la Vie. Université Paris 6.
- Sariban-Sohraby, S. and Benos, D.J. 1986. The amiloride-sensitive sodium channel. *Am. J. Physiol.* 250: C175-C190.
- Sasaki, S., Ishibashi, K., Nagai, T. and Marumo, F. 1992. Regulation mechanisms of intracellular pH of *Xenopus laevis* oocyte. *Biochim. Biophys. Acta* 1137: 45-51.
- Sasaki, S., Uchida, S., Kawasaki, M., Adachi, S. and Marumo, F. 1994. ClC family in the kidney. *Jpn. J. Physiol.* 44: S3-S8.
- Saviane, C., Conti, F. and Pusch, M. 1999. The muscular chloride channel CLC-1 has a double barreled appearance that is differentially affected in dominant and recessive myotonia. *J. Gen. Physiol.* 113: 457-467.
- Scheiffele, P., Peränen, J. and Simons, K. 1995. N-glycans as apical sorting signals in epithelial cells. *Nature* 378: 96-98.

- Schein, S.J., Colombini, M. and Finkelstein, A. 1976. Reconstitution in planar lipid bilayers of a voltage-dependent anion-selective channel obtained from *Paramecium* mitochondria. *J. Membrane Biol.* 30: 99-120.
- Scheinman, S.J. 1998. X-linked hypercalciuric nephrolithiasis: clinical syndromes and chloride channel mutations. *Kidney Int.* 53: 3-17.
- Schmid, A., Blum, R. and Krause, E. 1998. Characterization of cell volume-sensitive chloride currents in freshly prepared and cultured pancreatic acinar cells from early postnatal rats. *J. Physiol. (Lond.)* 513: 453-465.
- Schmid, A., Burckhardt, G. and Gogelein, H. 1989. Single chloride channels in endosomal vesicle preparations from rat kidney cortex. *J. Membr. Biol.* 111: 265-275.
- Schmidt-Rose, T. and Jentsch, T.J. 1997. Transmembrane topology of a CLC chloride channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 7633-7638.
- Schmieder, S., Lindenthal, S., Banderali, U. and Ehrenfeld, J. 1998. Characterization of the putative chloride channel xClC-5 in *Xenopus laevis* oocytes and comparison with endogenous chloride currents. *J. Physiol. (Lond.)* 511: 379-393.
- Schmieder, S., Lindenthal, S., Idelson, G. and Ehrenfeld, J. 1999. ClC-3 chloride channel distribution in mammalian tissue. *J. Physiol. (Lond.)* 517P: 15P (abstr.).
- Schriever, A.M., Friedrich, T., Pusch, M. and Jentsch, T.J. 1999. ClC chloride channels in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* 274: 34238-34244.
- Schwappach, B., Stobrawa, S., Hechenberger, M., Steinmeyer, K. and Jentsch, T.J. 1998. Golgi localization and functionally important domains in the NH₂ and COOH terminus of the yeast CLC putative chloride channel Gef1p. *J. Biol. Chem.* 273: 15110-15118.
- Schwartz, R.S., Rybicki, A.C. and Nagel, R.L. 1997. Molecular cloning and expression of a chloride channel-associated protein pI_{Cl_{in}} in human young red blood cells: association with actin. *Biochem. J.* 327: 609-616.
- Schwiebert, E.M., Lopes, A.G. and Guggino, W.B. 1994. Chloride channels along the nephron. In *Chloride channels*. W.B. Guggino, editor. pp 265-315. Academic Press, San Diego.
- Sherry, A.M., Stroffekova, K., Knapp, L.M., Kupert, E.Y., Cuppoletti, J. and Malinowska, D.H. 1997. Characterization of the human pH- and PKA-activated ClC-2G (2alpha) Cl⁻ channel. *Am J. Physiol.* 273: C384-C393.
- Shi, G. and Trimmer, J.S. 1999. Differential asparagine-linked glycosylation of voltage-gated K⁺ channels in mammalian brain and in transfected cells. *J. Membrane Biol.* 168: 265-273.
- Shiang, R., Ryan, S.G., Zhu, Y.Z., Hahn, A.F., O'Connell, P. and Wasmuth, J.J. 1993. Mutations in the alpha1 subunit of the glycine receptor cause the dominant neurological disorder, hyperekplexia. *Nature Genet.* 5: 351-357.
- Shuba, L.M., Ogura, T. and McDonald, T.F. 1996. Kinetic evidence distinguishing volume-sensitive chloride current from other types in guinea-pig ventricular myocytes. *J. Physiol. (Lond.)* 491: 69-80.
- Siesjö, B.K., von Hanwehr, R., Nerglius, G., Nevander, G. and Ingvar, M. 1985. Extra- and intracellular pH in the brain during seizures and in the recovery period following the arrest of seizure activity. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 5: 47-57.

- Simon, D.B., Bindra, R.S., Mansfield, T.A., Nelson-Williams, C., Mendonca, E., Stone, R., Schurman, S., Nayir, A., Alpay, H., Bakkaloglu, A., Rodriguez-Soriano, J., Morales, J.M., Sanjad, S.A., Taylor, C.M., Pilz, D., Brem, A., Trachtman, H., Griswold, W., Richard, G.A., John, E. and Lifton, R.P. 1997. Mutations in the chloride channel gene, CLCNKB, cause Bratter's syndrome type III. *Nature Genet.* 17: 171-178.
- Smith, D., Xu, W. and Varnold, R.L. 1991. Oogenesis and oocyte isolation. In *Methods in cell biology*. Kay, B.K. and Peng, H.B. editors. pp 45-60. Academic Press, San Diego.
- Smith, R.L., Clayton, G.H., Wilcox, C.L., Escudero, E.W., and Staley, H.J. 1995. differential expression of an inwardly rectifying chloride conductance in rat brain neurons: a potential mechanism for cell-specific modulation of postsynaptic inhibition. *J. Neurosci.* 15: 4057-4067.
- Staley, K.J., Smith, R., Schaak, J., Wilcox, C. and Jentsch, T.J. 1996. Alteration of GABA_A receptor function following gene transfer of the ClC-2 chloride channel. *Neuron* 17: 543-551.
- Steinmeyer, K., Ortland, C. and Jentsch, T.J. 1991. Primary structure and functional expression of a developmentally regulated skeletal muscle chloride channel. *Nature* 354: 301-304.
- Steinmeyer, K., Lorenz, C., Pusch, M., Koch, M.C. and Jentsch, T.J. 1994. Multimeric structure of ClC-1 chloride channel revealed by mutations in dominant myotonia congenita (Thomsen). *EMBO J.* 13: 737-743.
- Steinmeyer, K., Schwappach, B., Bens, M., Vandewalle, A. and Jentsch, T. 1995. Cloning and functional expression of rat ClC-5, a chloride channel related to kidney disease. *J. Biol. Chem.* 270: 31172-31177.
- Stoner, L.C., Burg, M.B. and Orloff, J. 1974. Ion transport in cortical collecting tubule; effect of amiloride. *Am. J. Physiol.* 227: 453-459.
- Strange, K. and Jackson, P.S. 1995. Swelling-activated organic osmolyte efflux: a new role for anion channels. *Kidney Int.* 48: 994-1003.
- Strange, K., Emma, F. and Jackson, P.S. 1996. Cellular and molecular physiology of volume-sensitive anion channels. *Am. J. Physiol.* 270: C711-C730.
- Strange, K. 1998. Molecular identity of the outwardly rectifying, swelling-activated anion channel: time to reevaluate pICln. *J. Gen. Physiol.* 111: 617-622.
- Stutzin, A., Torres, R., Oporto, M., Pacheco, P., Eguiguren, A.L., Cid, L.P. and Sepulveda, F.V. 1999. Separate taurine and chloride efflux pathways activated during regulatory volume decrease. *Am. J. Physiol.* 277: C392-C402.
- Takeuchi, Y., Uchida, S., Marumo, F. and Sasaki, S. 1995. Cloning, tissue distribution, and intrarenal localization of ClC chloride channels in human kidney. *Kidney Int.* 48: 1497-1503.
- Takeuchi, S. and Irimajiri, A. 1996. A novel, volume-correlated Cl⁻ conductance in marginal cells dissociated from the stria vascularis of gerbils. *J. Membrane Biol.* 150: 47-62.
- Tasker, J.G. and Dudek, F.E. 1991. Electrophysiology of GABA-mediated synaptic transmission and possible roles in epilepsy. *Neurochem. Res.* 16: 251-262.
- Thiemann, A., Gründer, S., Pusch, M. and Jentsch, T.J. 1992. A chloride channel widely expressed in epithelial and non-epithelial cells. *Nature* 356: 57-60.
- Tombaugh, G.C. and Somjen, G.G. 1996. Effects of extracellular pH on voltage-gated Na⁺, K⁺ and Ca²⁺ currents in isolated rat CA1 neurons. *J. Physiol. (Lond.)* 493: 719-732.

- Tominaga, M., Tominaga, T., Miwa, A. and Okada, Y. 1995. Volume-sensitive chloride channel activity does not depend on endogenous P-glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 270: 27887-27893.
- Tosteson, D.C., and Hoffman, J.F. 1960. Regulation of cell volume by active cation transport in high and low potassium sheep red cells. *J. Gen. Physiol.* 44: 169-194.
- Trowbridge, I.S., Collawn, J.F. and Hopkins, C.R. 1993. Signal-dependent membrane protein trafficking in the endocytic pathway. *Annu. Rev. Cell Biol.* 9: 129-161.
- Tzounopoulos, T., Maylie, J. and Adelman, J.P. 1995. Induction of endogenous channels by high levels of heterologous membrane proteins in *Xenopus* oocytes. *Biophys. J.* 69: 904-908.
- Uchida, S., Nakanishi, T., Kwon, H.M., Preston, A.S. and Handler, J.S. 1991. Taurine behaves as an osmolyte in Madin-Darby canine kidney cells. *J. Clin. Invest.* 88: 656-662.
- Uchida, S., Sasaki, S., Furukawa, T., Hiraoka, M., Imaia, T., Hirata, Y. and Marumo, F. 1993. Molecular cloning of a chloride channel that is regulated by dehydration and expressed predominantly in kidney medulla. *J. Biol. Chem.* 268: 3821-3824. [Erratum: *J. Biol. Chem.* 269: 19192 (1994).]
- Uchida, S., Sasaki, S., Nitta, K., Uchida, K., Horita, S., Nihei, H. and Marumo, F. 1995. Localization and functional characterization of rat kidney-specific chloride channel, ClC-K1. *J. Clin. Invest.* 95: 104-113.
- Uchida, S., Sasaki, S. and Marumo, F. 1996. Chloride transport across kidney epithelia through ClC chloride channels. *Jpn. J. Nephrol.* 38: 285-289.
- Ussing, H.H. and Zerahn, K. 1951. Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiol. Scand.* 23: 110-127.
- Ussing, H. H. and Windhager, E. E. 1964. Active sodium transport at the cellular level. In *Water and electrolyte metabolism II*, ed. J. De Graeff and B. Leijnse pp.3-19. Elsevier Publishing Company, Amsterdam, Netherlands.
- Valenzuela, S.M., Martin, D.K., Por, S.B., Robbins, J.M., Warton, K., Bootcov, M.R., Schofield, P.R., Campbell, T.J. and Breit, S.N. 1997. Molecular cloning and expression of a chloride ion channel of cell nuclei. *J. Biol. Chem.* 272: 12575-12582.
- Valverde, M.A., Diaz, M. and Sepulveda, F.V., Gill, D.R., Hyde, S.C. and Higgins, C.F. 1992. Volume-regulated chloride channels associated with the human multidrug-resistance P-glycoprotein. *Nature* 355: 830-833.
- Valverde, M.A., O'Brien, J.A., Sepulveda, F.V., Ratcliff, R.A., Evans, M.J. and Colledge, W.H. 1995. Impaired cell volume regulation in intestinal crypt epithelia of cystic fibrosis mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 9038-9041.
- Vandenberg, J.I., Yoshida, A., Kirk, K. and Powell, T. 1994. Swelling-activated and isoprenaline-activated chloride currents in guinea pig cardiac myocytes have distinct electrophysiology and pharmacology. *J. Gen. Physiol.* 104: 997-1017.
- Vandewalle, A., Cluzeaud, F., Bens, M., Kieferle, S., Steinmeyer, K. and Jentsch, T.J. 1997. Localization and induction by dehydration of ClC-K chloride channels in the rat kidney. *Am. J. Physiol.* 272: F678-F688.
- van Dyke, R.W. 1988. Proton pump-generated electrochemical gradients in rat liver multivesicular bodies. Quantitation and effects of chloride. *J. Biol. Chem.* 263: 2603-2611.

- van Slegtenhorst, M.A., Bassi, M.T., Borsani, G., Wapenar, M.C., Ferrero, G.B., De Conciliis, L., Grillo, A., Franco, B., Zoghbi, H. Y. and Ballabio, A. 1994. A gene from the Xp22.3 regions shares homology with voltage-gated chloride channels. *Hum. Mol. Genet.* 3: 547-552.
- Verrey, F. 1994. Antidiuretic hormone action in A6 cells: effect on apical Cl⁻ and Na⁺ conductances and synergism with aldosterone for NaCl reabsorption. *J. Membrane Biol.* 138: 65-76.
- Verrey, F., Schaerer, E., Zoerkler, P., Paccolat, M.P., Geering, K., Kraehenbuhl, J.P. and Rossier, B.C. 1987. Regulation by aldosterone of Na⁺, K⁺-ATPase mRNA, protein synthesis and sodium transport in cultured kidney cells. *J. Cell. Biol.* 104: 1231-1237.
- Voets, T., Szücs, G., Droogmans, G. and Nilius, B. 1995. Blockers of volume-activated Cl⁻ currents inhibit endothelial cell proliferation. *Pflügers Arch.* 431: 132-134.
- Voets, T., Buyse, G., Tytgat, J., Droogmans, G., Eggermont, J. and Nilius, B. 1996. The chloride current induced by expression of the protein pI_{Cl⁻} in *Xenopus* oocytes differs from the endogenous volume-sensitive chloride current. *Am. J. Physiol.* 495: 441-447.
- von Weikersthal, S.F., Barrand, M.A. and Hladky, S.B. 1999. Functional and molecular characterization of a volume-sensitive chloride current in rat brain endothelial cells. *J. Physiol. (Lond.)* 516: 75-84.
- Walker, J., Saraste, M., Runswick, M. and Gay, N. 1982. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* 1: 945-951.
- Weinreich, F., Wood, P., Riordan, J. and Nagel, G. 1997. Direct action of genistein on CFTR. *Pflügers Arch.* 434: 484-491.
- Welsh, M.J. and Smith, A.E. 1993. Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell* 73: 1251-1254.
- Welsh, M.J., Anderson, M.P., Rich, D.P., Berger, H.A. and Sheppard, D.N. 1994. The CFTR chloride channel. In *Chloride channels*. W.B. Guggino, editor. pp 153-171. Academic Press, San Diego.
- Williams, A.F., Parekh, R.B., Wing, D.R., Willis, A.C., Barclay, A.N., Dalchau, R., Fabre, J.W., Dwek, R.A. and Rademacher, T.W. 1993. Comparative analysis of the N-glycans of rat, mouse and human Thy-1. Site-specific oligosaccharide pattern of neural Thy-1, a member of the immunoglobulin superfamily. *Glycobiology* 3: 339-348.
- Wine, J.J. and Luckie, D.B. 1996. Cell-volume regulation: P-glycoprotein - a cautionary tale. *Curr. Biol.* 6: 1410-1412.
- Winters, C.J., Zimniak, L., Reeves, W.B. and Andreoli, T.E. 1997. Cl⁻ channels in basolateral renal medullary membranes XII. Anti-rbClC-Ka antibody blocks MTAL Cl⁻ channels. *Am. J. Physiol.* 273: F1030-F1038.
- Wischmeyer, E., Döring, F. and Karschin, A. 1998. Acute suppression of inwardly rectifying Kir2.1 channels by direct tyrosine kinase phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 273: 34063-34068.
- Wrong, O.M., Norden, A.G.W. and Feest, T.G. 1994. Dent's disease; a familial proximal renal tubular syndrome with low-molecular-weight proteinuria, hypercalciuria, nephrocalcinosis, metabolic bone disease, progressive renal failure and a marked male predominance. *Q. J. Med.* 87: 473-493.

- Yamamoto, F., Borgula, G.A., and Steinberg, R.H. 1992. Effects of light and darkness on pH outside rod photoreceptors in the cat retina. *Exp. Eye Res.* 54: 685-697.
- Yamazaki, J., Duan, D., Janiak, R., Kuenzli, K., Horowitz, B. and Hume, J.R. 1998. Functional and molecular expression of volume-regulated chloride channels in canine vascular smooth muscle cells. *J. Physiol. (Lond.)* 507: 729-736.
- Yanase, M. and Handler, J.S. 1986. Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate stimulates chloride secretion in A6 epithelia. *Am. J. Physiol.* 251: C810-C814.
- Yoshikawa, M., Uchida, S., Yamauchi, A., Miyai, A., Tanaka, Y., Sasaki, S. and Marumo, F. 1999. Localization of rat CLC-K2 chloride channel mRNA in the kidney. *Am. J. Physiol.* 276: F552-F558.
- Yu, W.H., Wolfgang, W. and Forte, M. 1995. Subcellular localization of human voltage-dependant anion channel isoforms. *J. Biol. Chem.* 270: 13998-14006.
- Zimniak, L., Winters, C.J., Reeves, W.B. and Andreoli, T.E. 1995. Cl⁻ channels in basolateral renal medullary vesicles X. Cloning of a Cl⁻ channel from rabbit outer medulla. *Kidney Int.* 48: 1828-1836.
- Zimniak, L., Winters, C.J., Reeves, W.B. and Andreoli, T.E. 1996. Cl⁻ channels in basolateral renal medullary vesicles XI. *rbClC-Ka* cDNA encodes basolateral MTAL Cl⁻ channels. *Am. J. Physiol.* 270: F1066-F1072.