HAL
open science

Physiologie et Physiopathologie du transport de chlore dans le canal collecteur rénal : caractérisation d'un modèle murin d'Acidose tubulaire rénale distale et Étude des mécanismes de régulation du canal ClC-Kb/Barttin

Bettina Serbin

To cite this version:

Bettina Serbin. Physiologie et Physiopathologie du transport de chlore dans le canal collecteur rénal : caractérisation d'un modèle murin d'Acidose tubulaire rénale distale et Étude des mécanismes de régulation du canal ClC-Kb/Barttin. Physiologie [q-bio.TO]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2016. Français. NNT : 2016PA066213 . tel-01596700

HAL Id: tel-01596700

https://theses.hal.science/tel-01596700v1

Submitted on 28 Sep 2017

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.

THÈSE DE DOCTORAT

Présentée par :

Melle Bettina SERBIN

Pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université Pierre et Marie Curie

Spécialité : Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique

Physiologie et Physiopathologie du transport de chlore dans le canal collecteur rénal :

Caractérisation d'un modèle murin d'Acidose tubulaire rénale distale et Étude des mécanismes de régulation du canal ClC-Kb/Barttin

Soutenue le 24 Juin 2016

Devant un jury composé de :

Pr Jean-Claude DUSSAULE	Président du Jury
Dr Maria-Christina ZENNARO	Rapporteur
Dr Isabelle RUBERA	Rapporteur
Dr Christos CHADJICHRISTOS	Examinateur
Dr Rosa VARGAS-POUSSOU	Examinateur
Dr Dominique ELADARI	Directeur de thèse
Pr Jacques TEULON	Membre Invité

REMERCIEMENTS

Je tiens à adresser mes remerciements les plus sincères aux membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce travail, et en particulier le Pr Jean-Claude Dussaule qui a bien voulu présider ce jury. Je remercie également le Dr Maria-Christina Zennaro et le Dr Isabelle Rubera qui ont accepté avec une grande gentillesse d'en être les rapporteurs, malgré leurs emplois du temps chargés.

Je voudrais également exprimer ma reconnaissance aux examinateurs, le Dr Christos Chadjichristos qui fut également mon tuteur de thèse, et le Dr Rosa Vargas-Poussou.

Je veux en outre dire ma profonde gratitude à mon directeur de thèse, le docteur Dominique Eladari, pour m'avoir accueillie dans son équipe. Merci d'avoir cru en moi dès mon premier stage de M1, et de m'avoir permis d'accéder à ce fantastique laboratoire qu'est le PARCC.

Ce témoignage de gratitude s'adresse aussi au Dr Régine Chambrey qui fut ma première encadrante et qui m'a jusqu'à présent guidée avec estime et confiance.

J'adresse une pensée toute particulière, accompagnée de ma profonde reconnaissance, au Dr Juliette Hadchouel qui a encadré mon stage de M2 et m'a toujours entourée de son soutien, autant sur le plan professionnel que personnel.

Je n'oublierais jamais mes collègues de l'équipe 12 de l'U970. À Chloé, ma formidable « coupine vanille » et mon soutien quotidien, Christelle « Cricri » qui m'a tant appris, Francesco « picollo », mon grand frère venu d'Italie, Nikita, mon grand ami venant tout droit de Russie, Maria et Karen, les latinas et Yusuke, qui ne sera pas oublié. Merci pour les liens tissés, les idées échangées, les interactions scientifiques, le travail d'équipe ; vous avez rendu mon expérience de doctorante tellement enrichissante !

Et bien sûr, un grand merci à tous mes camarades et, collègues avec qui j'ai tant partagé au cours de ces trois heureuses années, et en particulier : Mélanie et Romuald, le cru 2016 des doc du 1er étage ; les amis du BDE : Didi, Alex, mini Judith, Rami et Georgios ; toutes les personnes formidables du premier étage, et elles sont si nombreuses que j'espère ne pas en oublier : Charlotte, Aurélie, Judith, Sheerazed, Fabio, Angélique, Isabelle, Nabila, Ilektra, Cyrielle, Catherine, notre super gestionnaire, Bruno, le grand manitou de l'informatique et Philippe, le meilleur secrétaire général du monde aka DJ Phiphi ; mes amis du 2ème : Ivana, Andréas, le gang de la summer school, et bien d'autres. Merci pour les moments de complicité et de bonne humeur partagés dans et en dehors du PARCC. Je mesure pleinement la chance d'avoir pu vous côtoyer ou travailler avec des personnes telles que vous.

To us mes remerciements aussi à ceux qui ont contribué à l'accomplissement de ce projet, notamment l'équipe Métabolisme et physiologie rénale du Centre de Recherche des Cordeliers qui m'a accueillie avec beaucoup de bienveillance pour une partie de ce travail et, en particulier, le Pr Jacques Teulon, le Dr Olga Andrini et le Dr Nicolas Picard.

À l'ensemble de mes amis BIPs, Charlotte, Jérémy, Brune, Belen, JB, Hugo, Thomas, et à mes complices de toujours, Marina, Violette, Pierrick, Gwen, Gwena et tous ceux que je ne peux pas citer mais qui se reconnaitront.

Enfin, merci du fond du cœur à ma formidable famille qui m'a toujours soutenue avec affection et confiance. Et à mon père, dont j'ai peut-être inconsciemment voulu suivre la voie dans le monde médical.

À ma mère, Sylvia, mon héroïne, qui a éclairé mon chemin

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION GÉNÉRALE 13

PREMIÈRE ÉTUDE 16

INTRODUCTION 17

I. Balance acido-basique et gestion de la charge acide par le rein 17

1. Maintien de la balance acido-basique par le rein 17

2. Excrétion nette d'acide 18

3. Mécanismes de transport de HCO_3^- et de NH_3/NH_4^+ le long du néphron 19

3.1 Le tubule proximal 21

3.1.1 Mécanismes moléculaires de la réabsorption de HCO_3^- dans le tubule proximal 21

3.1.2 Mécanismes moléculaires de la sécrétion de NH_3/NH_4^+ par le tubule proximal 23

3.2 L'anse de Henlé 25

3.2.1 Rôles de la branche large ascendante dans la réabsorption de HCO_3^- 25

3.2.2 Mécanismes moléculaires de la réabsorption de HCO_3^- dans la branche large ascendante .. 26

3.2.3 Rôles de la branche large ascendante dans l'excrétion rénale de NH_4^+ 27

3.2.4 Mécanismes de la réabsorption de NH_4^+ dans la branche large ascendante 28

3.3 Le néphron distal (Tubule contourné distal, tubule connecteur et canal collecteur) 29

3.3.1 Mécanismes moléculaires d'acidification de l'urine dans le néphron distal 30

a) Les cellules α-intercalaires 31

b) Les cellules β-intercalaires 32

4. L'adaptation rénale à une charge acide 33

II. Les Acidoses tubulaires rénales 34

1. Définition 34

1.1 L'acidose tubulaire proximale (Type 2) 35

1.2 L'acidose tubulaire mixte (Type 3) 36

1.3 L'acidose tubulaire hyperkaliémique (Type 4) 36

2. L'acidose tubulaire distale 37

2.1 Étiologie 37

2.2 L'acidose tubulaire distale associée aux mutations d'AE1 38

2.2.1 AE1, l'échangeur Cl^--HCO_3^- du canal collecteur et des érythrocytes. 38

a) La famille des SLC4 38

b) AE1 : Découverte et structure 39

2.2.2 Les mutations pathogènes d'AE1 responsables de dRTA 40
2.3 Les modèles murins d'acidose tubulaire distale 43
OBJECTIF DE L'ÉTUDE 44
RÉSULTATS 45
SYNTHÈSE 46
ARTICLE 47

SECONDE ÉTUDE 102

INTRODUCTION 103
I. Les CLC : une grande famille de canaux et transporteurs de chlore 103
1. Généralités sur les CLC 103
2. Structure et régulation des CLC 105
2.1 Structure générale des CLC 105
2.2 Dépendance au voltage et régulation des CLC 106
2.2.1 Dépendance au voltage 106
2.2.2 Dépendance au pH 106
3. Rôles physiologiques des CLC et pathologies associées 107
3.1 ClC-1 : un canal Cl^- qui stabilise le potentiel membranaire du muscle squelettique 107
3.2 ClC-2 : un canal Cl^- largement exprimé dans l'organisme et aux multiples rôles 108
3.3 ClC-3 : un échangeur Cl^-/H^+ endosomal très controversé 109
3.4 ClC-4 : un échangeur Cl^-/H^+ endosomal avec un rôle probable dans le développement cérébral. 109
3.5 ClC-5 : un échangeur Cl^-/H^+ endosomal indispensable à l'endocytose dans le rein 110
3.6 ClC-6 : un échangeur Cl^-/H^+ des endosomes tardifs des neurones 111
3.7 ClC-7/Ostm1 : un échangeur Cl^-/H^+ lysosomal indispensable à l'intégrité du cerveau et des os. 112
II. Propriétés et régulation du canal ClC-Kb/Barttin 114
1. Découvertes des ClC-K et de la Barttin 114
2. Propriétés du canal ClC-Kb/Barttin 115
2.1 Propriétés biophysiques du canal ClC-Kb/Barttin 115
2.2 Régulation par le pH et le Ca^{2+} extracellulaire in vitro 117
3. Fonctions de la Barttin 117

4. Déterminants structurels des fonctions de la Barttin 119
III. Rôles physiologiques du complexe ClC-Kb/Barttin et son implication dans le Syndrome de Bartter 120
1. Transport de chlore dans le néphron distal et régulation de la pression artérielle 120
2. Localisation du complexe ClC-Kb/Barttin dans le rein 122
3. Transport de NaCl et fonction de ClC-Kb/Barttin dans le rein 123
3.1 Mécanismes de transport du NaCl dans la branche large ascendante de l'anse de Henlé ... 124
3.2 Mécanismes de transport du NaCl dans le tubule contourné distal 125
3.3 Mécanismes de transport du NaCl dans le tubule connecteur et le canal collecteur 127
4. Le Syndrome de Bartter 130
4.1 Etiologies 130
4.2 Données génétiques 132
OBJECTIF DE L'ÉTUDE 135
MATÉRIEL ET MÉTHODES 136
I. Expression hétérologue et Mutagénèse 136
II. Électrophysiologie 138
III. Analyse biochimique de l'expression et de l'insertion membranaire du complexe ClC-Kb/Barttin 141
IV. Microscopie confocale 143
V. Isolation de fragments tubulaires par COPAS (Complex Object Parametric Analyser Sorter) 143
VI. Phosphoprotéomique semi quantitative par marquage métabolique : SILAC ou « Stable Isotope Labelling by Amino acids in Cell» 144
VII. Analyses statistiques 145
RÉSULTATS 146
I. Analyse du phosphoprotéome du canal collecteur par spectrométrie de masse 146
1. Le niveau de phosphorylation de la Barttin est régulé par l'apport en sel 146
II. Mesure de l'activité de ClC-Kb 148
1. La phosphorylation sur la sérine conservée de la Barttin augmente les courants chlore médiés par ClC-Kb 148
2. La phosphorylation sur une sérine non conservée de la Barttin n'a pas d'effet sur les courants chlore médiés par ClC-Kb 150

III. Analyse de l'expression de surface et de la distribution intracellulaire du canal ClC-Kb/Barttin 151
1. La phosphorylation de la Barttin augmente l'expression de ClC-Kb à la surface membranaire. 151
2. La phosphorylation de la Barttin favorise le trafic intracellulaire du complexe ClC-Kb/Barttin vers la surface membranaire. 153
IV. Analyse de la stabilité de la Barttin 155
V. Génération du modèle murin porteur de la mutation bloquant la phosphorylation de la Barttin. 156
DISCUSSION 159
1. La phosphorylation de la Barttin augmente le transport de chlore par ClC-Kb 160
2. La phosphorylation de la Barttin augmente la densité des canaux ClC-Kb à la membrane 161
3. La phosphorylation de la Barttin augmente sa stabilité à la membrane 162
CONCLUSION GÉNÉRALE 164

INDEX DES FIGURES

Figure 1: Schéma d'une coupe longitudinale de rein humain et néphron en vue détaillée 13
Figure 2: Représentation schématique d'un néphron 14
Figure 3: Schéma de la balance Acide-Base. 17
Figure 4: Contribution relative de l'acidité titrable et de l'ammonium dans l'excrétion d'acide chez un adulte sous régime contrôle 18
Figure 5: Transport de HCO_3^- le long du néphron. 20
Figure 6: Transport d'ammonium (NH_4^+) le long du néphron. 20
Figure 7: Mécanismes de la réabsorption de HCO3- dans les cellules du PT 21
Figure 8: Mécanismes moléculaires impliqués dans la sécrétion d'ammonium NH_4^+ par les cellules du PT 23
Figure 9: Mécanismes de réabsorption de HCO_3^- dans les cellules de la TAL 26
Figure 10: Mécanismes de la sécrétion d'ammonium NH_4^+ par les cellules de la TAL 28
Figure 11: Mécanismes moléculaires d'acidification dans le CD 30
Figure 12: Adaptation rénale à l'acidose métabolique 33
Figure 13: Arbre phylogénique des SLC4. (D'après Romero et al., 2004) 38
Figure 14: Schéma des mécanismes par lesquels les mutations d'AE1 conduisent à un transport Cl-/HCO3- altéré dans la dRTA 42
Figure 15: Arbre phylogénétique de la famille CLC 104
Figure 16: Structure en dimère des CLC 105
Figure 17: Structure d'un monomère de CLC eucaryote. 106
Figure 18: Résumé des principales caractéristiques des CLC de mammifère 113
Figure 19: Structure de la Barttin. 115
Figure 20: Les courants ClC-Kb/Barttin 115
Figure 21: Réabsorption du Na^+ filtré le long du néphron. 123
Figure 22: Mécanismes de réabsorption de NaCl dans les cellules de la TAL 124
Figure 23: Mécanismes de réabsorption de NaCl dans les cellules du DCT 126
Figure 24: Mécanismes de réabsorption de NaCl dans les cellules du CD 127
Figure 25: Les différents types de Syndrome de Bartter 132
Figure 26: Mutations de la Barttin associées au Bartter de type IV 133
Figure 27: Schéma du dispositif de voltage-clamp en double microélectrodes (TEVC). 139
Figure 28: Gamme dose-réponse ClC-Kb-eGFP + hBarttin 141

Figure 29: Représentation schématique du principe de la technique SILAC. 144
Figure 30: La phosphorylation sur la sérine S90 est augmentée par la restriction sodée 147
Figure 31: La phosphorylation sur le phospho-site S93 augmente l'activité de ClC-Kb. 149
Figure 32: : La phosphorylation sur le phosphosite S91 ne modifie pas l'activité de ClC-Kb. 150
Figure 33: La phosphorylation de la Barttin stimule l'insertion de ClC-Kb à la membrane.. 152
Figure 34: La phosphorylation de la Barttin favorise le trafic cellulaire du complexe vers la membrane. 154
Figure 35: La phosphorylation de la Barttin stabilise la Barttin à la membrane..... 155
Figure 36: Stratégie de production de l'allèle Bsnd S90A. 157
Figure 37: Séquençage de l'ADNc des souris de souris sauvages (WT), hétérozygotes (+/ki) et homozygotes (ki/ki)..... 158

INDEX DES TABLEAUX

Tableau 1: Mutations de AE1/SLC4A1 associées à la dRTA..... 41
Tableau 2: Les mutations pathogènes de la Barttin..... 134
Tableau 3: Vecteurs d'expression..... 137
Tableau 4: Amorces de mutagénèse de la hBarttin 137
Tableau 5: Composition des solutions d'élétrophysiologie 140

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Les différents segments du néphron :

CCD : Canal collecteur cortical – Cortical collecting duct

CD : Canal collecteur - Collecting duct

CNT : Tubule connecteur – Connecting tubule

DCT : Tubule contourné distal – Distal convoluted tubule

IMCD : Inner Medullary Collecting Duct.

OMCD : Outer Medullary Collecting Duct.

PT : Tubule proximal – Proximal tubule

TAL : Branche ascendante large de l'anse de Henlé - Thick ascending limp

Les différents canaux et transporteurs ioniques :

AE1/2 : Anion Exchanger 1/2

AQP2/3/4 : Aquaporine 2/3/4

CA-II/IV : Carbonic anhydrase II/IV

CLC : Chloride Channel

ENaC : Epithelial Na^+ Channel

KCC4 : K^+ -Cl^- co-transporter 4

NBCe1 : Electrogenic sodium bicarbonate co-transporter

NCC : Sodium-Chloride co-transporter

NDCBE : Sodium-Driven Chloride/Bicarbonate Exchanger

NHE3 : Na^+/H^+ Exchanger isoform 3

NKCC1 ou 2 : Co-transporteur Na, K, 2Cl de type 1 ou 2

ROMK : Renal Outer Medullary K^+ channel

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ADNc : Acide Désoxyribonucléique complémentaire

ARNm : Acide Ribonucléique messager

ATP : Adénosine Triphosphate

AVP : Arginine Vassopressine (= ADH : Hormone Antidiuretique)

BSA : Albumine de sérum bovin

CBS : Cystathionine-β-synthase

DAPI : 4',6'-diamidino-2-phénylindole

DIDS : 4,4'-diisothiocyanato-2,2'-stilbenedisulfonic acid disodium salt

dRTA : Distal renal tubular acidosis

ECL : Enhanced Chemiluminescence

EGFP : Enhanced Green Fluorescent Protein

ENA : Excrétion nette d'acide

Endo H : Endoglycosidase H

GFR : Débit de filtration glomérulaire – Glomerular filtration rate

GPI : Glycosylphosphatidylinositol

HEK : Human Embryonic Kidney

HRP : Horseradish Peroxydase

MDCK : Madin-Darby Canine Kidney

Nedd4-2 : Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4-2

PBS : Phosphate Buffer Saline

PGE2 : Prostaglandine E2

PKA : Protéine Kinase A PKC : Protéine Kinase C

pS: PicoSiemens

RT-PCR : Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

SGK1 : Serum and Glucocorticoid induced kinase 1

WT : Wild Type

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Le rein joue un rôle crucial dans de nombreux processus biologiques, dont la régulation de la pression artérielle, du volume extracellulaire ou du pH de l'organisme, en assurant le maintien de la composition du milieu intérieur.

Pour assurer l'homéostasie, le rein filtre chaque jour jusqu'à 180 litres de plasma. Les cellules épithéliales rénales, en réabsorbant ou secrétant de l'eau et des solutés, modifient la composition de cet ultrafiltrat, de façon à excréter dans l'urine une quantité d'eau et de solutés identique à celle ingérée quotidiennement. Dans la mesure où ces apports varient considérablement d'un individu à l'autre, ces processus de réabsorption et de sécrétion sont hautement contrôlés. [Figure 1]

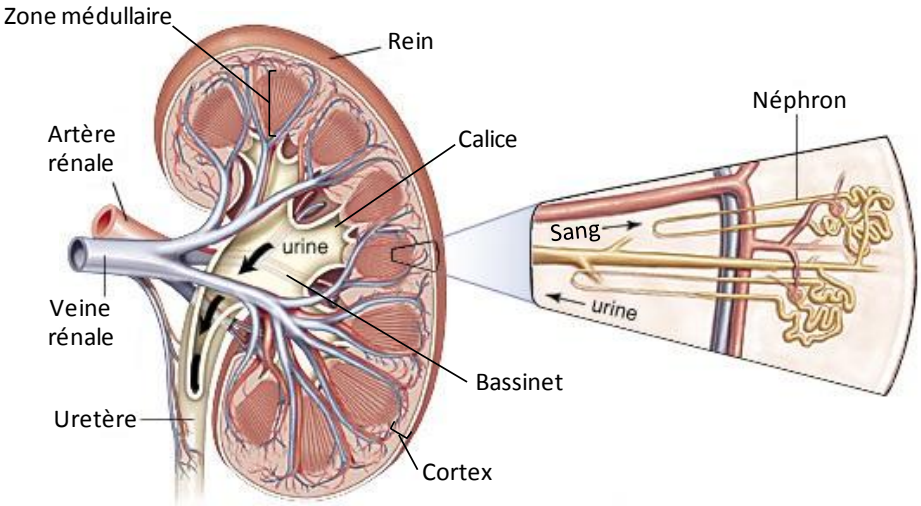


Figure 1: Schéma d'une coupe longitudinale de rein humain et néphron en vue détaillée (d'après Keck M, 2012).

Chez l'homme, chaque rein est composé d'environ 1 million de néphrons, son unité structurale et fonctionnelle. Un néphron est constitué d'un glomérule, dont la fonction est l'ultrafiltration du plasma, et d'un tubule, une structure épithéliale qui assure le transport de l'eau et des solutés. Le tubule rénal est lui-même composé d'une succession de segments morphologiquement différents, qui comprennent un ou plusieurs types cellulaires aux propriétés de transport et régulations spécifiques. [Figure 2]

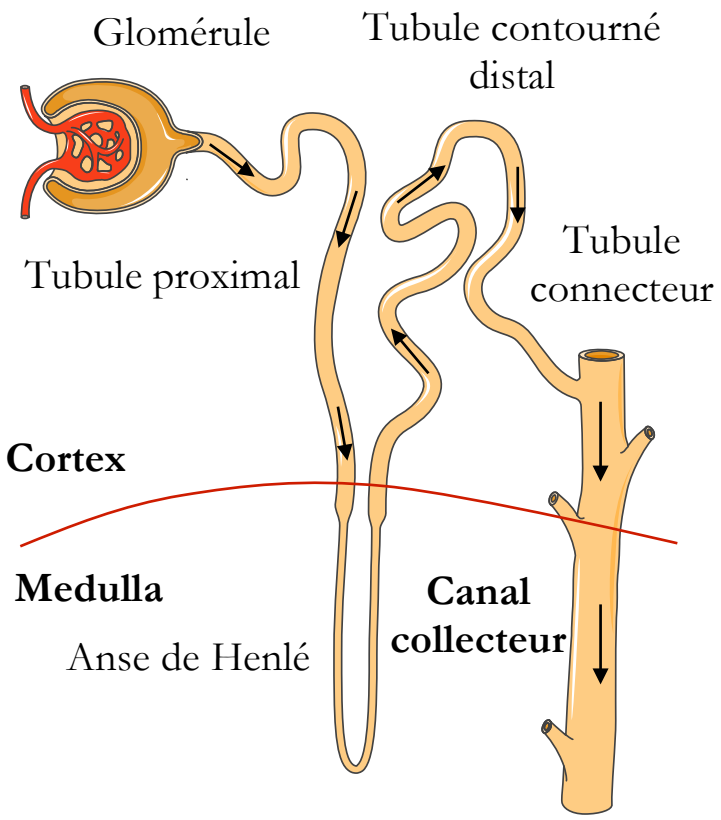


Figure 2: Représentation schématique d'un néphron

Le tubule rénal peut être divisé en 3 zones fonctionnellement différentes : le tubule proximal, l'anse de Henlé et le néphron distal. À la sortie du glomérule, l'urine primitive a une composition proche de celle du plasma (à l'exception d'une concentration en protéines plasmatiques très inferieure à celle du plasma ; 13mg/L contre 65g/L dans le plasma). Le tubule proximal (PT) qui fait directement suite au glomérule assure la réabsorption massive d'eau et de solutés. Ensuite, l'anse de Henlé poursuit la réabsorption de soluté et permet la création et le maintien du gradient cortico-papillaire, nécessaire à la concentration de l'urine finale. Enfin, le néphron distal, qui comprend le tubule contourné distal (DCT), le tubule connecteur (CNT) et le canal collecteur (CD), est soumis à des régulations fines qui permettent d'ajuster la composition de l'urine finale en accord avec les apports alimentaires.

Au cours de ma thèse, j'ai travaillé sur deux projets relatifs à la physiologie et la physiopathologie du transport de chlore dans le néphron distal. La première étude porte sur la caractérisation fonctionnelle et moléculaire d'un modèle murin dont le gène Slc4a1 codant pour l'échangeur Cl^-/HCO_3^-, AE1, a été modifié pour introduire une mutation ponctuelle (R589H) dans la séquence protéique. Cette mutation est la plus fréquemment retrouvée chez les patients atteints d'acidose tubulaire rénale distale à transmission dominante. Cette étude a donné lieu à une publication en cours de révision chez JASN, et dont je suis signataire en co-premier auteur. La seconde étude traite des mécanismes de régulation du transport de chlore par le canal ClC-Kb et sa sous-unité la Barttin. ClC-Kb est le principal canal chlore du néphron distal, et des mutations de ce canal ou de la Barttin sont responsables du Syndrome de Bartter de type III ou de type IV. Cette étude fera l'objet d'un papier dont je serai premier auteur et qui sera soumis dans les mois à venir.

PREMIÈRE ÉTUDE

Caractérisation fonctionnelle et moléculaire d'un modèle murin d'Acidose tubulaire rénale distale par mutation de l'échangeur d'anion AE1 (AE1 R589H)

INTRODUCTION

I. Balance acido-basique et gestion de la charge acide par le rein

1. Maintien de la balance acido-basique par le rein

Le pH du milieu extracellulaire est maintenu dans des limites très étroites (7,40 ± 0,02) par l'action combinée des poumons qui contrôlent la pCO_2 et donc la concentration d'acide carbonique H_2CO_3, et des reins qui contrôlent la concentration plasmatique de HCO_3^- comme l'indique l'équation d'Henderson-Hasselbach :

$$\mathbf{pH = pKa + \log [HCO_3^-] / [H_2CO_3]}$$

Plus fréquemment exprimée :

$$\mathbf{pH = 6.1 + \log [HCO_3^-] / 0{,}03PCO_2}$$

La production de CO_2 à partir de l'oxydation des glucides, des lipides et de la plupart des acides aminés, représente la plus importante des sources d'acide. Un adulte produit ~ 15 000 mmoles de CO_2 par jour, cependant en situation normale, le CO_2 produit par le métabolisme oxydatif est éliminé par la ventilation pulmonaire, empêchant alors une importante charge d'acides volatiles. Le métabolisme (catabolisme des protéines), produit aussi des acides non-volatiles tels que l'acide sulfurique, l'acide phosphorique et plusieurs autres acides organiques qui ne peuvent pas être éliminés par la respiration. Par exemple, un individu de 70kg, a une production endogène nette d'acide (H^+) d'environ 70mmol/jour soit 1mmol/kg/jour. L'excrétion de cette charge d'acides non-volatiles est assurée par le rein. [Figure 3]

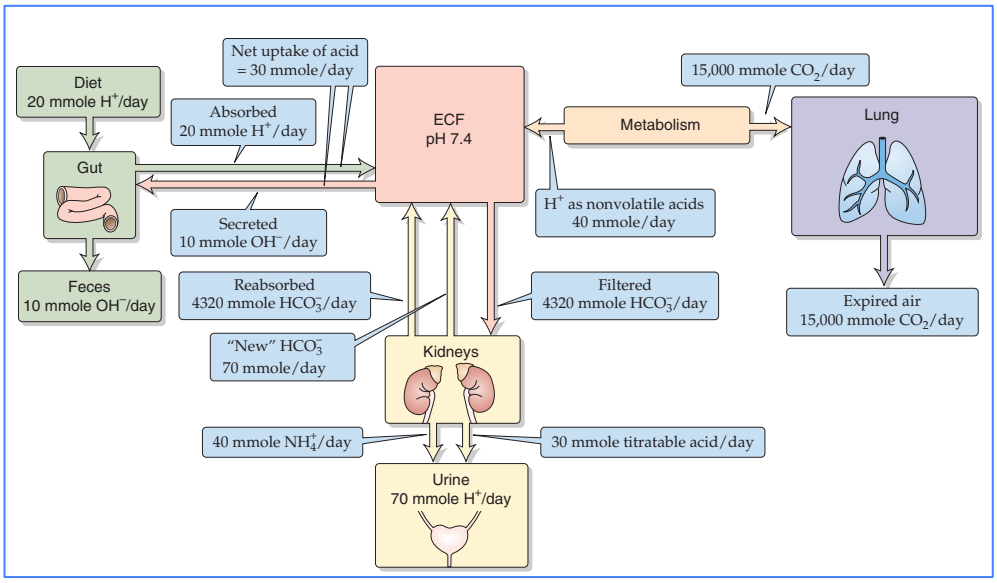


Figure 3: Schéma de la balance Acide-Base.
Toutes les valeurs sont des approximations pour une personne de 70kg sous un régime alimentaire occidental classique. ECF : Fluide extracellulaire
(D'après Medical physiology, Boron and Boulpaep)

2. Excrétion nette d'acide

Une des fonctions majeures du rein, en terme de balance acide-base, est de pouvoir acidifier l'urine en excrétant les acides non-volatiles produits par le métabolisme (environ 70mmoles/jour). La majorité des protons (H^+) sont excrétés sous forme de tampons dans l'urine, c'est à dire associés à une base. En effet, le pH minimal de l'urine étant de 4,4, la quantité d'ions H^+ excrétés sous forme libre est négligeable. Les principales formes d'excrétion des protons sont l'ion ammonium NH_4^+ et l'acidité titrable qui comprend principalement le système tampon phosphate $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$, la créatinine et l'urate.

L'excrétion nette d'acide (ENA) par le rein, est définie par :

$$\mathbf{ENA = U_{NH4}V + U_{AT}V - U_{HCO3}V}$$

où $U_{NH4}V$ représente l'excrétion urinaire de l'ion ammonium, $U_{AT}V$ l'excrétion urinaire d'acidité titrable, et $U_{HCO3}V$ l'excrétion urinaire de l'ion bicarbonate.

L'importance de l'excrétion de NH_4^+, et d'acidité titrable dans l'homéostasie acide-base par le rein a été démontrée chez des sujets en situation basal, et lors de différentes perturbations de l'état acide-base. En situation physiologique, l'excrétion de NH_4^+ représente environ 2/3 de l'excrétion nette d'acide (40-50 mmoles/jour) quand environ 1/3 est due à l'acidité titrable (environ 20 mmoles/jour). Cependant, en cas de charge acide ou en condition d'acidose, l'excrétion de NH_4^+ peut considérablement augmenter, contrairement à l'excrétion d'acidité titrable qui est beaucoup plus limitée (Lemann, Bushinsky, & Hamm, 2003) [Figure 4].

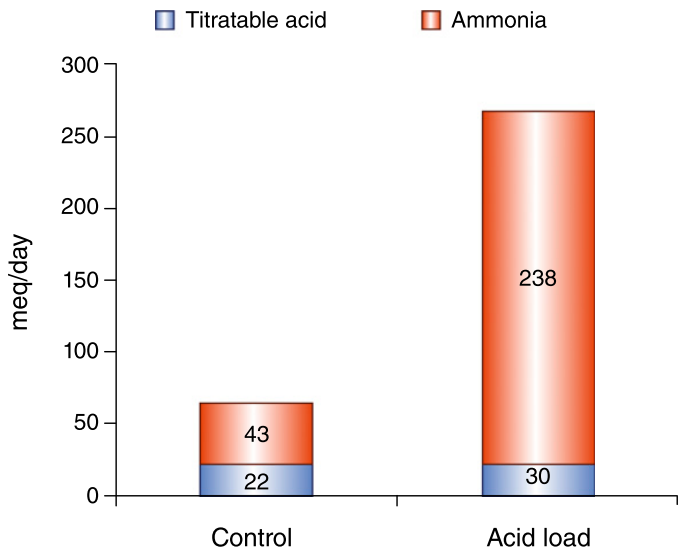


Figure 4: Contribution relative de l'acidité titrable et de l'ammonium dans l'excrétion d'acide chez un adulte sous régime contrôle ou après une charge acide (NH_4Cl)

D'après (Hamm, Nakhoul, & Hering-Smith, 2015)

Afin de maintenir le niveau plasmatique de HCO_3^-, le rein doit réabsorber virtuellement la totalité du HCO_3^- filtré par le glomérule. La réabsorption des HCO_3^- filtrés et l'excrétion de d'acide sont régis par un même processus général : la sécrétion de H^+ dans le fluide tubulaire. Ce processus est réalisé et régulé majoritairement (en terme de quantité) dans deux segments du néphron : le tubule proximal (PT) et le canal collecteur (CD). La régulation du débit de filtration glomérulaire peut également modifier l'ENA, de façon importante, en modulant la quantité de bicarbonates filtrés. Enfin, l'anse de Henlé - en particulier la branche large ascendante (TAL) – contribue aussi, de façon importante, à la régulation de l'état acide-base en modulant la quantité d'ammoniac (NH_3) délivrée au canal collecteur, et en réabsorbant une quantité importante de HCO_3^-.

3. Mécanismes de transport de HCO_3^- et de NH_3/NH_4^+ le long du néphron

En conditions physiologiques, le rein doit assurer deux fonctions afin de maintenir la balance acide-base :

- **La réabsorption des HCO_3^- filtrés** par le glomérule (~ 4320 mmol/j) pour maintenir le contenu de bicarbonate plasmatique présent dans l'organisme. [Figure 5]

- **L'excrétion de la charge acide H^+** quotidienne générée par le métabolisme des protéines (~ 1 mmol/kg/j), majoritairement sous forme de NH_4^+, pour régénérer le HCO_3^- consommé. [Figure 6]

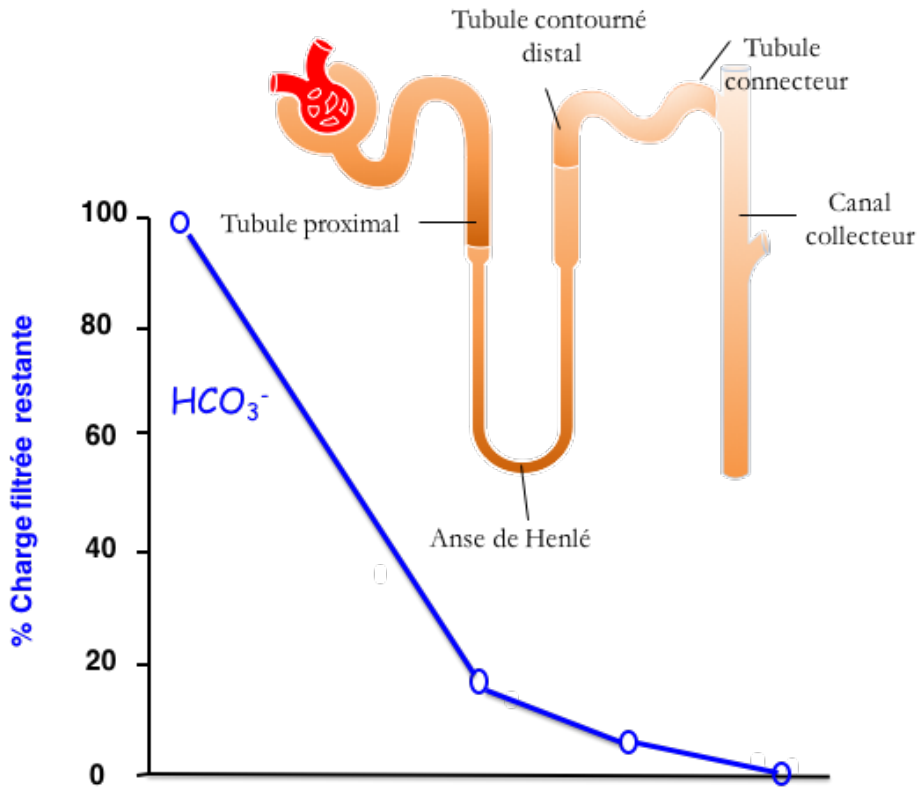


Figure 5: Transport de HCO_3^- le long du néphron.
La majeure partie du HCO_3^- filtré est réabsorbé dans le tubule proximal.
L'excrétion urinaire de HCO_3^- est proche de 0%.
D'après (Hamm et al., 2015)

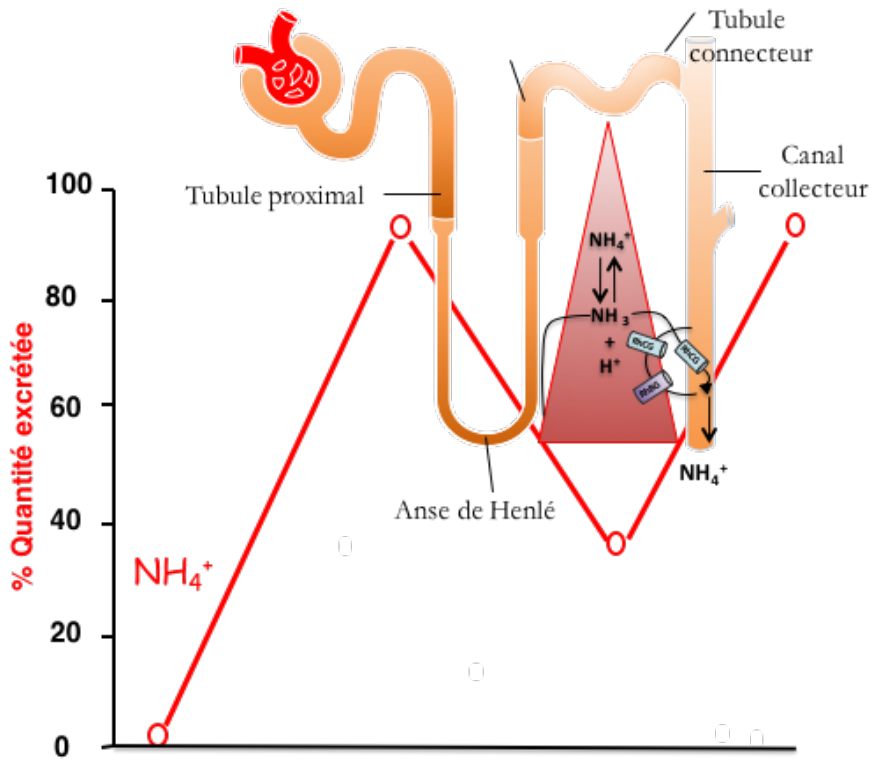


Figure 6: Transport d'ammonium (NH_4^+) le long du néphron.
Dans la TAL, le NH_4^+ est réabsorbé par le cotransporteur NKCC2. Dans le CD, les protéines Rh facilitent le transport d'ammonium (NH_3)/NH_4^+.
D'après (Hamm et al., 2015)

3.1 Le tubule proximal

Le tubule proximal (PT) joue un rôle majeur dans le maintien de l'état acide-base par le rein en réabsorbant ~ 80 % de la charge en HCO_3^- filtrée par le glomérule (Cogan, Maddox, Lucci, & Rector, 1979), et en synthétisant la quasi-totalité du NH_4^+ qui sera excrété dans l'urine terminale. À la sortie du glomérule, l'ultrafiltrat a un pH de 7,25, une pCO_2 de 60mmHg, et une concentration de HCO_3^- de 24mM. La sécrétion de protons par les cellules va donc faire chuter le pH jusqu'à une valeur de ~ 6,8 à la sortie de ce segment tubulaire (DuBose, Pucacco, Lucci, & Carter, 1979).

3.1.1 Mécanismes moléculaires de la réabsorption de HCO_3^- dans le tubule proximal

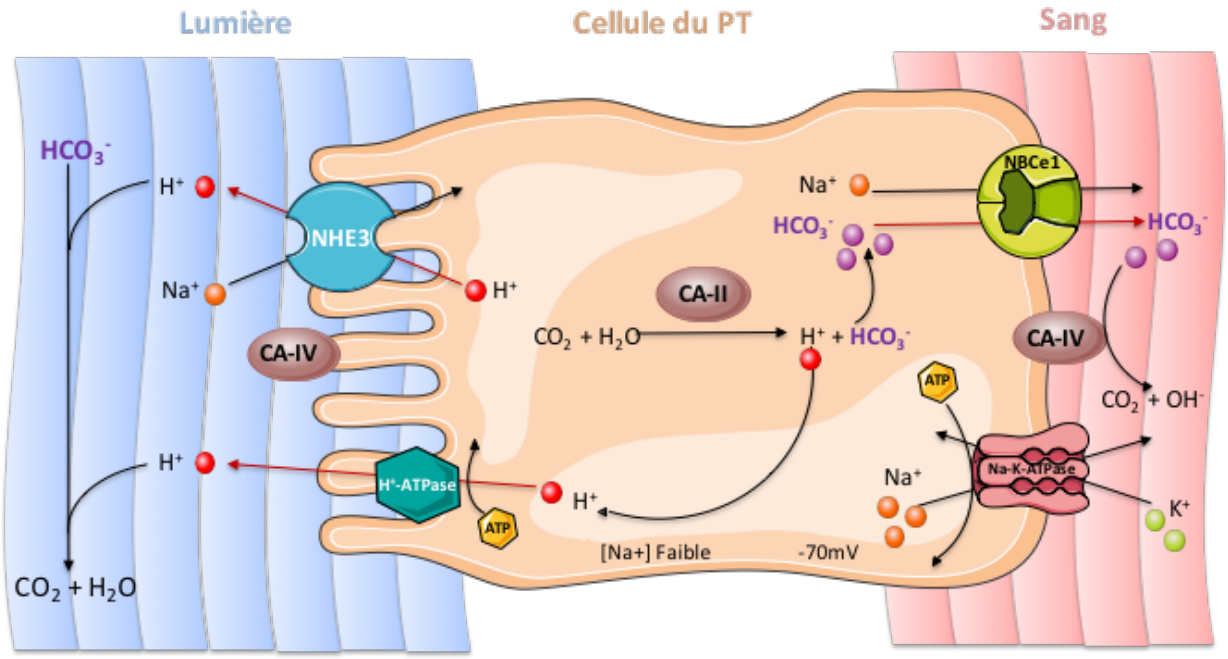


Figure 7: Mécanismes de la réabsorption de HCO3- dans les cellules du PT

À la membrane apicale des cellules du PT, l'activité d'échange Na^+/H^+ représente le principal mécanisme moléculaire responsable de l'acidification du fluide tubulaire. L'échangeur Na^+/H^+, NHE3 (*SLC9A3*), exprimé dans la bordure en brosse des cellules du tubule proximal assure la réabsorption d'environ 80% du HCO_3^- réabsorbé dans le PT (Amemiya et al., 1995; Biemesderfer et al., 1993; Brant, Yun, Donowitz, & Tse, 1995; Schultheis et al., 1998). Cette protéine échange un ion Na^+ pour un ion H^+ ; le gradient de Na^+ - ~ 140mM [Na^+] dans la lumière et ~15-20mM [Na^+] dans la cellule - étant le moteur de cet échange. La faible concentration intracellulaire en Na^+ est maintenue grâce l'activité de la pompe Na-K-ATPase basolatérale [Figure 7]. L'échangeur NHE3 est régulé par les variations de l'état acide-base. En effet, son expression est augmentée en cas de charge acide et diminuée en alcalose (Eladari, Leviel, Pezy, Paillard, & Chambrey, 2002).

Par ailleurs, une pompe à protons électrogénique H^+-ATPase de type vacuolaire (vH^+-ATPase) est responsable du reste de la réabsorption du HCO_3^- luminal [Figure 7]. Cette pompe est régulée par les variations de l'état acide-base (Chambrey, Paillard, & Podevin, 1994). Il est possible que l'échangeur NHE8 puisse être également impliqué dans la réabsorption luminale de HCO_3^-, en condition d'acidose (Baum et al., 2012; Curthoys & Moe, 2014; Li et al., 2013).

Dans la lumière du tubule, Les protons H^+ sécrétés interagissent avec les HCO_3^- filtrés pour former de l'acide carbonique (H_2CO_3). L'acide carbonique est alors déshydraté sous l'action de l'anhydrase carbonique de type IV (CA-IV) pour former du CO_2 et de l'H_2O. La membrane des cellules du PT est très perméable au CO_2 qui peut ainsi diffuser librement à l'intérieur des cellules [Figure 7]. Toutefois, de plus en plus de travaux proposent que certains transporteurs tels que les Glycoprotéines Rh, les Aquaporines et les transporteurs de l'urée pourraient agir comme des « gas channels » et faciliter, de ce fait, le transport du CO_2, et/ou du NH_3 à travers la membrane apicale (Geyer, Parker, Toye, Boron, & Musa-Aziz, 2013; Musa-Aziz, Chen, Pelletier, & Boron, 2009).

Dans la cellule, le CO_2 est hydraté sous l'action de l'anhydrase carbonique cytosolique de type II (CA-II) pour former des protons (H^+) et des bicarbonates (HCO_3^-). Les protons sont alors recyclés vers la lumière via NHE3 et la pompe vH^+-ATPase pendant que les bicarbonates sont extrudés à la face basolatérale des cellules vers le sang. [Figure 7]

À la membrane basolatérale, le cotransporteur électrogénique Na^+-HCO_3^-, NBCe1 (*SLC4A4*), représente la principale voie d'efflux du HCO_3^- dans ces cellules (Burnham et al., 1998; Romero, Fong, Berger, Hediger, & Boron, 1998). NBCe1 est très exprimé à la membrane basolatérale des cellules du PT, puis diminue graduellement dans les segments plus distaux du tubule (Maunsbach et al., 2000; Schmitt, Biemesderfer, Romero, Boulpaep, & Boron, 1999). Des mutations inactivatrices de NBCe1 rendent impossible la réabsorption de bicarbonate par le néphron proximal, et sont donc responsables de certaines formes d'acidose tubulaire rénale proximale (Igarashi et al., 1999). L'existence d'une CA-IV à la membrane basolatérale a été proposée pour faciliter le cotransport Na^+-HCO_3^- en empêchant une alcalinisation de l'interstitium (Seki et al., 1996; Tsuruoka, Swenson, Petrovic, Fujimura, & Schwartz, 2001). [Figure 7]

3.1.2 Mécanismes moléculaires de la sécrétion de NH_3/NH_4^+ par le tubule proximal

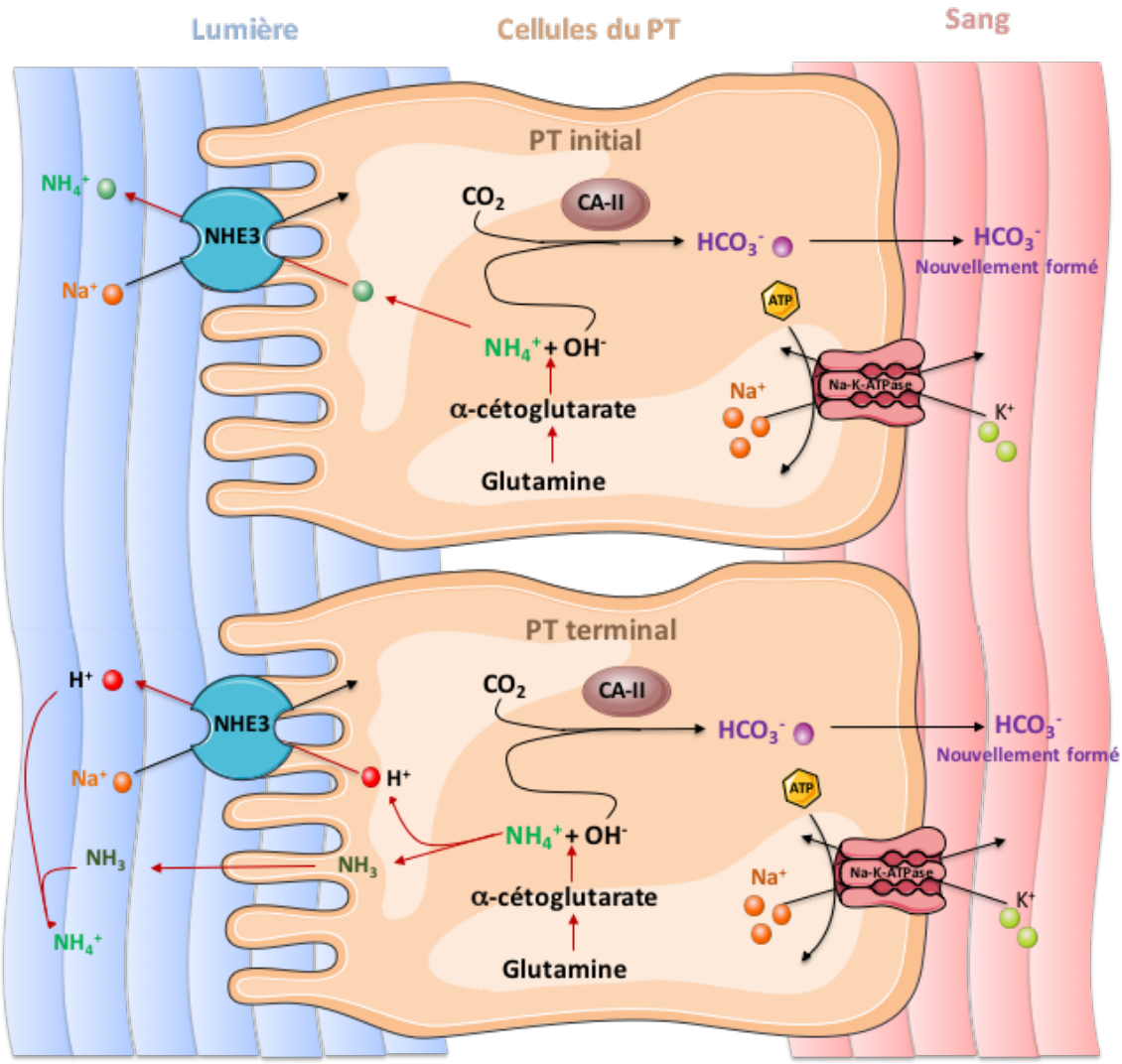


Figure 8: Mécanismes moléculaires impliqués dans la sécrétion d'ammonium NH_4^+ par les cellules du PT

Dans les cellules du PT, l'ammonium NH_4^+ est synthétisé à partir de la conversion de la glutamine en α-cétoglutarate qui génère deux ions NH_4^+, pouvant à leur tour former deux NH_3 et deux ions H^+ (DuBose, Good, Hamm, & Wall, 1991). L'échangeur NHE3, joue un rôle majeur dans la sécrétion de l'ammonium NH_4^+ dans le fluide urinaire [Figure 8]. En effet, dans la partie initiale du PT où le fluide tubulaire a encore un pH encore proche de celui du plasma, l'échangeur NHE3 exporte directement le NH_4^+ vers la lumière en fonctionnant sur le mode d'échange Na^+/NH_4^+. Dans la partie terminale du PT, où le fluide tubulaire a un pH inférieur au pH intracellulaire, la sécrétion de H^+ par NHE3 s'accompagne d'une diffusion de NH_3 qui peut ainsi être trappé dans la lumière du tubule et former du NH_4^+ (Hamm & Simon, 1990; Nagami, 1990). Par ailleurs, le métabolisme de l'α-cétoglutarate produit deux ions OH^- qui seront convertis en ions HCO_3^- par la CA-II. Ces HCO_3^- nouvellement formés sont transportés vers l'interstitium. [Figure 8]

3.2 L'anse de Henlé

L'anse de Henlé joue un rôle central dans la régulation rénale du statut acide-base car 15-20% de la charge filtrée en HCO_3^- est réabsorbé par la branche large ascendante (TAL) ce qui complète la réabsorption qui a eu lieu en amont dans le PT (DuBose & Good, 1991; Good, 1989; Good & Knepper, 1990). Par ailleurs, la TAL réabsorbe la majorité du NH_4^+ sécrété dans le PT, ce qui lui permet de contrôler l'excrétion terminale d'acide qui aura lieu en aval dans le canal collecteur (DuBose et al., 1991).

3.2.1 Rôles de la branche large ascendante dans la réabsorption de HCO_3^-

Comme décrit précédemment, le PT réabsorbe environ 80 % de la charge en HCO_3^- filtrée. Ainsi, la concentration en HCO_3^- dans le fluide tubulaire arrivant au niveau de la branche fine de l'anse de Henlé est très faible (de l'ordre de 5mM), ce qui limite sa réabsorption (Atkins & Burg, 1987). Cependant, la branche fine est le siège d'une intense réabsorption d'eau qui entraine une augmentation de la concentration de HCO_3^-, jusqu'à des valeurs de 20-25mM, lors du trajet du fluide tubulaire dans la branche fine.

La réabsorption de HCO_3^- a lieu principalement dans la partie médullaire de la branche large ascendante (mTAL). En effet, la faible concentration en HCO_3^- (~ 5 mM) dans le fluide tubulaire de la portion corticale de la TAL (cTAL), à l'état basal, représente sans doute un facteur limitant la réabsorption dans cette portion.
La réabsorption de HCO_3^- dans la mTAL s'adapte au statut acide-base ; elle est stimulée en condition d'acidose métabolique, et inhibée en alcalose (Capasso et al., 1994; Good, 1990a). Cela permet le maintien d'une charge fixe en HCO_3^- délivrée aux segments en aval soit le tube contourné distal (DCT), le tubule connecteur (CNT) et le canal collecteur (CD).

3.2.2 Mécanismes moléculaires de la réabsorption de HCO_3^- dans la branche large ascendante

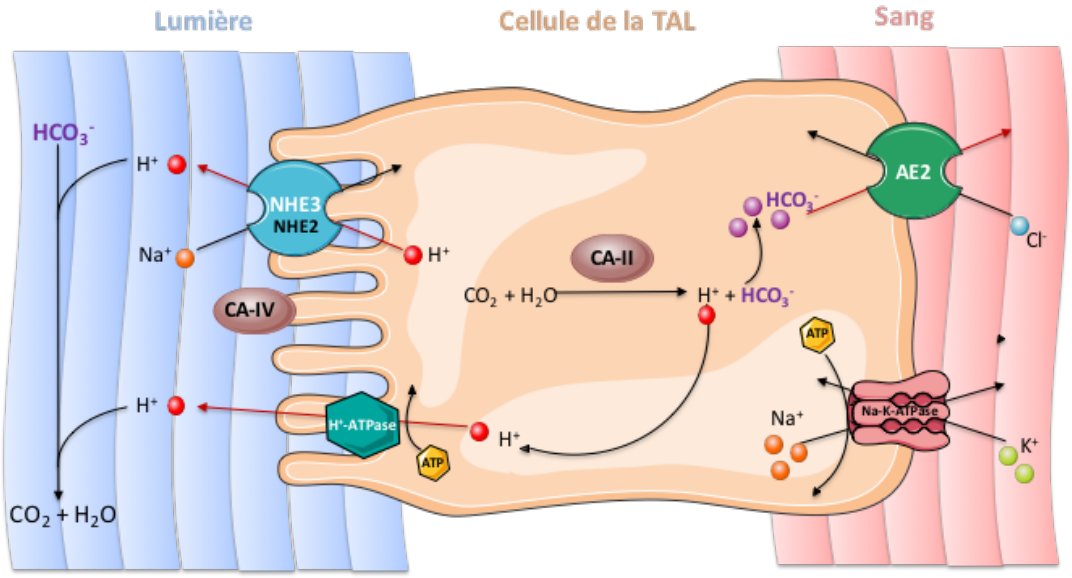


Figure 9: Mécanismes de réabsorption de HCO_3^- dans les cellules de la TAL

Dans la branche large ascendante (TAL), un ensemble de transporteurs identiques à ceux présents dans le tubule proximal sont responsables de la réabsorption de HCO_3^-. De manière similaire aux mécanismes observés dans le PT, la réabsorption de HCO_3^- dans la TAL est réalisée grâce à l'action de la CA-II cytosolique qui catalyse la dissociation de l'acide carbonique, H_2CO_3, en H^+ et HCO_3^-.

À la face apicale, les protons sont sécrétés presque exclusivement par l'échangeur Na^+/H^+, NHE3 (Hood & Tannen, 1998). NHE2 est aussi exprimé à la membrane apicale des cellules de la TAL, et pourrait contribuer à la régulation fine de la réabsorption de HCO_3^- dans cette région (Amemiya et al., 1995; Attmane-Elakeb et al., 1996; Chambrey et al., 1998; A. M. Sun et al., 1997). Comme dans le PT, une pompe vH^+-ATPase est exprimée à la face apicale des cellules et est régulée par les variations du statut acide-base. Cependant, son rôle reste à définir car plusieurs études de microperfusion *in vitro* montrent que le transport de HCO_3^- dépend du Na^+ luminal (Ait-Mohamed, Marsy, Barlet, Khadouri, & Doucet, 1986; Brown, Hirsch, & Gluck, 1988b; Froissart et al., 1992).

L'acidification du fluide tubulaire permet la titration d'un ion HCO_3^- pour donner de l'acide carbonique H_2CO_3, puis du CO_2, sous l'action de la CA-IV membranaire. Le CO_2 va alors pouvoir diffuser vers l'intérieur de la cellule et être réhydraté sous l'action de la CA-II, pour redonner un H^+ qui sera recyclé à la face apicale, et un ion HCO_3^- qui va être expulsé à la face basolatérale.

À la membrane basolatérale, l'échangeur Cl^--HCO_3^- sensible au DIDS, AE2, est très probablement responsable de la réabsorption de HCO_3^- (Eladari et al., 1998; Leviel et al., 1999). La délétion constitutive d'AE2 chez la souris étant létale, il n'y a pas encore de données suffisantes concernant l'effet de la délétion d'AE2 sur l'état acide-base (Gawenis et al., 2004). Un modèle murin invalidé spécifiquement pour AE2 dans la TAL pourrait apporter des informations intéressantes à propos du rôle spécifique d'AE2 dans la balance du bicarbonate.

3.2.3 Rôles de la branche large ascendante dans l'excrétion rénale de NH_4^+

La TAL joue un rôle majeur dans l'excrétion finale d'acide sous forme de NH_4^+. En effet, la quasi-totalité du NH_4^+ ne va pas simplement cheminer dans le fluide tubulaire depuis le PT jusqu'à l'urine, mais sera réabsorbé de façon active par la TAL (Buerkert, Martin, & Trigg, 1982) . Cette réabsorption de NH_4^+ par la TAL, couplée aux mécanismes de concentration à contre courant du néphron, va permettre l'accumulation d'un gradient cortico-papillaire de NH_3/NH_4^+. Ainsi en régulant ce gradient de NH_3/NH_4^+, la TAL peut adapter la sécrétion passive et la disponibilité du NH_3 dans l'urine terminale, et réguler ainsi l'excrétion nette d'acide.

3.2.4 Mécanismes de la réabsorption de NH_4^+ dans la branche large ascendante

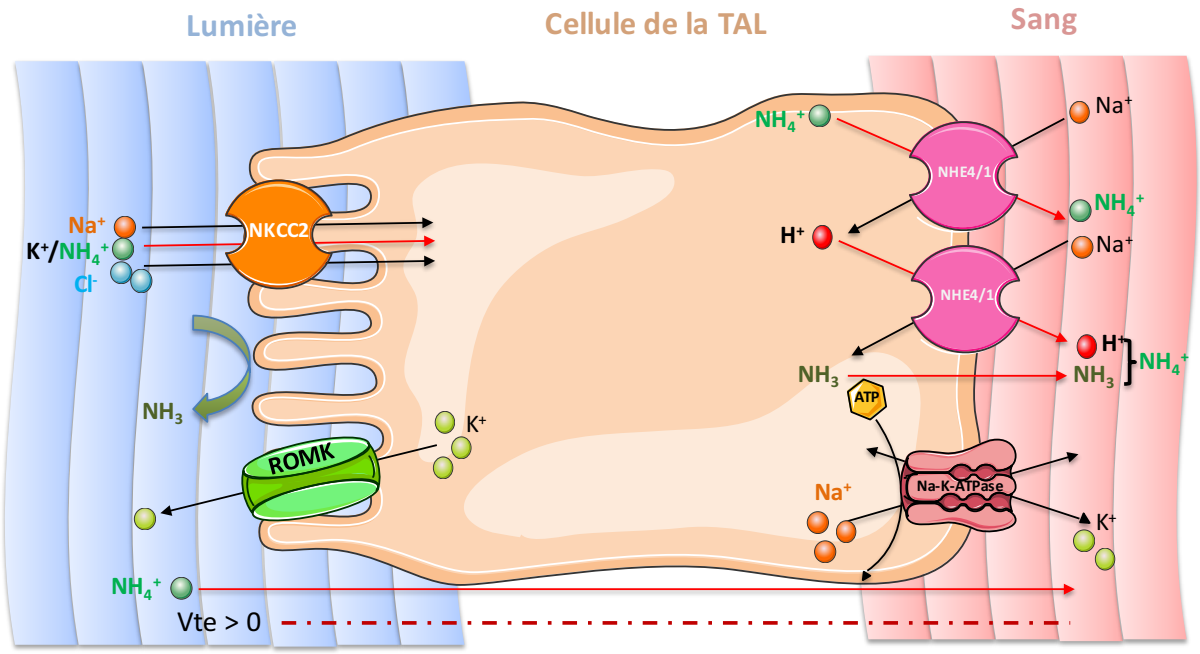


Figure 10: Mécanismes de la sécrétion d'ammonium NH_4^+ par les cellules de la TAL

La réabsorption d'ammonium sous sa forme ionique NH_4^+ ou non-ionique NH_3, dépend de la perméabilité relative de l'épithélium au NH_3 et NH_4^+, ainsi que de leurs gradients de concentrations transépithéliaux respectifs. En raison de la réabsorption d'eau dans la branche fine descendante, et de l'augmentation de concentration en HCO_3^- qui en résulte, le fluide à la pointe de l'anse a un pH plus alcalin qu'à la fin du PT ; ce qui favorise, en théorie, la réabsorption passive de NH_3 (Buerkert, Martin, & Trigg, 1983; DuBose et al., 1983). Cependant, la membrane apicale de la TAL est virtuellement imperméable au NH_3 contrairement à la plupart des autres membranes cellulaires. Le NH_4^+ est donc réabsorbé par le cotransporteur $Na^+/K^+/2Cl^-$, NKCC2, où il se substitue au K^+ sur son site de transport (Garvin, Burg, & Knepper, 1988; Good, 1988a, 1988b). Environ 65% du NH_4^+ est transporté via ce mécanisme et les 35% restants sont réabsorbés par la voie paracellulaire passive, en raison du voltage transépithélial positif vers la lumière, engendré par la réabsorption électrogénique de NaCl par NKCC2. La mTAL est ainsi capable de générer et de maintenir le gradient chimique important de NH_3/NH_4^+, nécessaire au processus d'acidification du fluide tubulaire du canal collecteur et de l'urine. [Figure 10]

Au pôle basolatéral des cellules, les échangeurs Na^+/H^+ membranaires, NHE1 et NHE4, pourraient être responsables de l'efflux de NH_4^+ (Blanchard et al., 1998; Bourgeois et al., 2010; Chambrey et al., 2001). L'ammonium peut également quitter la cellule sous forme de NH_3, ce qui conduit à une accumulation de NH_4^+ dans l'interstitium. [Figure 10]

3.3 Le néphron distal (Tubule contourné distal, tubule connecteur et canal collecteur)

La régulation du transport acide-base dans le néphron distal, et notamment dans le canal collecteur, est crucial car c'est le site final de contrôle de la composition de l'urine. Le rôle de ce segment est de sécréter les protons H^+ dans lumière tubulaire pour titrer le NH_3, formant ainsi du NH_4^+ et l'acidité titrable, qui seront excrétés dans l'urine, assurant ainsi l'élimination de la charge quotidienne des acides non-volatiles. Compte tenu de la réabsorption dans le PT et la TAL, le fluide tubulaire délivré au néphron distal a une concentration en HCO_3^- très faible - de l'ordre de 5 à 7mM, et un pH acide (6,5 à 6,7) (DuBose et al., 1979).

Le néphron distal est une partie hétérogène qui comprend trois segments de néphron distincts (Kriz & Bankir, 1988). Il débute par le tubule contourné distal (DCT), un segment formé d'un type cellulaire homogène, caractérisé par l'expression apicale du cotransporteur Na^+-Cl^- sensible aux diurétiques thiazidiques, NCC. Il est suivi du tubule connecteur (CNT) qui relie le tubule contourné distal au canal collecteur (CD). Ces deux derniers segments, le CNT et le CD, ont une composition cellulaire hétérogène. On distingue deux types de cellules morphologiquement différentes : les cellules principales (PCs) et les cellules intercalaires (ICs). On peut classer ces cellules intercalaires en 3 sous-types selon les transporteurs exprimés : les cellules α-intercalaires, (α-ICs), les cellules β- intercalaires (β-ICs), et les cellules intercalaires non-α non-β (non-α non-β ICs). Ces cellules, et notamment les cellules α-intercalaires, jouent un rôle primordial dans la régulation de l'état acide-base.

3.3.1 Mécanismes moléculaires d'acidification de l'urine dans le néphron distal

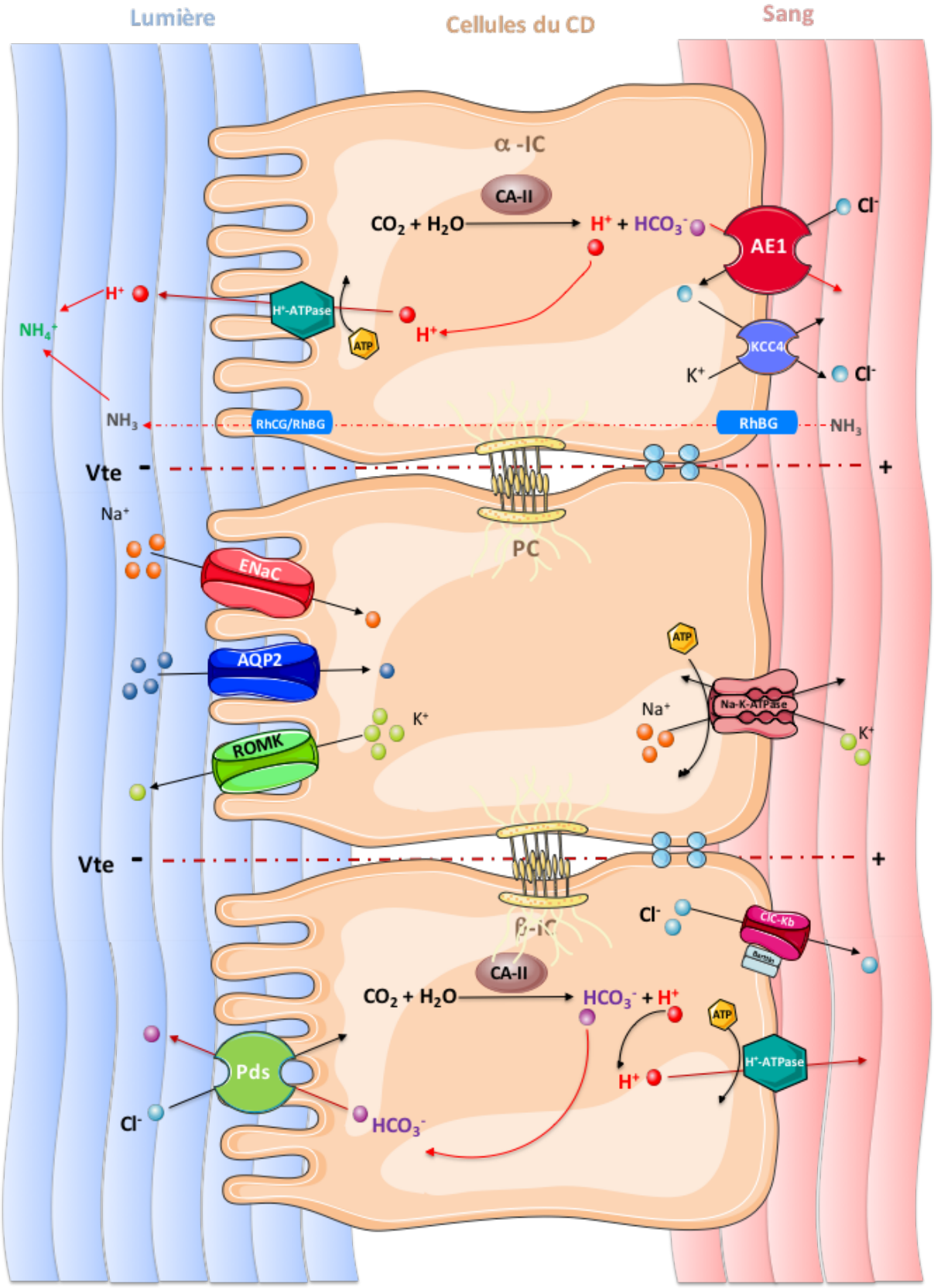


Figure 11: Mécanismes moléculaires d'acidification dans le CD

a) Les cellules α-intercalaires

Les cellules α-intercalaires sont responsables de la sécrétion de H^+ dans l'urine. Elles sont présentes dans le DCT tardif, le CNT, le canal collecteur cortical (CCD), la partie externe médullaire du CD (OMCD) et dans la partie interne médullaire du CD (IMCD)C'est le type de cellules intercalaires le plus abondant dans la zone externe de la médullaire externe du CD (OSOM) chez la plupart des mammifères (Madsen, Verlander, & Tisher, 1988).

Dans la cellule, la CA-II cytosolique catalyse l'hydratation du CO_2 métabolique pour donner des H^+ et des HCO_3^-.

À la face apicale, les protons H^+ sont sécrétés par la pompe à protons vacuolaire, vH^+-ATPase, pour atteindre un pH urinaire minimal d'environ 4,5. Les vH^+-ATPases sont composées de plusieurs sous-unités regroupées en deux domaines : un domaine V0 transmembranaire et un domaine V1 cytosolique. Le domaine V1 cytosolique catalyse l'hydrolyse de l'ATP, tandis que le domaine V0 transmembranaire transporte les protons. Le domaine V1 est composé de huit sous-unités (A-H), et le domaine V0 en comporte six (a, c, c, d, e et Ac45). Les vH^+-ATPases sont exprimées à la membrane plasmique de divers types cellulaires tels que les cellules intercalaires du canal collecteur, les ostéoclastes ou les macrophages. Les vH^+-ATPases sont majoritairement régulées par recyclage entre les vésicules sous-apicales et la membrane plasmique (Breton & Brown, 2013).

En réponse à une acidose, le néphron distal réagit en augmentant la sécrétion H^+ et la production de nouveaux HCO_3^-. Comme dans le tubule proximal, des changements du pH intracellulaire et de la P_{CO2} plasmatique affectent la sécrétion de protons dans le canal collecteur. L'augmentation de la sécrétion de protons est alors majoritairement assurée par l'insertion de pompes vH^+-ATPase additionnelles, par fusion des vésicules sous-apicales avec la membrane plasmique.

Ces processus sont médiés par divers signaux de transduction (cAMP, cGMP, PLC/PKC) (Brown, Hirsch, & Gluck, 1988a; Spicer, Stoward, & Tashian, 1979). La pompe vH^+-ATPase peut être activée à court terme par phosphorylation, par des kinases telles que la protéine kinase A (PKA), ou encore peut être inhibée par la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK) (Alzamora et al., 2010; F. Gong et al., 2010).

De plus, l'activation de la vH^+-ATPase par la PKA est dépendante de l'activation de l'adénylase cyclase soluble (sAC), un senseur du bicarbonate intracellulaire dans les α-ICs. Ainsi, cette cascade permet de lier les changements physiologiques de la concentration plasmatique de $[HCO_3^-]$ et/ou de la concentration intracellulaire de $[HCO_3^-]$ à l'activation rapide de la pompe à protons.

Les α-ICs possèdent également une pompe H^+-K^+-ATPase apicale qui pourrait participer à l'acidification urinaire mais dont le rôle dans la réponse à l'acidose est encore débattu. Cette pompe aurait plutôt un rôle dans la balance du potassium et interviendrait probablement davantage en cas de déplétion potassique (Greenlee, Lynch, Gumz, Cain, & Wingo, 2010).

Les protons sécrétés dans la lumière vont titrer le NH_3 et seront alors excrétés dans l'urine majoritairement sous forme de NH_4^+. Le NH_3/NH_4^+ de l'interstitium est sécrété dans la lumière par plusieurs mécanismes. Le NH_3 peut diffuser à travers les membranes basolatérale et apicale jusqu'à la lumière. De plus, les protéines Rh, notamment RhBG et RhCG, fonctionnent comme des transporteurs de NH_3/NH_4^+, en facilitant notamment la diffusion du NH_3 et le transport transépithélial du NH_4^+ (au moins pour RhBG). RhBG est présent à la membrane basolatérale des α-ICs et peut transporter le NH_3 et NH_4^+ dans la cellule, tandis que RhCG est présent à la membrane apicale de plusieurs types cellulaires et peut transporter le NH_3 dans la lumière.

À la face basolatérale de la cellule, le HCO_3^- est transporté vers l'interstitium par l'isoforme rénale de l'échangeur Cl^--HCO_3^- AE1 (kAE1). Deux autres transporteurs SLC26a7 (un échangeur Cl^--HCO_3^-) et KCC4 (un cotransporteur K^+- Cl^-) sont aussi exprimés à la membrane basolatérale des α-ICs du CD. SLC26a7 contribue à la réabsorption du HCO_3^- et KCC4 joue un rôle important dans le recyclage du Cl^-, essentiel à l'activité d'échange de AE1 (Boettger et al., 2002; X. Sun & Petrovic, 2008).

b) Les cellules β-intercalaires

Les cellules β-intercalaires présentent une polarité opposée à celle des cellules α-intercalaires. En effet, à la face apicale elles expriment l'échangeur Cl^--HCO_3^-, Pendrine (Royaux et al., 2001), et la pompe vH^+-ATPase à la face basolatérale. Elles sont présentes uniquement dans la région corticale, dans le CNT et le CCD. Leur rôle dans la réabsorption de NaCl sera détaillé dans la seconde partie de ce document.

4. L'adaptation rénale à une charge acide

Afin de de maintenir le pH constant, l'organisme possède 3 lignes de défense pour faire face à une charge acide :

- Les systèmes tampons (action instantanée),
- La ventilation pulmonaire (action rapide en quelques minutes)
- La régulation rénale (action lente en quelques heures à quelques jours)

Une charge d'acides non-volatiles qui surpasse la capacité d'excrétion des reins conduit à une acidose métabolique. Autrement, une perte de bases (HCO_3^-), dans le cas d'une diarrhée sévère par exemple, équivaut à une addition d'acides. Cette baisse de la concentration plasmatique en HCO_3^- peut également conduire au développement d'une acidose métabolique. En réponse à l'acidose métabolique, le rein augmente la réabsorption de HCO_3^- dans le tubule proximal afin de maintenir la concentration plasmatique de HCO_3^- et, l'excrétion nette d'acide dans le canal collecteur. L'ammonium NH_4^+ est la forme adaptable de l'excrétion de H^+. En effet, en condition d'acidose, l'excrétion de NH_4^+ peut considérablement augmenter, tandis que la modulation de l'excrétion d'acidité titrable est beaucoup plus limitée. La compensation rénale maximale à l'acidose métabolique prend 3 à 5 jours à se mettre en place. [Figure 12]

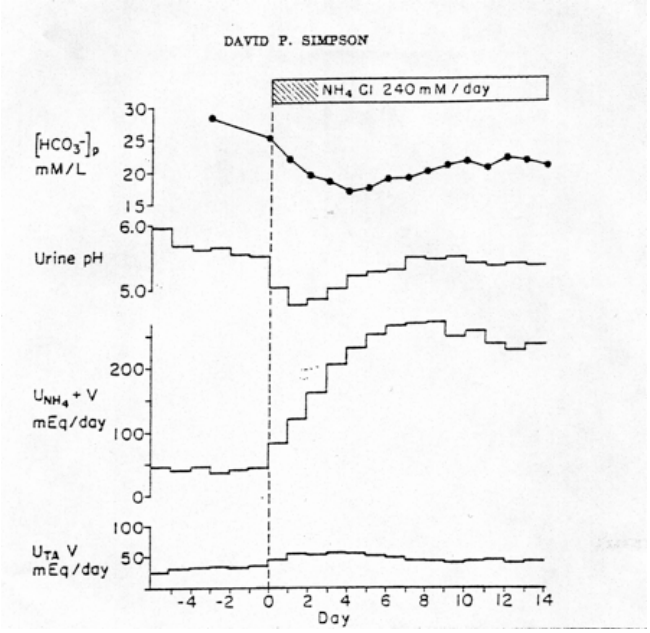


Figure 12: Adaptation rénale à l'acidose métabolique

L'altération des mécanismes d'acidification de l'urine ou de la réabsorption des bicarbonates peut conduire au développement d'une acidose tubulaire rénale.

II. Les Acidoses tubulaires rénales

1. Définition

Les acidoses tubulaires rénales (RTA) regroupent un ensemble de tubulopathies qui se caractérise par l'incapacité du rein à excréter la charge acide physiologique quotidienne consécutive à l'altération des mécanismes cellulaires de réabsorption du bicarbonate ou de la sécrétion de protons (Batlle, Ghanekar, Jain, & Mitra, 2001; Batlle & Kurtzman, 1982; Rodriguez Soriano, 2002). Sur le plan biologique, ce syndrome est caractérisé par une acidose métabolique hyperchlorémique, un pH urinaire élevé et une excrétion d'ammonium et d'acidité titrable inappropriées à l'état d'acidose (insuffisantes) (McSherry, Sebastian, & Morris, 1972). La morbidité liée aux RTA est majoritairement imputable aux conséquences systémiques de l'acidose métabolique, dont, notamment, le retard de croissance, les défauts osseux ou les calculs rénaux (McSherry et al., 1972).

Le diagnostic de RTA complète est fait chez un patient présentant une acidose métabolique malgré une acidification maximale de l'urine – en dessous d'une valeur-seuil de pH 5,5. Une RTA incomplète est définie chez un patient sans acidose spontanée qui, en réponse à un test de charge acide par un apport oral de chlorure d'ammonium (NH_4Cl), ou à un test au furosémide, est incapable d'adapter son excrétion nette d'acide. Le traitement de base de la RTA consiste en une supplémentation orale en alcalin.

Les études cliniques et fonctionnelles permettent de classer les RTA en quatre types, numérotés selon leur ordre de découverte : l'acidose tubulaire distale (Type 1), l'acidose tubulaire proximale (Type 2), l'acidose tubulaire mixte proximale et distale (Type 3) et l'acidose tubulaire hyperkaliémique (Type 4) (Bagga & Sinha, 2007; McSherry et al., 1972). L'acidose tubulaire distale sera abordée plus en détail dans le chapitre III.

1.1 L'acidose tubulaire proximale (Type 2)

L'acidose tubulaire proximale (pRTA) est due à une diminution de la capacité de réabsorption du bicarbonate filtré par les cellules du tubule proximal. Chez les patients, l'acidose est généralement modérée et la concentration plasmatique de [HCO_3^-] se situe autour de 15mM, car seule la capacité maximale de réabsorption des bicarbonates est diminuée, abaissant de ce fait la concentration plasmatique seuil de [HCO_3^-]. Les cellules intercalaires du néphron distal fonctionnant toujours, la sécrétion des protons n'est pas affectée.

Le plus souvent, la pRTA est diagnostiquée dans le cadre d'une atteinte générale du tubule proximal appelée Syndrome de Fanconi. Ce syndrome est à l'origine de glucosurie normoglycémique, d'hypokaliémie, d'hypophosphatémie, d'aminoacidurie, d'un désordre électrolytique avec une déshydratation, et enfin d'un retard de croissance. Le Syndrome de Fanconi peut survenir dans des pathologies comme le myélome multiple, le syndrome de Sjögren, ou les empoisonnements aux métaux lourds (Alper, 2010).

Plus rarement, la pRTA peut se présenter de façon isolée sans autre atteinte tubulaire proximale et est causée par des mutations perte de fonction du cotransporteur Na^+-HCO_3^-, NBCe1, exprimé à la membrane basolatérale des cellules du PT (Igarashi et al., 1999; Magen, Adler, Mandel, Efrati, & Zelikovic, 2004). En accord avec les observations cliniques chez l'homme, les souris transgéniques avec une fonction altérée de NBCe1 présentent également une pRTA. Jusqu'à présent, deux modèles murins transgéniques ont été générés. Le premier modèle est un KO constitutif de NBCe1 (Gawenis et al., 2007), et le second est un modèle de souris KI portant la mutation W516X, qui correspond à une mutation retrouvée chez des patients atteints de pRTA (Lo et al., 2011). Ces deux modèles ont un phénotype commun qui comprend une acidose sévère avec un pH sanguin d'environ 6,7 et une concentration plasmatique de [HCO_3^-] d'environ 5mM. On constate également un retard de croissance et une forte mortalité avant le sevrage.

1.2 L'acidose tubulaire mixte (Type 3)

Les patients souffrant du Syndrome de déficience de l'Anhydrase carbonique II (ou Maladie du cerveau de marbre) présentent une acidose tubulaire mixte (RTA mixte). Cette maladie récessive, causée par la perte de fonction de l'anhydrase carbonique II cytosolique, combine des caractéristiques des acidoses tubulaires proximale et distale. La RTA mixte est également associée à une ostéopétrose, une calcification cérébrale, un retard mental et un retard de croissance (Sly, Hewett-Emmett, Whyte, Yu, & Tashian, 1983).

Un modèle de souris déficient pour la CA-II, *Car2-null*, reproduit partiellement le phénotype humain. En effet, les souris *Car2-null* présentent un retard de croissance et une RTA mixte, comme chez les patients, mais ne souffrent pas d'ostéopétrose ou de calcification cérébrale (Lewis, Erickson, Barnett, Venta, & Tashian, 1988). D'autres études sur ce même modèle ont montré que les souris jeunes montrent un nombre et une distribution normale des cellules intercalaires dans le CD, mais que le nombre de cellules intercalaires diminue progressivement avec l'âge, remplacées par des cellules principales. Ces résultats suggèrent un rôle potentiel de la CA-II dans la régulation de la diversité cellulaire dans le canal collecteur (Breton et al., 1995; Shayakul, Breton, Brown, & Alper, 1999).

1.3 L'acidose tubulaire hyperkaliémique (Type 4)

L'acidose tubulaire hyperkaliémique est généralement une manifestation de l'hypoaldostéronisme - une diminution de la sécrétion d'aldostérone - ou du pseudo-hypoaldostérosnisme - un défaut de sensibilité à l'aldostérone (Karet, 2009) de type 1 (PHA1) ou de type 2 (PHA2). L'acidose dans la RTA de type 4 est multifactorielle et résulte d'une part d'une altération des mécanismes d'ammoniagénèse dans le PT causée par l'hyperkaliémie. D'autre part, le défaut de réabsorption de sodium dans le collecteur causé par l'hypoaldostéronisme (ou le défaut d'action de l'aldostérone), induit une diminution du voltage transépithelial du canal collecteur, ce qui diminue la force électromotrice pour la sécrétion de H^+ par les cellules intercalaires.

2. L'acidose tubulaire distale

2.1 Étiologie

L'acidose tubulaire distale (dRTA) est une pathologie de la cellules α-intercalaire du canal collecteur qui se traduit par une incapacité à sécréter les protons et, de ce fait, à acidifier l'urine jusqu'à un pH inférieur à 5,5. Elle a été étudiée en détails pour la première fois par Fuller Albright dans les années 1940. La dRTA est caractérisée par une acidose métabolique hyperchlorémique. Elle s'accompagne souvent d'un retard de croissance, d'une ostéomalacie, d'une hypokaliémie, de néphrocalcinose et de lithiase urinaire (en raison de l'hypercalciurie et l'hypocitraturie associées), et peut, dans certains cas, être associée à une surdité.

La majorité des acidoses distales sont acquises. Elles peuvent être secondaires au Syndrome de Sjogrën ou plus rarement à d'autres maladies auto-immunes associées à une hypergammaglobulinémie. Les formes héréditaires de dRTA peuvent être causées par des mutations inactivatrices de deux sous-unités de la pompe vH^+-ATPase : la sous unité B1 et la sous-unité a4 ou de l'échangeur Cl^-/HCO_3^- AE1.

Le gène *ATP6V1B1* code pour la sous-unité B1 du domaine V1 de la vH^+-ATPase. Cette sous-unité est exprimée dans les cellules intercalaires rénales, l'épididyme et les cellules ciliées de l'œil et de l'oreille interne. Le gène *ATP6V0A4* code pour la sous-unité a4 du domaine V0 qui est exprimée dans le rein, l'épididyme et l'oreille interne (Batlle & Haque, 2012). Toutes ces mutations sont transmises sur un mode autosomique récessif. Les mutations du gène *ATP6V1B1* causent également une surdité progressive tandis que celles du gène *ATP6V0A4* peuvent entrainer une surdité qui se développe tardivement dans de plus rares cas.

2.2 L'acidose tubulaire distale associée aux mutations d'AE1

Dans les cellules α-intercalaires, les mécanismes d'acidification de l'urine nécessitent la sortie basolatérale des HCO_3^-, combinée à la sécrétion apicale de H^+. Chez l'Homme, l'excrétion des HCO_3^- est médiée par l'isoforme rénale de l'échangeur Cl^--HCO_3^- AE1. Des mutations d'AE1 peuvent donner lieu à des formes autosomiques dominantes ou récessives de dRTA.

2.2.1 AE1, l'échangeur Cl^--HCO_3^- du canal collecteur et des érythrocytes.

a) La famille des SLC4

AE1 (Anion Exchanger 1) fait partie d'une famille de protéines membranaires appelée SLC4 (pour « SoLute Carrier familly 4 »). Cette famille compte 10 membres, numérotés de A1 à A11 (le numéro 6 n'étant pas utilisé), et se distingue par la grande diversité dans le fonctionnement de ses membres, dans leur répartition tissulaire ainsi que dans leur lieu d'expression cellulaire ou subcellulaire. Ces protéines sont réparties en trois sous-familles sur la base de leur homologie de séquence et des ions transportés. La première sous-famille comporte les échangeurs anioniques Cl^--HCO_3^- électroneutres : SLC4A1, SLC4A2 et SLC4A3. La deuxième sous-famille regroupe les transporteurs Na^+-HCO_3^- : SLC4A4 à SLC4A10 ; et enfin, la troisième sous-famille ne compte qu'un membre qui n'entre pas dans les deux sous-familles précédentes: le co-transporteur bore/sodium SLC4A11 (Cordat & Reithmeier, 2014) [Figure 12].

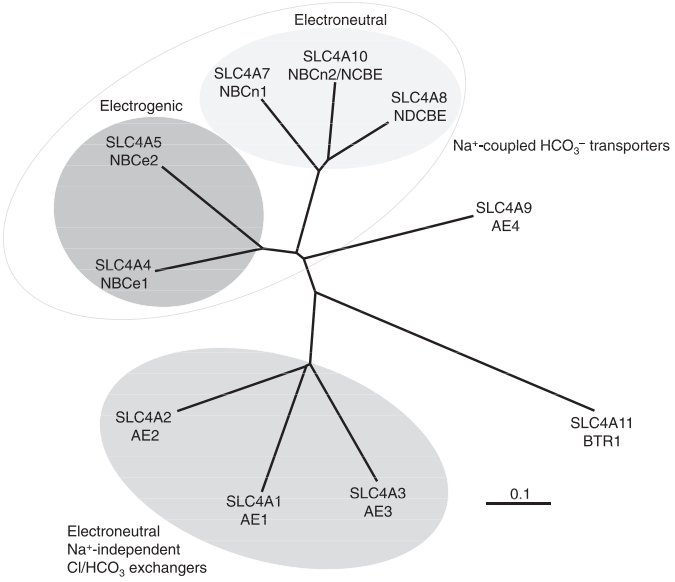


Figure 13: Arbre phylogénique des SLC4. (D'après Romero et al., 2004)

b) AE1 : Découverte et structure

Le gène *SLC4A1* code pour l'échangeur AE1. Historiquement, c'est la première protéine de cette famille à avoir été clonée et étudiée ; elle a également servi de modèle pour décrire les autres membres des SLC4. La protéine AE1 a été mise en évidence beaucoup plus tôt que les autres SLC4 grâce à son abondance dans les érythrocytes. En effet, un érythrocyte humain peut compter jusqu'à 1 million de copies d'AE1 dans sa membrane plasmique ce qui représente environ 30% des protéines détectables à la membrane cellulaire. AE1 est également appelée « bande 3 » en référence à sa position dans un gel SDS-page fait à partir d'une préparation de membrane d'érythrocytes humains.

Il existe deux isoformes d'AE1 : eAE1, exprimée dans les érythrocytes, et kAE1, exprimée dans les cellules α-intercalaires du canal collecteur. L'isoforme kAE1 est transcrite à partir d'un promoteur alternatif, et est tronquée de 65 acides aminés à l'extrémité N-terminale. La protéine AE1 est constituée de deux gros domaines structuraux représentant chacun à peu près 50% de la protéine : un domaine N-terminale cytosolique et un domaine transmembranaire avec une petite extrémité C-terminale cytosolique.
Les deux domaines d'AE1 fonctionnent de manière indépendante. La partie transmembranaire est responsable de l'activité de transport, tandis que la partie intracellulaire est responsable de l'interaction avec l'ensemble des partenaires cellulaires.

La partie C-terminale d'AE1 interagit physiquement avec l'anhydrase carbonique de type II (CA-II) via un motif acide $_{886}$LDADD$_{890}$ pourrait former un métabolon, c'est-à-dire un complexe d'enzymes impliquées dans la même voie métabolique, et qui permet aux molécules de passer facilement d'un site actif à un autre (Vince, Carlsson, & Reithmeier, 2000; Vince & Reithmeier, 2000). Cette interaction permettrait de potentialiser l'action d'AE1 en augmentant la concentration de HCO_3^- au niveau de son site de transport (Sowah & Casey, 2011).
De plus, il a récemment été montré que, dans le rein humain, la partie C-terminale pouvait interagir avec la sous-unité β1 de la pompe Na-K-ATPase. Cette interaction serait nécessaire à l'expression et au maintien de kAE1 à la membrane basolatérale des α-ICs (Su et al., 2015).

2.2.2 Les mutations pathogènes d'AE1 responsables de dRTA

Les mutations d'AE1 responsables d'acidose tubulaire distale ont initialement été décrites par Bruce et al (Bruce et al., 1997), puis par l'équipe de Fiona Karet (Karet et al., 1998). Par ailleurs, certaines mutations d'AE1 sont responsables d'anémies hémolytiques telles que la sphérocytose héréditaire, mais sans acidose tubulaire distale. De plus, dans de très rares cas la plupart localisés en Asie du sud-est, les patients portent des mutations récessives d'AE1 responsables d'Ovalocytose asiatique du sud-est (SAO), qui causent à la fois une dRTA et une anémie hémolytique (Batlle & Haque, 2012).

Une vingtaine de mutations pathogènes d'AE1 responsables de dRTA ont été décrites à ce jour [Tableau 3]. Elles peuvent donner lieu à des acidoses distales à transmission autosomique dominante (AD) ou autosomique récessive (AR). La mutation d'AE1 R589H à été la première mutation décrite, et est la plus communément retrouvée chez les patients (Bruce et al., 1997; Karet et al., 1998). [Tableau 3]

Tableau 1: Mutations de AE1/SLC4A1 associées à la dRTA		
Mutation		**Transmission**
E90X	Hétérozygote composé	Récessive
Δ400-408 (SAO)	Hétérozygote composé	Récessive
C479W (Edmonton)	Hétérozygote composé	Récessive
V488M(Coimbra)	Homozygote	Récessive
E522K (Kaohsiung)	Hétérozygote composé	Récessive
R589H	Hétérozygote	Dominant
R589C	Hétérozygote	Dominant
R589S	Hétérozygote	Dominant
R602H	Hétérozygote composé	Récessive
G609R	Hétérozygote	Dominant
S667P (Courcouronnes)	Hétérozygote composé	Récessive
S613F	Hétérozygote	Dominant
G701D (Bangkok I)	Homozygote, Het composé	Récessive
Q759H(Unimas)	Hétérozygote composé	Récessive
S773P	Hétérozygote composé	Récessive
ΔV850	Homozygote, Het composé	Récessive
A858D	Hétérozygote, Het composé	Dominant
	Homozygote	Co-dominant
A888L/889X	Hétérozygote	Dominant
R901X (Walton)	Hétérozygote	Dominant
M909T	Hétérozygote	Dominant
dRTA : acidose tubulaire rénale distale		

Des études *in vitro* - notamment dans la lignée cellulaire rénale MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) - ont permis de proposer plusieurs mécanismes pour expliquer la pathogénicité des mutations dominantes d'AE1. Le premier mécanisme correspondrait à un effet dominant négatif des protéines kAE1 mutantes qui sont séquestrées dans le réticulum endoplasmiques (RE) ou l'appareil de Golgi. Ainsi, les variants mutants AE1 R589H sont retenus dans le RE des cellules MDCK, et peuvent former des hétérodimères avec les protéines AE1 WT, empêchant ainsi leur distribution à la membrane basolatérale (Cordat et al., 2006). [Figure 13]

D'autres mutations autosomiques dominantes d'AE1 telles que G609R, R901X, M909T, entrainent une distribution membranaire non polarisée de la protéine. Les kAE1 mutantes sont exprimées à la fois à la membrane apicale et basolatérale, ce qui court-circuite l'excrétion d'acide à cause de la sécrétion combinée de H^+ et de HCO_3^- dans la lumière du canal collecteur (Toye, Banting, & Tanner, 2004) [Figure 13]

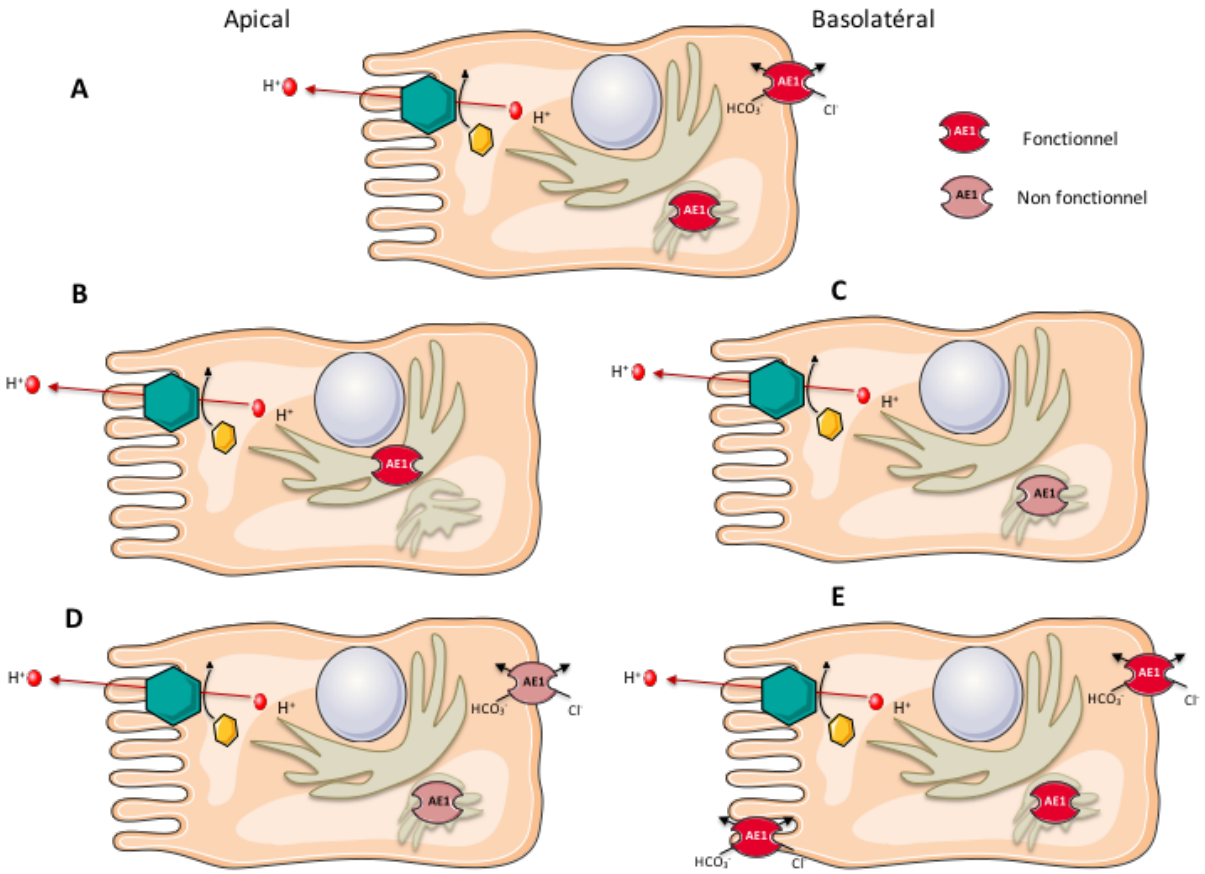


Figure 14: Schéma des mécanismes par lesquels les mutations d'AE1 conduisent à un transport Cl-/HCO3- altéré dans la dRTA.

A. Normal ; B. Séquestration dans le RE (R589H, S613F, S667P ; C. Séquestration dans le Golgi (G701D) ; D. Non fonctionnel/ partiellement fonctionnel (S773P) ; E. Distribution à la membrane apicale et basolatérale (G609R, R901X, M909T). (D'après Battle D. 2012)

2.3 Les modèles murins d'acidose tubulaire distale

Les modèles animaux d'invalidation d'AE1 ou des sous-unités de la vH^+-ATPase reproduisent, en partie, les symptômes retrouvés chez les patients atteints de dRTA.

Les souris invalidées pour AE1 présentent un retard de croissance, une anémie hémolytique très sévère et une mortalité élevée (Southgate, Chishti, Mitchell, Yi, & Palek, 1996). Stehberger et al. ont également montré que les souris $AE1^{-/-}$ développent une acidose métabolique hyperchlorémique. De plus, ces souris ont une néphrocalcinose, une hypercalciurie, et une hypocitraturie. Les souris $AE1^{-/-}$ ont également un sévère défaut de concentration de l'urine, causé notamment par l'altération de l'expression et de la distribution de canal AQP2 (Stehberger et al., 2007). Cependant, la sévérité du phénotype observé dans ce modèle peut sans doute être attribuer à l'atteinte des importante des globules rouges. Ce modèle ne reproduit pas les symptômes moins sévères, observés chez la majorité des patients atteints d'acidose tubulaire distale, qui eux ne présentent pas de troubles hémolytiques.

Les souris *Atp6v1b1*$^{-/-}$ sont invalidées pour la sous-unité B1 de la pompe à protons. Ces souris ne présentent qu'un phénotype modéré sans acidose métabolique, ni de perte de l'audition à l'état basal (Dou, Finberg, Cardell, Lifton, & Choo, 2003). Cependant, après une charge orale en acide, les souris *Atp6v1b1*$^{-/-}$ montrent un pH urinaire plus alcalin et développent une acidose métabolique plus sévère que les souris WT. Par ailleurs, l'expression de la sous-unité B2 - l'autre isoforme de la sous-unité B de la vH^+-ATPase, est augmentée chez ces souris pour compenser la perte de la sous-unité B1 mais cette compensation est incomplète car les souris développent tout de même une acidose (Finberg et al., 2005).

Les souris *Atp6v0a4*$^{-/-}$ sont invalidées pour la sous-unité a4 de la pompe à protons. Contrairement aux souris *Atp6v1b1*$^{-/-}$, les souris *Atp6v0a4*$^{-/-}$ souffrent d'une acidose sévère ainsi que d'une protéinurie, une phosphaturie et une surcharge des lysosomes ce qui témoigne d'une dysfonction du tubule proximal. Ces souris sont atteintes, en outre, de surdité causée par un élargissement des compartiments endolymphatiques dans l'oreille interne (Hennings et al., 2012).

OBJECTIF DE L'ÉTUDE

L'acidose tubulaire distale (dRTA) est une pathologie de la cellule α-intercalaire qui se traduit par une incapacité à sécréter les protons et, de ce fait, à acidifier l'urine. Un défaut de réabsorption des bicarbonates, dû à des mutations perte de fonction de l'échangeur basolatéral Cl^-/HCO_3^-, kAE1, peut être à l'origine de cette maladie. Des études *in vitro* ont proposé que les mutations pathogènes d'AE1 sont supposées induire un défaut du trafic intracellulaire et une perte de fonction de l'échangeur.

Un premier modèle murin d'invalidation globale d'AE1 a été crée dans le but de déterminer les effets de la perte de fonction d'AE1 sur les mécanismes rénaux d'acidification de l'urine. Cependant, l'inactivation d'AE1 ayant des effets importants sur la fonction des érythrocytes, la majeure partie du phénotype rénal observé peut être attribuée à la sévère anémie hémolytique qui en résulte.

Dans le but d'étudier la physiopathologie de la maladie, nous avons généré le premier modèle murin exprimant le variant AE1 R607H (correspondant au variant humain AE1 R589H), qui est la mutation d'AE1 la plus communément retrouvée chez les patients souffrant d'acidose tubulaire distale. Les mécanismes cellulaires responsables de la dRTA étant encore mal connus, ce modèle nous permettra de décrire les mécanismes cellulaires pathogènes mis en place dans la dRTA, d'étudier les possibles mécanismes compensatoires et de déterminer les effets à long terme de la dRTA, sur la formation de lithiase rénale ou autres effets secondaires liés à la dRTA.

RÉSULTATS

Les principaux résultats de cette étude sont résumés ci après :

1) Les souris *Ae1*$^{+/R607H}$ et *Ae1*$^{R607H/R607H}$ souffrent d'une acidose tubulaire distale incomplète. À l'état basal, les souris *Ae1*$^{+/R607H}$ et *Ae1*$^{R607H/R607H}$ ont un pH urinaire plus alcalin que les souris *Ae1*$^{+/+}$ mais ne présentent pas d'acidose. En réponse à une charge orale en acide (0,28M NH_4Cl), ces souris développent une acidose métabolique hyperchlorémique.

2) La protéine AE1 est correctement exprimée à la membrane basolatérale de cellules α-intercalaires.

3) L'activité d'échange Cl^-/HCO_3^- d'AE1 n'est pas modifiée par la mutation R607H/R589H *in vitro* et *in vivo*.

4) L'expression d'AE1 est diminuée dans le cortex et la medulla des reins des souris *Ae1*$^{+/R607H}$ and *Ae1*$^{R607H/R607H}$

5) La distribution de la pompe vH^+-ATPase au pôle apical des cellules α-intercalaires est altérée chez les souris *Ae1*$^{+/R607H}$ and *Ae1*$^{R607H/R607H}$

6) La mutation AE1 R607H entraine une diminution du nombre de cellules α-intercalaires chez les souris *Ae1*$^{+/R607H}$ and *Ae1*$^{R607H/R607H}$ qui pourrait être causée par un défaut des mécanismes d'autophagie.

SYNTHÈSE

Nous avons généré le premier modèle murin porteur d'une mutation d'AE1 responsable d'acidose tubulaire distale la plus communément retrouvée chez les patients. Cette étude a montré que les souris *Ae1*$^{+/R607H}$ et *Ae1*$^{R607H/R607H}$ souffrent d'une acidose tubulaire distale incomplète. En effet, comparées aux souris contrôles, les souris *Ae1*$^{+/R607H}$ et *Ae1*$^{R607H/R607H}$ sont incapables d'acidifier l'urine de façon maximale ou d'augmenter leur excrétion nette d'acide en réponse à une charge acide. Les souris homozygotes, *Ae1*$^{R607H/R607H}$, présentent un phénotype plus sévère et développent une acidose métabolique suite à cette charge acide.

L'expression d'AE1 est diminuée dans le cortex et la medulla de reins des souris *Ae1*$^{+/R607H}$ and *Ae1*$^{R607H/R607H}$. Toutefois l'activité de transport de l'échangeur AE1 n'est pas modifiée chez les mutants.

Des études *in vitro* avaient proposées que l'effet pathogène du variant R589H/R607H serait dû à sa rétention dans les compartiments intracellulaires et son effet dominant négatif sur la protéine sauvage. Cependant, notre étude a montré que chez les souris *Ae1*$^{+/R607H}$ et *Ae1*$^{R607H/R607H}$, l'échangeur AE1 est correctement exprimée à la membrane basolatérale de cellules α-intercalaires ou de cellules de lignées cellulaires rénales en culture.

La mutation d'AE1 altère le nombre et la composition des cellules α-intercalaires. En effet, chez les souris *Ae1*$^{+/R607H}$ and *Ae1*$^{R607H/R607H}$, le nombre de cellules α-intercalaires est drastiquement réduit ainsi que la proportion de pompe vH^{+}-ATPase à la membrane apicale des cellules α-intercalaires. De plus, on observe une accumulation de vésicules autophagiques dans les cellules α-intercalaires qui pourrait témoigner d'un défaut d'acidification des compartiments intracellulaires par la pompe vH^{+}-ATPase dans les lysosomes et probablement expliquer la diminution du nombre d'α-ICs.

L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'alcalinisation intracellulaire des cellules α-intercalaires, dû au défaut de réabsorption des bicarbonates par les variants mutés de l'échangeur AE1 (AE1 R607H), empêche la distribution à la membrane apicale de la pompe vH^{+}-ATPase, ce qui entraine par conséquent un défaut de sécrétion des protons dans l'urine et le développement d'une acidose métabolique.

ARTICLE

Type A-intercalated cell depletion and V-ATPase mistargeting in AE1 R607H knock-in mice modeling human dominant distal renal tubular acidosis

Authors:

Mumtaz R[1,*], Trepiccione F[2,3*], Hennings JC[1,*], Huebner AK[1,*], Serbin B[2,*], Ullah SA[4], Păunescu TG[5], Capen DE[5], Lashhab RM[4], Mouro-Chanteloup I[6], Alper SL[7], Wagner CA[8], Cordat E[4], Brown D[5], Eladari D[2,*], Hübner CA[1,*]

[*]equal contribution

Affiliations:
[1]Institute of Human Genetics, Jena University Hospital, Friedrich Schiller Universität, Jena, Germany
[2]Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U970, Paris Cardiovascular Research Center and Université Paris Descartes, Department of Physiology, Hopital Européen Georges Pompidou, Paris, France
[3]Department of Cardio-Thoracic and Respiratory Science, Second University of Naples, Naples, Italy
[4]Department of Physiology, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada
[5]Center for Systems Biology, Program in Membrane Biology and Division of Nephrology, Massachusetts General Hospital and Department of Medicine, Harvard Medical School, Boston, MA, USA
[6]Institut National de la Transfusion Sanguine; Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Unité Mixte de Recherche en Santé (UMR-S) 1134, Université Paris Diderot and Laboratory of Excellence Globule Rouge-Excellence (GR-Ex), Paris, France
[7]Nephrology Division and Vascular Biology Research Center, Beth Israel Deaconess Medical Center and Department of Medicine, Harvard Medical School, Boston, MA, USA
[8]Institute of Physiology, University of Zurich, Zurich, Switzerland

Correspondence:

Dominique Eladari
INSERM U970, Paris Cardiovascular Research Center, 56 rue Leblanc, F-75015, Paris, France
Dominique.eladari@inserm.fr

Christian A. Hübner
Institute of Human Genetics, Jena University Hospital, Friedrich-Schiller-University Jena, Kollegiengasse 10, 07743 Jena, Germany
Christian.huebner@med.uni-jena.de

Running title: AE1 R607H knock-in mice

Summary

Distal nephron acid secretion is mediated by highly specialized type A intercalated cells, which contain V-type ATPase-rich vesicles that fuse with apical plasma membrane upon demand. Intracellular bicarbonate generated by luminal H^+ secretion is removed by the basolateral anion exchanger AE1. Chronically reduced renal acid excretion of distal renal tubular acidosis (dRTA) leads to nephrocalcinosis and renal failure. While recessive dRTA is caused predominantly by mutations in either a4 or B1 subunits of V-type ATPase, AE1 mutations underlie dominant dRTA. The dominant-negative trafficking mechanism proposed to explain mutant AE1-associated dRTA was based on unequivocal studies in MDCK monolayers. To test this hypothesis in vivo, we have generated a knock-in mouse model of the most common dominant dRTA mutation in human AE1, R589H, which corresponds to R607H in the mouse. Red blood cell Ae1-mediated anion exchange activity and surface polypeptide expression were unchanged. Type A intercalated cell Ae1 expression was greatly reduced, but basolateral targeting of the mutant protein was preserved. Unexpectedly, V-type ATPase expression was also reduced, and its plasma membrane targeting upon acid challenge was compromised. Accumulation of p62-positive structures in type A intercalated cells of knock-in mice suggested a defect in the degradative pathway, which may contribute to decreased type A intercalated cell number. Type B intercalated cells were unaffected. We propose that reduced basolateral anion exchange activity in type A intercalated cells inhibits trafficking and regulation of V-type ATPase, compromising luminal H^+ secretion and possibly also lysosomal acidification.
(241 words)

Introduction

The kidney plays a major role in acid-base homeostasis by recovering filtered bicarbonate, generating new bicarbonate, and by controlling excretion of the daily acid load generated from dietary intake and normal catabolism. Renal acidification defects do not necessarily result in overt systemic metabolic acidosis, but often lead to growth retardation, hypokalemia, osteomalacia, and hypercalciuria, with potential complications of nephrolithiasis or nephrocalcinosis (1). The clinical outcome of renal tubular acidosis (RTA) is directly linked to the presence or absence of the latter complications, predisposing to focal tubular obstruction and injury, development of chronic pyelonephritis, and progression to end-stage renal disease.

Whereas reabsorption of filtered bicarbonate occurs mainly in the proximal tubule (PT), with remaining bicarbonate absorbed in the thick ascending limb of Henle's loop (TAL), and the early distal convoluted tubule (DCT), net elimination of non-volatile acid is mediated by type A intercalated cells in the more distal nephron segments, the connecting tubule (CNT) and collecting duct (CD). To achieve proton (H^+) secretion into the urine, type A intercalated cells express V-type ATPase at the apical cell pole (2). Protons are generated within these cells by hydration of CO_2, a chemical reaction catalyzed by intracellular carbonic anhydrase type II (CAII). The resulting carbonic acid (H_2CO_3) dissociates almost instantaneously into H^+ and HCO_3^-. While H^+ is secreted apically via the proton pump, HCO_3^- is extruded basolaterally by the chloride/bicarbonate exchanger AE1 (SLC4A1). Reduced bicarbonate extrusion reduces H^+ generation from CO_2 and water by carbonic anhydrase II and thereby impairs apical acid secretion. This transport model is supported by hereditary defects of distal renal acid secretion, also known as distal renal tubular acidosis (dRTA), caused by mutations of proton pump subunits a4 or B1, of carbonic anhydrase CA II, or of anion exchanger AE1 (1 , 3).

The *SLC4A1* gene encodes two transcripts encoding erythroid variant eAE1 and N-terminally truncated kidney variant kAE1, generated by alternative exon usage. Global disruption of both variants in mice causes a severe phenotype of life-threatening hemolytic anemia and dRTA, whereas heterozygous knock-out mice are grossly normal (4, 5). In humans, AE1 mutations can cause dRTA of either

autosomal recessive or dominant type. Whereas most recessive forms of dRTA present early with nephrolithiasis, nephrocalcinosis and hemolytic anemia, dominant forms are usually diagnosed later in life, with later development of nephrolithiasis and nephrocalcinosis, and only rarely develop clinically apparent hemolytic anemia (6). The reasons underlying this clinical variability associated with *SLC4A1* mutations are understood only in part. The most commonly encountered dominant dRTA variant, AE1 R589H, was shown to exhibit only mild reduction in anion exchange activity (6). Retention of heterologous AE1 R589H in the endoplasmic reticulum of polarized MDCK cells, along with co-retention of co-expressed wild-type AE1, supported the hypothesis that dominant negative trafficking defects underlie autosomal dominant dRTA caused by heterozygous AE1 mutations (7).

To test this hypothesis *in vivo,* we generated mice expressing the variant R607H, corresponding to human variant R589H. Both heterozygous and homozygous knock-in mice exhibited incomplete dRTA with gene dosage-dependence (less severe in heterozygotes than in homozygotes). Targeting of Ae1 R607H to the basolateral plasma membrane of type A intercalated cells was unexpectedly normal, as was transport activity *in vivo*. We further found that impaired targeting of the V-type ATPase and a decreased number of type A intercalated cells underlie impaired acid secretion in both heterozygous and homozygous knock-in mice.

Results:

Generation of Ae1 R607H knock-in mice

To study the cellular effect of the AE1 R589H variant *in vivo*, we introduced the orthologous mouse Ae1 mutation R607H into murine embryonic stem (ES) cells by homologous recombination. The R607H mutation is located within transmembrane span 6 near its cytoplasmic end (8) (Figure 1A-C). Homologous recombination was verified by Southern blot analysis exploiting the *Hind*III restriction site within intron 14 (Figure 1D) and by sequencing across the region encompassing the mutant codon (Figure 1E). Targeted cells were injected into blastocysts, which were then transferred into foster mice to obtain chimeric offspring. Chimeric mice were mated with cre-Deleter mice (9) to remove the neomycin selection cassette. Heterozygous knock-in mice ($Ae1^{+/R607H}$) were viable and appeared grossly normal. From heterozygous matings we obtained homozygous knock-in mice ($Ae1^{R607H/R607H}$) in the expected Mendelian ratio.

Neither heterozygous nor homozygous R607H knock-in mice showed any obvious phenotype, and overall mortality was indistinguishable compared to wild-type mice (Table 1 and data not shown). As observed in human dRTA patients heterozygous for AE1 R589H, R607H knock-in red blood cell counts and morphology were unaffected (Figure 1F and Table 1). Masson-Goldner stain of kidney sections revealed no evident hydronephrosis or other gross structural abnormalities (Figure 1G). Von Kossa stain revealed no nephrocalcinosis or nephrolithiasis by age 3 months (Figure 1H).

Heterozygous and homozygous R607H knock-in mice display incomplete dRTA

Although both $Ae1^{+/R607H}$ and $Ae1^{R607H/R607H}$ mice excreted urine that was more alkaline than that of their wild-type littermates, acid-base status and renal net acid excretion were normal in all genotypes under baseline conditions (Table 1).

Upon renal acidosis, chloride increases and [HCO_3^-] decreases. Unlike pH, pCO_2 and [HCO_3^-], chloride is largely unaffected by acute changes in respiration. Accordingly, chloride is often a more sensitive index of chronic systemic pH changes than [HCO_3^-] in the mouse. Indeed, mutant mice displayed increased chloride levels, while plasma [$HCO3^-$], pH and pCO_2 appeared to remain unchanged in blood. Interestingly, homozygous knock-in mice also showed hypocalciuria, which is supported by the

observation that increased urine pH was associated with lower calcium excretion (10), although the mechanism remains unclear.

To investigate renal acidification capacity, male *Ae1*$^{+/R607H}$, *Ae1*$^{R607H/R607H}$ and wild-type littermates were challenged with an acid load (0.28 M NH_4Cl in drinking water). All groups developed metabolic acidosis in response to NH_4Cl administration, with decreased blood pH (Figure 2A) and plasma [HCO_3^-] (Figure 2B), associated with increased blood [Cl^-] (Figure 2C). Acid load was associated with loss of body weight secondary to reduced water and food intake. In agreement with previous findings, wild-type mice quickly adapted to acid challenge with recovery of body weight, while mutant mice failed to recover from the observed body weight loss and showed reduced intake of food and water (Supplementary Figure 1).

During the acid load, blood pCO_2 was decreased independent of genotype, indicating respiratory adaptation to metabolic acidosis (Figure 2D). Urine pH decreased upon acute acid challenge, but only in wild-type mice did urine pH remain low during sustained acid loading (Figure 2E). Blood pH recovered to baseline levels in wild-type mice during sustained acid-loading (Figure 2A) due to increased urinary excretion of net acid (Figure 2F), NH_4^+ (Figure 2G) and titratable acid (Figure 2H). In contrast, neither *Ae1*$^{+/R607H}$ nor *Ae1*$^{R607H/R607H}$ mice could maximally decrease urinary pH, and neither exhibited increases in excretion of ammonium and of titratable acid comparable to WT animals. Homozygous knock-in mice exhibited a more marked renal acidification defect than their heterozygous littermates, as they were completely unable to recover from the acid load, developing persistent post-treatment metabolic acidosis.

In summary, these data demonstrate incomplete dRTA in both *Ae1*$^{+/R607H}$ and *Ae1*$^{R607H/R607H}$ mice, a phenotype compatible with, but of lesser apparent severity than that of dRTA patients heterozygous for AE1 mutation R589H (6).

The R607H/R589H kAE1 variant is correctly targeted to the basolateral plasma membrane of type A intercalated cells.

As in wild-type mice (Figure 3A,D), the kAe1 immunocytochemical signal was clearly localized to the basolateral membrane in kidney sections of *Ae1*$^{R607H/R607H}$ mice (Figure 3C,F and Supplementary Figure 2) indicating that normal targeting of the mutant polypeptide is preserved in both cortex (Figure 3C) and medulla (Figure 3F). A typical basolateral signal was also obtained in *Ae1*$^{+/R607H}$ mice (Figure 3B,E and

Supplementary Figure 2). The immunolabeling intensity, however, appeared less pronounced in *Ae1*$^{+/R607H}$ and *Ae1*$^{R607H/R607H}$ mice.

Ultrastructural analysis of immunogold-labeled kAe1 further supports normal targeting of the R607H variant to the basolateral plasma membrane (Figure 3G-I), but with lower labeling intensity than in WT mice.

These unexpected localization results prompted examination of human kAE1 R589H targeting in M-1 cells (Figure 3J,K and Supplementary Figure 2), derived from mouse cortical collecting duct, and in mIMCD-3 cells (Figure 3L,M and Supplementary Figure 2), derived from mouse inner medullary collecting duct. In both cell models, targeting of kAE1 to the basolateral plasma membrane was unaffected by the mutation. No intracellular accumulation of the mutant protein was detected.

These results, therefore, differ from those repeatedly observed in polarized MDCK cell monolayers, and thus argue against the prevailing concept that trafficking or targeting defects underlie human autosomal dominant dRTA caused by the AE1 R589H mutation.

The R607H/R589H mutation does not impair Ae1-dependent chloride-bicarbonate exchange activity *in vitro* and *in vivo*

Since targeting of the R607H kAe1 variant was normal, we next assessed whether the R607H variant confers reduced anion-exchange activity. Cl^-/HCO_3^- exchange activity in IMCD-3 cells transfected with either wild-type kAE1, kAE1 R589H, or both was stimulated to similar extents upon extracellular Cl^- removal (Figure 4A,B), suggesting that the R589H variant does not impair Cl^-/HCO_3^- exchange activity. Stopped-flow fluorimetry measurements (10) of Cl^--dependent HCO_3^- influx in resealed red blood cell ghosts prepared from either wild-type, *Ae1*$^{+/R607H}$, or *Ae1*$^{R607H/R607H}$ mice similarly showed no difference in anion exchange activity among genotypes (Figure 4C,D). Moreover, surface abundance of red cell eAe1 as assessed by FACS (Figure 4E,F) and total red cell eAe1 content as assessed by Coomassie blue stained gels of red blood cells lysates (Supplementary Figure 3) in *Ae1*$^{+/R607H}$ and in *Ae1*$^{R607H/R607H}$ mice were indistinguishable from corresponding values measured in wild-type red cells.

kAe1 expression is reduced in the kidney of *Ae1*$^{+/R607H}$ and *Ae1*$^{R607H/R607H}$ mice

We next assessed Ae1 transcript abundance in renal cortex and medulla from wild-type, *Ae1*$^{+/R607H}$ and *Ae1*$^{R607H/R607H}$ mice by real-time PCR. *Ae1* expression was reduced both in the cortex (Figure 5A) and in the medulla of *Ae1*$^{+/R607H}$ and *Ae1*$^{R607H/R607H}$ mice (Figure 5B), likely either reflecting decreased transcriptional efficiency and/or increased transcript degradation and/or a decrease in the number of type A intercalated cells.

In accordance with kidney transcript data and in contrast to red blood cells, kAe1 protein levels were strongly reduced in cortical lysates from both *Ae1*$^{+/R607H}$ and *Ae1*$^{R607H/R607H}$ mice and reduced to nearly the same degree in medulla (Figure 5C-D and Supplementary Figure 4). In agreement with this strong reduction in tissue lysates, Ae1 immunostaining revealed not only decreased fluorescence intensity in individual cells, but also greatly reduced numbers of kAe1-positive cells (Figure 5E). This decreased kAe1 immunoreactivity could reflect decreased protein stability of the R607H variant in intercalated cells. However, the ~24 h half-life of recombinant human kAE1 R589H-HA as measured by pulse-chase experiments in both M1 cells (Figure 5F) and mIMCD-3 cells (Figure 5G) was indistinguishable from that of wild-type human kAE1-HA. (See Supplementary Figure 5 for original immunoblots). These results resembled half-lives of the human wild-type and mutant proteins estimated in HEK-293 cells (11) but differed greatly from the kAE1-R598H half-life of 1-2 hours measured in polarized MDCK monolayers (7, 12).

Although anion transport activities of mouse kAE1 R607H and human kAE1 R589H are unchanged, the strongly decreased expression levels suggest that basolateral anion exchange activity is severely compromised in renal type A intercalated cells of *Ae1*$^{+/R607H}$ and *Ae1*$^{R607H/R607H}$ mice.

Apical sorting of the proton pump is compromised in *Ae1*$^{+/R607H}$ and *Ae1*$^{R607H/R607H}$ mice

The intercalated cell activities of kAE1 and V-type ATPase are coupled to mediate luminal proton secretion. Hence, we assessed targeting of the V-type ATPase B1 subunit in mice at baseline (Supplementary Figure 6) and after acid challenge (Figure 6 and Supplementary Figure 7). As expected, in WT mice the B1 subunit was localized almost exclusively to the apical domain of type A intercalated cells after acid challenge (Figure 6A). However, in *Ae1*$^{+/R607H}$ (Figure 6B) and *Ae1*$^{R607H/R607H}$ (Figure 6C) mice this apical localization was severely compromised, suggesting altered proton pump targeting in *Ae1*$^{+/R607H}$ and *Ae1*$^{R607H/R607H}$ mice. Immunogold labeling of the A

subunit of the V-type ATPase under baseline conditions (Figure 6D-L) confirmed decreased labeling of intracellular vesicles at the apical pole of type A intercalated cells (Figure 6G-I). In contrast, V-ATPase labeling in type B intercalated cells was preserved in *Ae1*$^{+/R607H}$ and *Ae1*$^{R607H/R607H}$ mice (Supplementary Figure 8). Total renal cortical B1 subunit abundance was decreased in acid-challenged mice as judged by cortical membrane fraction immunoblot (Figure 6M).

The Ae1 R607H mutation causes a marked depletion of type A intercalated cells, potentially caused by defective autophagy

To better define the cellular composition of collecting ducts in *Ae1*$^{+/R607H}$ and *Ae1*$^{R607H/R607H}$ mice, we co-stained kidney sections for Ae1, Pendrin, and the E-subunit of the V-type ATPase (Figure 7A and Supplementary Figure 9). Importantly, all Pendrin-negative cells that stained for the E-subunit, i.e. type A intercalated cells, also expressed Ae1. Conversely, Pendrin-positive cells never co-stained with Ae1. In a separate experiment we also co-stained for Ae1, Pendrin, and Aquaporin 2 to identify principal cells (Figure 7B and Supplementary Figure 10). While the number of type A intercalated cells was dramatically reduced in the cortex of both *Ae1*$^{+/R607H}$ and *Ae1*$^{R607H/R607H}$ mice, the number of type B intercalated cells and principal cells remained unchanged. Therefore, the proportion of type A-to-B intercalated cells was significantly decreased (Figure 7C). This effect was even more pronounced after acid challenge (Figure 7D).

We also estimated the size of type A intercalated cells by measuring the section area of individual type A intercalated cells as described previously (13). Indeed, type A ICs appeared to be swollen in heterozygous and even homozygous knock-in mice (Figure 7E).

Ultrastructural analysis of type A intercalated cells revealed that the typical intracellular vesicles observed in type A intercalated cells of wild-type mice (Figure 8A,D,G) were depleted in *Ae1*$^{+/R607H}$ (Figure 8B,E,H) and *Ae1*$^{R607H/R607H}$ mice (Figure 8C,F,I). In contrast, the type A intercalated cells of *Ae1*$^{+/R607H}$ and *Ae1*$^{R607H/R607H}$ mice contained numerous atypical lysosome-like vesicular structures reminiscent of autophagic structures (Figure 8B,C,E,F,H,I) and multilamellar bodies (Figure 8I). In cortical (Figure 8J-L, Supplementary Figure 11) and medullary (Supplementary Figure 12) type A intercalated cells in *Ae1*$^{+/R607H}$ (Figure 8K) and *Ae1*$^{R607H/R607H}$ mice (Figure 8L) co-staining with p62, a receptor for intracellular toxic waste destined for autophagy (14)

further supported the interpretation of autophagic vesicles. Importantly, these vesicular structures also partially co-localized with Ubiquitin (Figure 8M-O and Supplementary Figure 13), which marks proteins for degradation (15).

Discussion

Patients with dominant dRTA due to AE1 mutations typically suffer from hyperchloremic metabolic acidosis, variable hypokalemia, osteomalacia and childhood growth retardation, usually without apparent erythroid pathology, and frequently progressing to renal failure in the setting of nephrocalcinosis and nephrolithiasis (16-18). Mice genetically lacking Ae1 also exhibited severe dRTA characterized by hyperchloremic metabolic acidosis with inappropriately alkaline urine and culminating in nephrocalcinosis associated with hypercalciuria, hyperphosphaturia, and hypocitraturia, whereas heterozygous knock-out mice were unaffected (4). However, Ae1-deficient mice are also characterized by high peri- and postnatal lethality, most likely attributable to severe hemolytic anemia. The severe anemia and exaggerated renal medullary hypoxia, accompanied by elevated levels of toxic free hemoglobin and pathological hemosiderosis all likely contribute to aggravation of the intrinsic defect in renal acid excretion. Indeed, sickle cell disease patients with hemolytic anemia and renal medullary ischemia often develop metabolic acidosis as part of sickle nephropathy (19).
Therefore, in order to study the role of Ae1 in the kidney independent of the red blood cell phenotype, we decided to model in mice the most common AE1 mutation found in dominant dRTA patients, AE1 R589H. *Ae1*$^{R607H/+}$ mice were unable to maximally decrease urine pH or to increase urinary excretion of ammonium and titratable acid in response to an acid load as compared to wild-type mice. Homozygous knock-in mice exhibited an even more severe defect in acid excretion, as they were completely unable to recover from an acid load, developing a persistent metabolic acidosis following this challenge.

The phenotype of R607H mice is mild compared to the usually complete dRTA observed in humans with the corresponding R589H mutation, although considerable variability of clinical presentation can be observed among affected individuals even within the same family. One possible explanation is diet, as the standard mouse chow provides a large net dietary alkali load (20), whereas the higher protein content of the typical Western human diet constitutes a net acid load. Species-specific differences should also be considered, as these have been noted in other models, including the V-ATPase B1 subunit knock-out mouse (21) generated in a mixed

SVJ129/C57BL/6 background similar to that of our present study. Moreover, the proportion of basolateral membrane Cl^-/HCO_3^- exchange mediated by kAE1 in type A intercalated cells may be greater in the human collecting duct than in the mouse. Genetic ablation of AE1 reduced Cl^-/HCO_3^- exchange in superfused isolated outer medullary collecting duct by only 20 %, reflecting a compensatory upregulation of bicarbonate or equivalent transporters (4). Thus we propose that distal urinary acidification by the human type A intercalated cell depends on AE1 to a greater degree than in the type A intercalated cell of the mouse to explain the apparently greater severity of dRTA in the human associated with AE1 R589H than that associated with dRTA in the mouse expressing the corresponding mouse AE1 mutant R607H.

At least two pathophysiological mechanisms have been proposed to explain autosomal dominant dRTA related to mutations in kAE1. While a dominant or co-dominant mis-targeting to the apical membrane was reported for a C-terminal truncation variant (22, 23), the kAE1 R589H variant exhibited a dominant negative intracellular retention phenotype upon heterologous expression in confluent polarized MDCK cells (7) as well as in nonpolarized HEK-293 cells (11). We addressed the validity of this latter finding in our newly created mouse model of dRTA. In stark contrast to results in MDCK cells basolateral Ae1 localization was preserved in heterozygous Ae1 R607H knock-in mice as judged by immunofluorescence and immunogold electron microscopy. Even in homozygous knock-in mice, mutant Ae1 localized at the basolateral membrane without accumulation in a cytoplasmic compartment, strongly suggesting normal targeting of the pathological R607H variant. This targeting discrepancy prompted analysis of kAE1 targeting in the cortical collecting duct cell line M1 and in the medullary collecting duct cell line mIMCD-3. These studies confirmed predominant basolateral localization of the HA-tagged R589H variant in polarized M1 and mIMCD-3 cells, in contrast to previous robust observations in polarized MDCK cells.

Since the kAe1 R607H was normally localized at the type A intercalated cell basolateral membrane in the intact mouse kidney, we tested the anion transport activity of the variant protein. Previous studies reported that recombinant kAE1 R589H expressed in *Xenopus* oocytes showed a 20-50 % reduction in Cl^-/Cl^- and

Cl^-/HCO_3^- exchange activity and did not display a dominant negative phenotype for anion transport when co-expressed with wild-type kAE1 (6). Our stopped-flow fluorometric measurements of Cl^--dependent HCO_3^- influx in resealed red cell ghosts revealed no genotype-dependent difference in transport activity. Transport activity was also unchanged in IMCD-3 cells transfected with the R589H variant.

In remarkable contrast to the red blood cell, Ae1 expression in the kidney was strongly reduced. This observation is in line with a previous observation reporting strong reduction or absence of AE1 staining in renal cortex from a dRTA patient heterozygous for AE1 R589H (although possibly influenced by the sample's coexistent chronic pyelonephritis and tubulointerstitial fibrosis) (24). Thus basolateral bicarbonate efflux from renal type A intercalated cells can be assumed to be reduced in correlation with the number of *Ae1* alleles affected by the mutation, consistent with codominant inheritance (if not dominant inheritance, as suggested by the immunoblot of Fig. 6J).

Acid secretion in *Ae1*$^{+/R607H}$ and *Ae1*$^{R607H/R607H}$ mice is further compromised by reduced plasma membrane abundance of V-type ATPase possibly reflecting a trafficking defect. This was particularly prominent in mice subjected to an acid challenge normally associated with massive translocation of the multimeric pump from intracellular compartments to the apical plasma membrane of type A intercalated cells (2). The accumulation of intracellular p62- and Ubiquitin-positive structures in type A intercalated cells of *Ae1*$^{+/R607H}$ and *Ae1*$^{R607H/R607H}$ mice further suggests a defect in the degradative pathway and/or in autophagy, which may be related to defective lysosomal targeting of the V-type ATPase. Similar to our findings, impaired V-ATPase activity due to inactivation of the renal Atp6ap2/(Pro)renin Receptor also resulted in the accumulation of multilamellar bodies and defects in autophagy (25).

The mechanism by which kAe1 R607H severely perturbs V-type ATPase targeting in the absence of known physical association or subcellular colocalization remains unclear. Since impaired basolateral HCO_3^- extrusion should alkalinize type A intercalated cells, the pH dependence of microtubule assembly (26), actin polymerization/depolymerization (27-30), and other cytoskeletal dynamics may well contribute to the targeting defect. A similar mechanism has been proposed in a murine model of osteopetrosis for altered V-ATPase targeting in osteoclasts deficient in the basolateral anion exchanger Ae2 (31). In the kidney, microtubule disruption

has dramatic effects on the polarized distribution of several important membrane proteins, including the V-type-ATPase (32).

Taken together, the data suggest that the R607H variant (and by extension, the R589H variant in humans) may disrupt the normal trafficking of V-type ATPase to the plasma membrane and lysosomes in type A intercalated cells. The latter may explain accumulation of p62/SQSTM1- and Ubiquitin-positive structures, perhaps eventuating in the decreased total number of type A intercalated cells, which perpetuates the acid secretion defect. These findings illustrate the considerable, context-dependent complexity of Ae1-related kidney disease.

Concise methods

Generation of Ae1 R607H mice and all other materials and methods are listed under supplementary information. All animal experiments were approved by the Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz (TLLV) in Germany.

Acknowledgements

We are grateful to Katrin Schorr and Denis Arutyunov for excellent experimental support. This study was funded by the DFG (Hu 800/8-1) and the Else-Kröner-Fresenius-Stiftung to CAH; a fellowship by the IZKF Jena to JCH, the Canadian Institutes of Health Research (MOP142251) and the Kidney Foundation of Canada to EC; the International Research Training Group in Membrane Biology from the NSERC-CREATE 414205-2012 program to RML and SAU; the Swiss National Science Foundation ((31003A_155959/1) to CAW; the NIH (DK042956) and the Boston Area Diabetes and Endocrinology Research Center (DK57521) and the MGH Center for the Study of Inflammatory Bowel Disease (DK43351) supporting the Program in Membrane Biology Microscopy Core facility to DB, TGP and DEC; the ERA-EDTA LTF41-2013 to FT; the l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) ANR BLANC 14-CE12-0013-01/HYPERSCREEN, the grants ECOS/CONYCIT France-Chile 2014 and CHLORBLOCK from the IDEX Sorbonne Paris Cité to DE; a fellowship from the CONYCIT to KL.

Statement of competing financial interests

None.

References

1. Batlle D, and Haque SK. Genetic causes and mechanisms of distal renal tubular acidosis. *Nephrology, Dialysis, Transplantation : Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association.* 2012;27(10):3691-704.
2. Wagner CA, Finberg KE, Breton S, Marshansky V, Brown D, and Geibel JP. Renal vacuolar H^+-ATPase. *Physiological reviews.* 2004;84(4):1263-314.
3. Alper SL. Familial renal tubular acidosis. *Journal of Nephrology.* 2010;23 Suppl 16(S57-76.
4. Stehberger PA, Shmukler BE, Stuart-Tilley AK, Peters LL, Alper SL, and Wagner CA. Distal renal tubular acidosis in mice lacking the AE1 (band3) $Cl^-/HCO3^-$ exchanger (*Slc4a1*). *Journal of the American Society of Nephrology : JASN.* 2007;18(5):1408-18.
5. Akel A, Wagner CA, Kovacikova J, Kasinathan RS, Kiedaisch V, Koka S, Alper SL, Bernhardt I, Wieder T, Huber SM, et al. Enhanced suicidal death of erythrocytes from gene-targeted mice lacking the Cl^-/HCO_3^- exchanger AE1. *American Journal of Physiology - Cell Physiology.* 2007;292(5):C1759-67.
6. Jarolim P, Shayakul C, Prabakaran D, Jiang L, Stuart-Tilley A, Rubin HL, Simova S, Zavadil J, Herrin JT, Brouillette J, et al. Autosomal dominant distal renal tubular acidosis is associated in three families with heterozygosity for the R589H mutation in the AE1 (band 3) Cl^-/HCO_3^- exchanger. *The Journal of Biological Chemistry.* 1998;273(11):6380-8.
7. Cordat E, Kittanakom S, Yenchitsomanus PT, Li J, Du K, Lukacs GL, and Reithmeier RA. Dominant and recessive distal renal tubular acidosis mutations of kidney anion exchanger 1 induce distinct trafficking defects in MDCK cells. *Traffic.* 2006;7(2):117-28.
8. Arakawa T, Kobayashi-Yurugi T, Alguel Y, Iwanari H, Hatae H, Iwata M, Abe Y, Hino T, Ikeda-Suno C, Kuma H, et al. Crystal structure of the anion exchanger domain of human erythrocyte band 3. *Science.* 2015;350(6261):680-4.
9. Schwenk F, Baron U, and Rajewsky K. A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells. *Nucleic acids research.* 1995;23(24):5080-1.
10. Bonny O, Rubin A, Huang CL, Frawley WH, Pak CY, and Moe OW. Mechanism of urinary calcium regulation by urinary magnesium and pH. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN.* 2008;19(8):1530-7.
11. Quilty JA, Li J, and Reithmeier RA. Impaired trafficking of distal renal tubular acidosis mutants of the human kidney anion exchanger kAE1. *American Journal of Physiology - Renal Physiology.* 2002;282(5):F810-20.
12. Chu CY, King JC, Berrini M, Alexander RT, and Cordat E. Functional rescue of a kidney anion exchanger 1 trafficking mutant in renal epithelial cells. *PloS one.* 2013;8(2):e57062.
13. West MJ. Estimating volume in biological structures. *Cold Spring Harbor protocols.* 2012;2012(11):1129-39.
14. Komatsu M, Kurokawa H, Waguri S, Taguchi K, Kobayashi A, Ichimura Y, Sou YS, Ueno I, Sakamoto A, Tong KI, et al. The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nature Cell Biology.* 2010;12(3):213-23.

15. Komander D, and Rape M. The ubiquitin code. *Annual review of Biochemistry.* 2012;81(203-29.
16. Bruce LJ, Cope DL, Jones GK, Schofield AE, Burley M, Povey S, Unwin RJ, Wrong O, and Tanner MJ. Familial distal renal tubular acidosis is associated with mutations in the red cell anion exchanger (Band 3, AE1) gene. *The Journal of Clinical Investigation.* 1997;100(7):1693-707.
17. Bruce LJ, Wrong O, Toye AM, Young MT, Ogle G, Ismail Z, Sinha AK, McMaster P, Hwaihwanje I, Nash GB, et al. Band 3 mutations, renal tubular acidosis and South-East Asian ovalocytosis in Malaysia and Papua New Guinea: loss of up to 95% band 3 transport in red cells. *The Biochemical Journal.* 2000;350 Pt 1(41-51.
18. Karet FE, Gainza FJ, Gyory AZ, Unwin RJ, Wrong O, Tanner MJ, Nayir A, Alpay H, Santos F, Hulton SA, et al. Mutations in the chloride-bicarbonate exchanger gene AE1 cause autosomal dominant but not autosomal recessive distal renal tubular acidosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1998;95(11):6337-42.
19. Maurel S, Stankovic Stojanovic K, Avellino V, Girshovich A, Letavernier E, Grateau G, Baud L, Girot R, Lionnet F, and Haymann JP. Prevalence and correlates of metabolic acidosis among patients with homozygous sickle cell disease. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology : CJASN.* 2014;9(4):648-53.
20. Lin SH, Cheema-Dhadli S, Chayaraks S, Chen CB, Gowrishankar M, and Halperin ML. Physiological disposal of the potential alkali load in diet of the rat: steps to achieve acid-base balance. *The American Journal of Physiology.* 1998;274(6 Pt 2):F1037-44.
21. Finberg KE, Wagner CA, Bailey MA, Paunescu TG, Breton S, Brown D, Giebisch G, Geibel JP, and Lifton RP. The B1-subunit of the H^+ ATPase is required for maximal urinary acidification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2005;102(38):13616-21.
22. Devonald MA, Smith AN, Poon JP, Ihrke G, and Karet FE. Non-polarized targeting of AE1 causes autosomal dominant distal renal tubular acidosis. *Nature genetics.* 2003;33(2):125-7.
23. Toye AM, Banting G, and Tanner MJ. Regions of human kidney anion exchanger 1 (kAE1) required for basolateral targeting of kAE1 in polarised kidney cells: mis-targeting explains dominant renal tubular acidosis (dRTA). *Journal of Cell Science.* 2004;117(Pt 8):1399-410.
24. Shayakul C, Jarolim P, Zachlederova M, Prabakaran D, Cortez-Campeao D, Kalabova D, Stuart-Tilley AK, Ideguchi H, Haller C, and Alper SL. Characterization of a highly polymorphic marker adjacent to the SLC4A1 gene and of kidney immunostaining in a family with distal renal tubular acidosis. *Nephrology, Dialysis, Transplantation : Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association.* 2004;19(2):371-9.
25. Trepiccione F, Gerber SD, Grahammer F, Lopez-Cayuqueo KI, Baudrie V, Paunescu TG, Capen DE, Picard N, Alexander RT, Huber TB, et al. Renal Atp6ap2/(Pro)renin Receptor Is Required for Normal Vacuolar H^+-ATPase Function but not for the Renin-Angiotensin System. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN.* 2016.
26. Regula CS, Pfeiffer JR, and Berlin RD. Microtubule assembly and disassembly at alkaline pH. *The Journal of Cell Biology.* 1981;89(1):45-53.
27. Wang F, Sampogna RV, and Ware BR. pH dependence of actin self-assembly. *Biophysical Journal.* 1989;55(2):293-8.

28. Hawkins M, Pope B, Maciver SK, and Weeds AG. Human actin depolymerizing factor mediates a pH-sensitive destruction of actin filaments. *Biochemistry.* 1993;32(38):9985-93.
29. Yonezawa N, Nishida E, and Sakai H. pH control of actin polymerization by cofilin. *The Journal of Biological Chemistry.* 1985;260(27):14410-2.
30. Bernstein BW, Painter WB, Chen H, Minamide LS, Abe H, and Bamburg JR. Intracellular pH modulation of ADF/cofilin proteins. *Cell Motility and the Cytoskeleton.* 2000;47(4):319-36.
31. Coury F, Zenger S, Stewart AK, Stephens S, Neff L, Tsang K, Shull GE, Alper SL, Baron R, and Aliprantis AO. SLC4A2-mediated $Cl^-/HCO3^-$ exchange activity is essential for calpain-dependent regulation of the actin cytoskeleton in osteoclasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2013;110(6):2163-8.
32. Brown D, Sabolic I, and Gluck S. Colchicine-induced redistribution of proton pumps in kidney epithelial cells. *Kidney International Supplement.* 1991;33(S79-83.
33. Barneaud-Rocca D, Etchebest C, and Guizouarn H. Structural model of the anion exchanger 1 (SLC4A1) and identification of transmembrane segments forming the transport site. *The Journal of Biological Chemistry.* 2013;288(37):26372-84.

Figure legends

Figure 1. Generation and initial characterization of *Ae1*$^{+/R607H}$ and *Ae1*$^{R607H/R607H}$ knock-in mice.

(**A**) Position of the human R589H mutation within the putative topology of AE1 according to the model presented by (33). (**B**) Alignment of human AE1 R589 with murine Ae1 R607. (**C**) Targeting and screening strategy. Top: murine *Ae1* locus; middle: targeted locus; lower: locus after Cre-mediated removal of the selection cassette. (**D**) Clones were screened by Southern blot using *Hind*III and an external probe as indicated. The probe detected a 20 kb WT fragment and a 4.8 kb targeted fragment. (**E**) Introduction of the modified codon verified by Sanger sequencing. (**F**) Red blood cells of heterozygous and homozygous knock-in mice displayed normal morphology. Scale bar: 10 µm. (**G**) Histological analysis of mouse kidney sections at 3 months of age revealed no abnormalities (Masson Goldner, scale bar 50 µm). (**H**) Von Kossa stain revealed no detectable nephrocalcinosis (bar 50 µm).

Figure 2. Incomplete distal renal acid secretion defect in *Ae1*$^{+/R607H}$ and *Ae1*$^{R607H/R607H}$ mice.

(**A**-**H**) After 3 days under standard conditions to determine baseline (BSL) values, *Ae1*$^{+/+}$ (n=6; black diamond), *Ae1*$^{+/R607H}$ (n=10; blue square) and *Ae1*$^{R607H/R607H}$ (n=8; red triangle) mice were acid-challenged for 6 days with 0.28 M NH_4Cl in drinking water. (A) Blood pH. (B) Blood [HCO_3^-]. (C) Blood [Cl^-]. (D) Blood pCO_2. (E) Urine pH. (F) Urinary net acid excretion (NAE). (G) Urinary NH_4^+ excretion. (H) Urinary titrable acid (TA). Data are presented as mean ± SEM. **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001 vs *Ae1*$^{+/+}$ and $^{\#}$P<0.05, $^{\#\#}$P<0.01 vs *Ae1*$^{+/R607H}$ (Two-way ANOVA).

Figure 3. The R607H/R589H variant is correctly targeted to the basolateral plasma membrane.

(**A**-**F**) High magnification images of cortical collecting duct (A-C) and inner stripe of the outer medulla (D-F) in *Ae1*$^{+/+}$, *Ae1*$^{+/R607H}$ and *Ae1*$^{R607H/R607H}$ showing that Ae1 R607H is localized to the basolateral pole of type A intercalated cells. Scale bar: 10 µm. (**G**-**I**) The basolateral targeting of Ae1 R607H is evident from immunogold labeling in cortical type A intercalated cells. Scale bar: 250 nm. (**J**-**M**) M1 (J,K) or mIMCD-3 (L,M) cells expressing either human kAE1 WT-myc or R589H-HA were grown to confluency for 7 days on semi-permeable filters prior to fixation, permeabilization and detection of kAE1 with either mouse anti-myc or anti-HA antibody, followed by Cy3-coupled anti-Ig (red). Nuclei were stained with DAPI. Scale bar: 10 µm.

Figure 4. The R607H/R589H mutation impairs AE1-dependent chloride bicarbonate exchange activity in vivo.

(**A**) Representative (BCECF fluorescence ratio) intracellular pH traces from Cl^-/HCO_3^- exchange experiments performed on mIMCD-3, mIMCD-3 kAE1 WT, mIMCD-3 kAE1 R589H or mIMCD-3 co-expressing kAE1 WT and R589H. The white and black rectangles above indicate incubations with NaCl and sodium gluconate containing solutions, respectively. (**B**) Transport rates of kAE1 WT, R589H or WT and R589H mutant are all similar in mIMCD-3 cells. (**C**) Anion exchange traces of resealed red blood cell ghosts. (**D**) Anion exchange activity is identical in ghosts prepared from either *Ae1*$^{+/+}$, *Ae1*$^{+/R607H}$ and *Ae1*$^{R607H/R607H}$ mice. (**E**) Fluorescence intensity of FACS-sorted red blood cells labelled with anti-Diego antibodies directed against different extracellular AE1 epitopes. (**F**) Quantitative comparison of AE1 surface expression in red blood cells from WT, *Ae1*$^{+/R607H}$ and *Ae1*$^{R607H/R607H}$ mice did not reveal differences among genotypes (n.s., one-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons test). Data are shown as mean ± SEM from a minimum of 3 independent experiments (*P<0.05, **P<0.01 versus control, one-way ANOVA).

Figure 5. AE1 expression is reduced in the kidney of Ae1$^{+/R607H}$ and Ae1$^{R607H/R607H}$ mice.

(**A,B**) Quantitative RT-PCR shows that relative cortical *Ae1* transcript abundance in *Ae1*$^{+/R607H}$ mice is only 40 % of wild-type levels and 15 % in *Ae1*$^{R607H/R607}$ mice (A). Relative *Ae1* medullary transcript abundance in *Ae1*$^{+/R607H}$ is 70 % of wild-type levels and 35 % in *Ae1*$^{R607H/R607}$ (B). Data are presented as means ± SEM; n=3 each. (**C-D**) Ae1 protein abundance analyzed in protein lysates from cortex and medulla, is drastically reduced in the cortex and only slightly less so in the medulla of *Ae1*$^{+/R607H}$ and *Ae1*$^{R607H/R607}$ mice compared to wild-type. Data are presented as means ± SEM; n=5 per genotype. (**E-F**) Consistent with immunoblot results, Ae1 immunoreactivity (red) in cortex (upper panels) and medulla (lower panels) is decreased in *Ae1*$^{+/R607H}$ and *Ae1*$^{R607H/R607H}$ mice relative to that in *Ae1*$^{+/+}$ mice. Scale bar: 75 µm. (**F,G**) Quantification of time-dependent relative AE1 abundance in M1 (F) and mIMCD3 (G) cells incubated with protein synthesis inhibitor, cycloheximide. Data are presented as means ± SEM; n=3 each. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.005, ****P<0.001 (One-way ANOVA and Tukey's multiple comparison)

Figure 6. Apical sorting of the proton pump is compromised in *Ae1*$^{+/R607H}$ and *Ae1*$^{R607H/R607H}$ mice

(A-C) The B1 subunit of the V-ATPase of acid challenged WT mice almost exclusively localized to the apical domain of type A intercalated cells in the cortex. In *Ae1*$^{+/R607H}$ and *Ae1*$^{R607H/R607H}$ mice, however, this shift to the apical domain did not occur, suggesting a secondary targeting defect of the proton pump in *Ae1*$^{+/R607H}$ and *Ae1*$^{R607H/R607H}$ mice. Scale bar: 10 µm. (**D-I**) Immunogold labeling of the A subunit of the V-type-ATPase**.** (D-F) Overview of type A intercalated cells from WT, *Ae1*$^{+/R607H}$ and *Ae1*$^{R607H/R607H}$ mice. (G-I) Higher magnification view of the apical cell pole. Scale bar: 2 µm. (J-L) Higher magnification view of the basolateral cell pole. Scale bar: 1 µm. (**J**) Renal cortex immunoblot shows reduced B1 subunit expression in both heterozygous and homozygous mice *P<0.05, ****P<0.0001 compared to the WT (One-way ANOVA and Tukey's multiple comparison).

Figure 7. Cortical collecting ducts of *Ae1*$^{+/R607H}$ and *Ae1*$^{R607H/R607H}$ mice are depleted of type A intercalated cells

(**A**) Co-staining for Ae1 (red), Pendrin (blue), and the E-subunit (green) of the V-type ATPase. Pendrin-negative cells that stain for the E-subunit also label for Ae1 and thus represent type A intercalated cells. Scale bar: 25 µm. (**B**) Co-staining for Ae1 (red), Pendrin (blue), and Aquaporin 2 (green). Scale bar: 25 µm. (**C**,**D**) Quantification of type A intercalated cells, type B intercalated cells, and principal cells in the cortex at baseline (C) and after acid challenge (D). The number of cortical type A intercalated cells is strongly reduced in *Ae1*$^{+/R607H}$ and *Ae1*$^{R607H/R607H}$ mice. (**E**) Cross-sectional area of individual type A intercalated cells showed increased volumes in *Ae1*$^{+/R607H}$ (n=28) and *Ae1*$^{R607H/R607H}$ (n=33) mice compared to wild-type (n=28) mice in the inner stripe of the outer medulla (ISOM). *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 (One-way ANOVA and Tukey's multiple comparison).

Figure 8. Type A intercalated cells accumulate p62^{+} structures in *Ae1*$^{+/R607H}$ and *Ae1*$^{R607H/R607H}$ mice

(**A-I**) Compared to WT (**A,D,G**) the ultrastructural architecture of type A intercalated cells of *Ae1*$^{+/R607H}$ (**B,E,H**) and *Ae1*$^{R607H/R607H}$ (**C,F,I**) mice is characterized by a depletion of the regular intracellular vesicles (arrow) and accumulation of lysosomal inclusions (arrowheads) and multilamellar bodies (asterisks). Scale bars: 2 µm (A-C) and 1 µm (D-F) and 500 nm (G-I). (**J**-**L**) Accumulation of p62^{+} deposits in Ae1-positive cells in the renal cortex of *Ae1*$^{+/R607H}$ and *Ae1*$^{R607H/R607H}$ mice but not in Ae1$^{+/+}$ mice. Scale bar: 25 µm. (**M-O**) p62 positive structures in the renal cortex of *Ae1*$^{+/R607H}$ and *Ae1*$^{R607H/R607H}$ mice partially co-localize with Ubiquitin. Scale bar: 10 µm.

Table 1. Baseline characterization of *Ae1*$^{+/R607H}$ and *Ae1*$^{R607H/R607H}$ mice

In the basal state *Ae1*$^{+/R607H}$ and *Ae1*$^{R607H/R607H}$ mice have no detectable alterations in acid-base parameters revealing that, as in humans, R607H mutation causes incomplete dRTA with a higher urinary pH. The increase in blood chloride levels is consistent with the presence of a slight hyperchloremic metabolic acidosis. Values are means ± SEM, numbers of mice are indicated in brackets. *P<0.05, ****P<0.0001, vs Ae1$^{+/+}$ (age 3-5 months, One-way ANOVA).

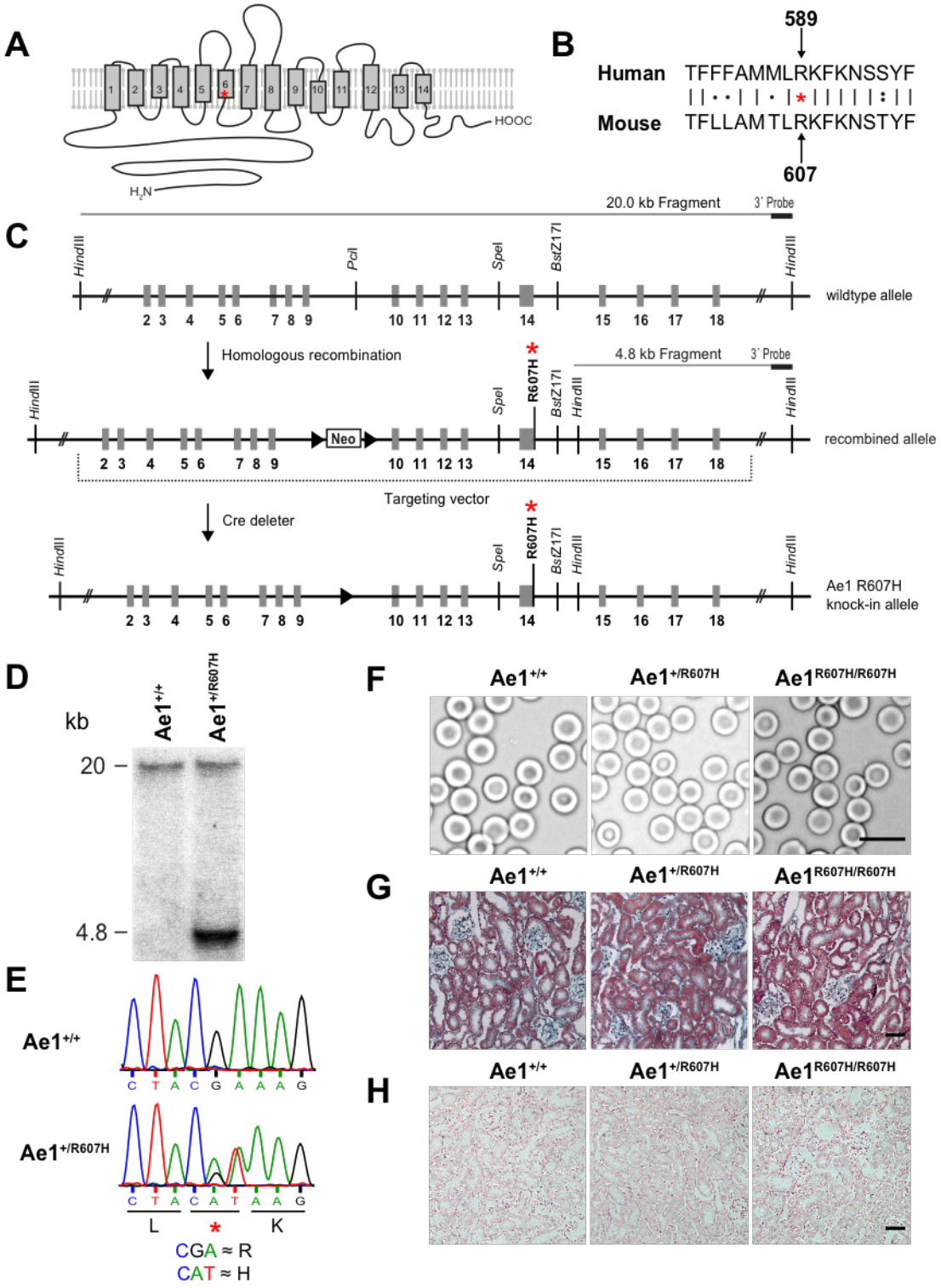

A
HOOC
H2N
B
589
Human TFFFAMMLRKFKNSSYF
Mouse TFLLAMTLRKFKNSTYF
607
C
20.0 kb Fragment
3´ Probe
HindIII
PciI
SpeI
BstZ17I
wildtype allele
Homologous recombination
4.8 kb Fragment
R607H
Neo
recombined allele
Targeting vector
Cre deleter
Ae1 R607H knock-in allele
D
kb
Ae1+/+
Ae1+/R607H
20
4.8
E
Ae1+/+
Ae1+/R607H
C T A C G A A A G
C T A C A T A A G
L
K
CGA ≈ R
CAT ≈ H
F
G
H
Ae1+/+
Ae1+/R607H
Ae1R607H/R607H

Figure: 1

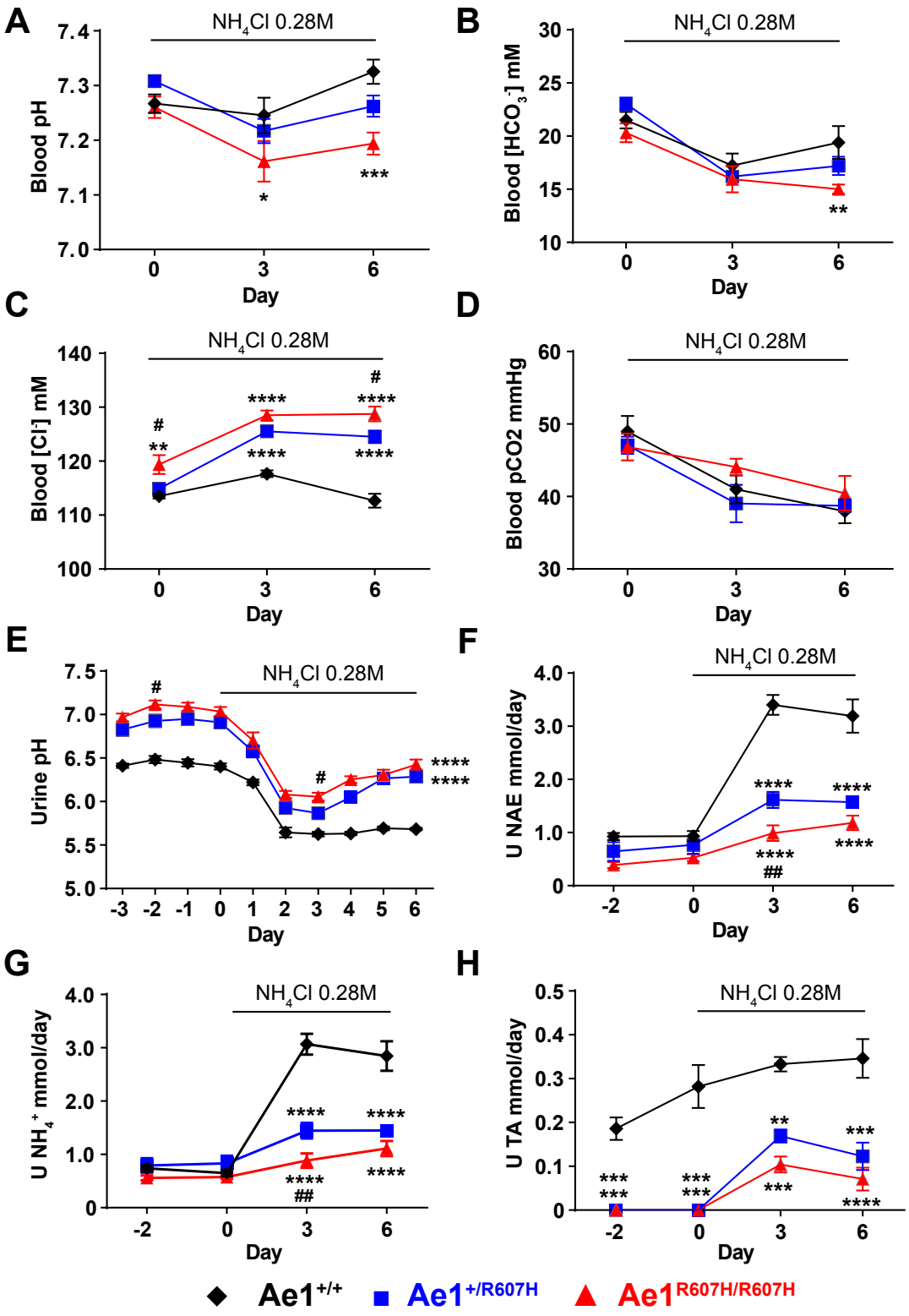

A
NH4Cl 0.28M
Blood pH
Day
B
NH4Cl 0.28M
Blood [HCO3-] mM
Day
C
NH4Cl 0.28M
Blood [Cl-] mM
Day
D
NH4Cl 0.28M
Blood pCO2 mmHg
Day
E
NH4Cl 0.28M
Urine pH
Day
F
NH4Cl 0.28M
U NAE mmol/day
Day
G
NH4Cl 0.28M
U NH4+ mmol/day
Day
H
NH4Cl 0.28M
U TA mmol/day
Day
Ae1+/+
Ae1+/R607H
Ae1R607H/R607H

Figure: 2

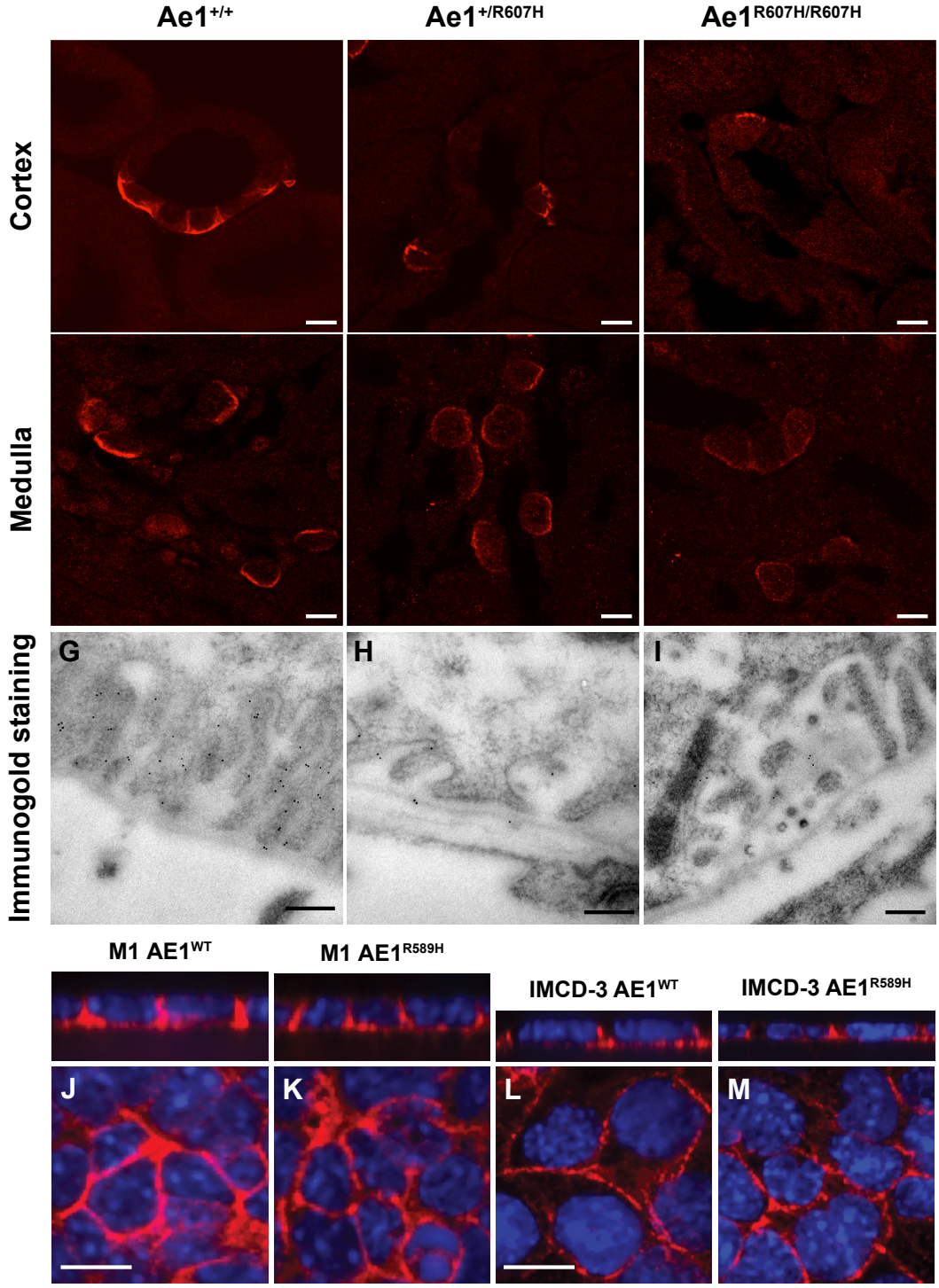

Ae1+/+
Ae1+/R607H
Ae1R607H/R607H
Cortex
Medulla
Immunogold staining
G
H
I
M1 AE1WT
M1 AE1R589H
IMCD-3 AE1WT
IMCD-3 AE1R589H
J
K
L
M

Figure: 3

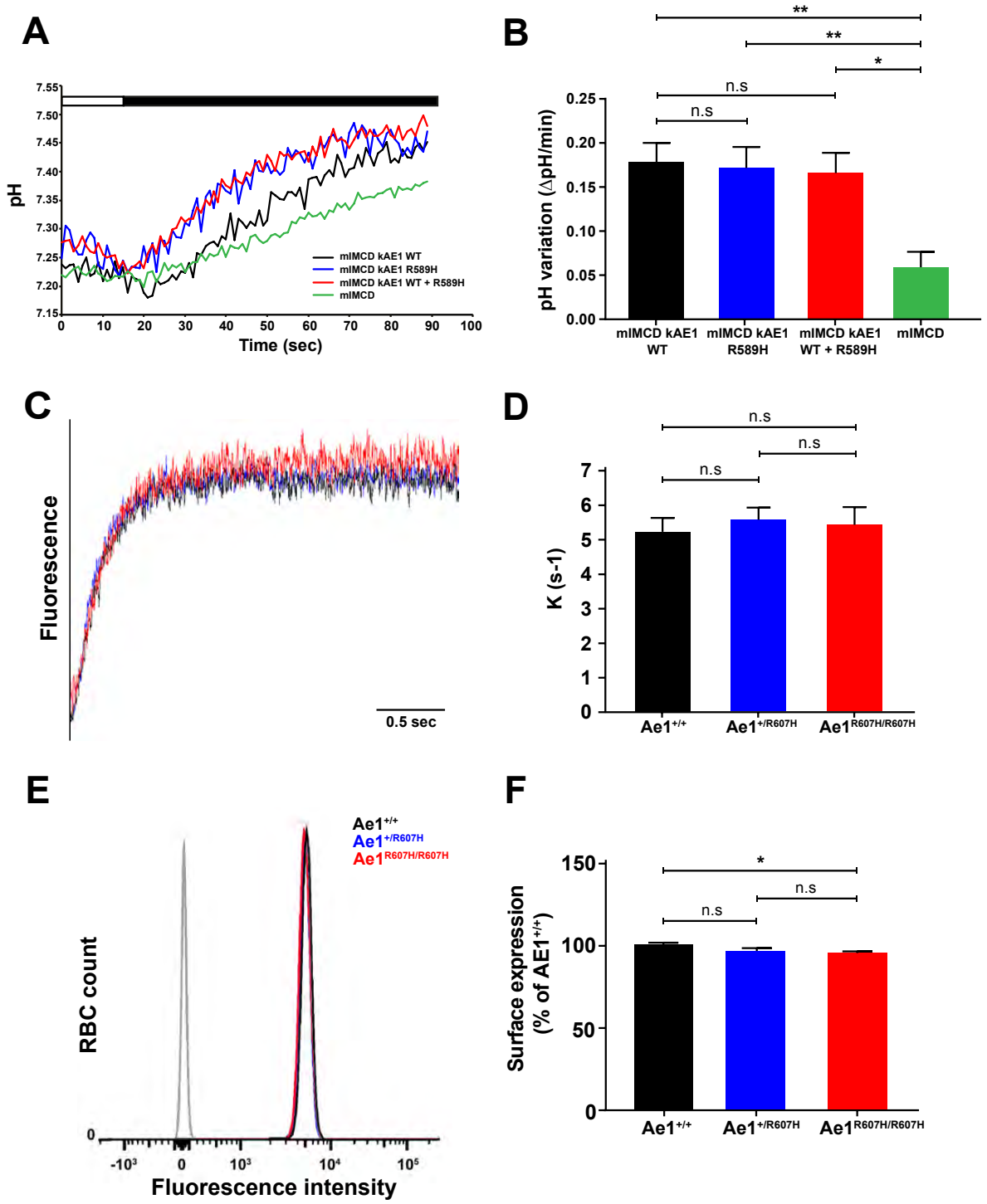

A
pH
Time (sec)
mIMCD kAE1 WT
mIMCD kAE1 R589H
mIMCD kAE1 WT + R589H
mIMCD
B
pH variation (ΔpH/min)
n.s
n.s
**
**
*
mIMCD kAE1 WT
mIMCD kAE1 R589H
mIMCD kAE1 WT + R589H
mIMCD
C
Fluorescence
0.5 sec
D
K (s-1)
n.s
n.s
n.s
Ae1+/+
Ae1+/R607H
Ae1R607H/R607H
E
RBC count
Fluorescence intensity
Ae1+/+
Ae1+/R607H
Ae1R607H/R607H
F
Surface expression (% of AE1+/+)
*
n.s
n.s
Ae1+/+
Ae1+/R607H
Ae1R607H/R607H

Figure: 4

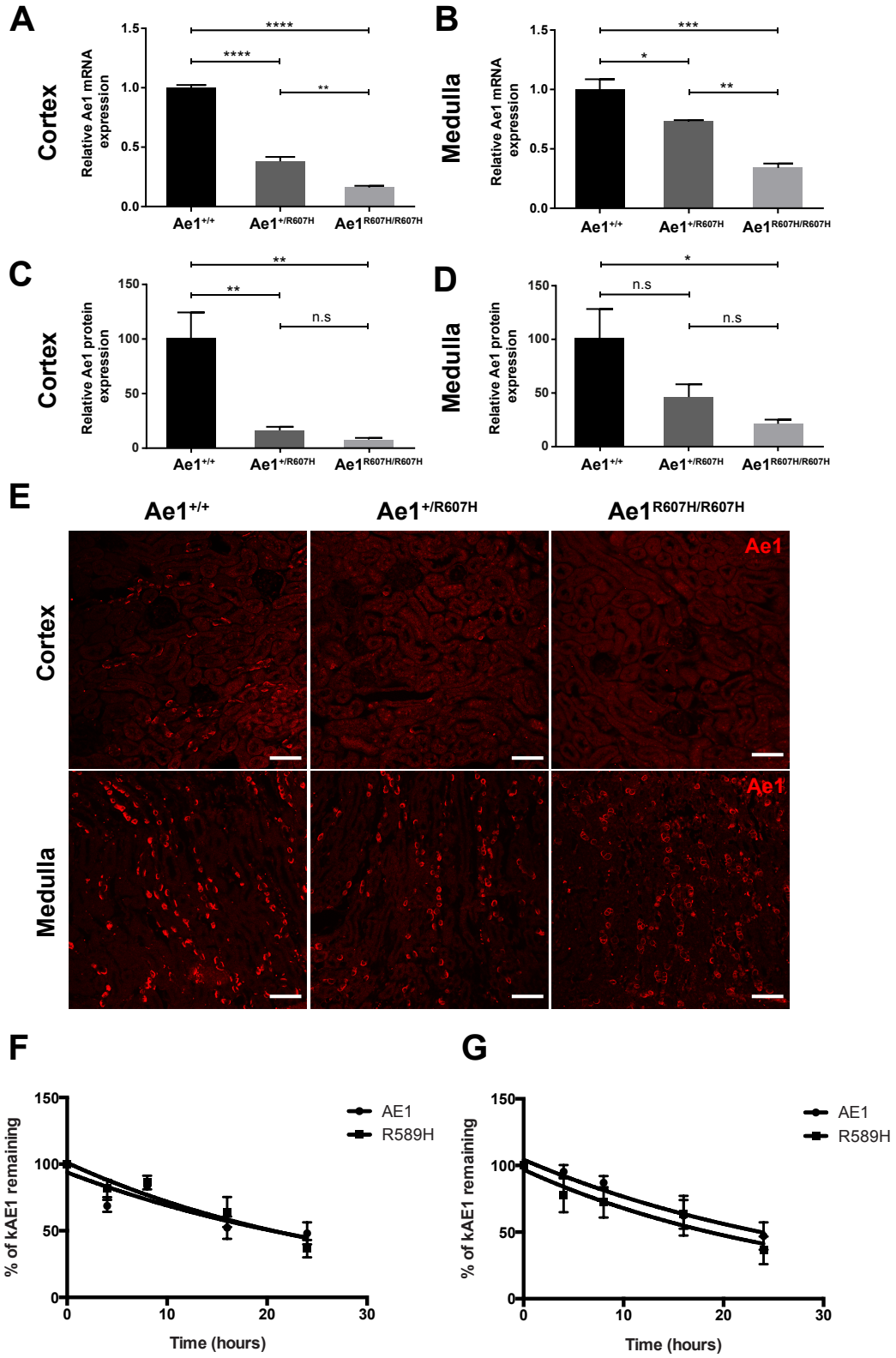

A
Cortex
Relative Ae1 mRNA expression
1.5
1.0
0.5
0.0
****
****
**
Ae1+/+
Ae1+/R607H
Ae1R607H/R607H
B
Medulla
Relative Ae1 mRNA expression
***
*
**
C
Cortex
Relative Ae1 protein expression
150
100
50
0
**
**
n.s
D
Medulla
Relative Ae1 protein expression
*
n.s
n.s
E
Ae1+/+
Ae1+/R607H
Ae1R607H/R607H
Cortex
Medulla
Ae1
F
% of kAE1 remaining
Time (hours)
AE1
R589H
G
% of kAE1 remaining
Time (hours)
AE1
R589H

Figure: 5

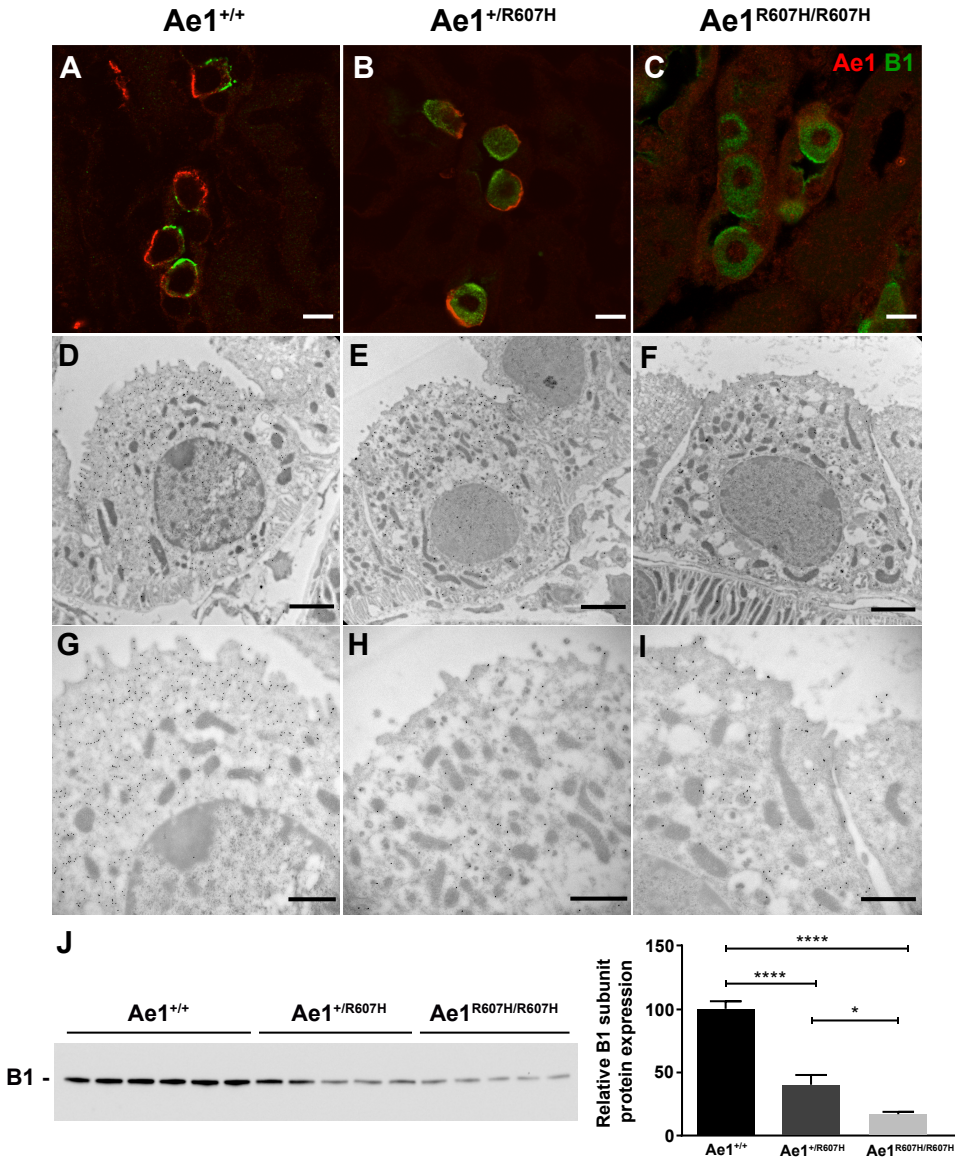

Ae1+/+
Ae1+/R607H
Ae1R607H/R607H
A
B
C
Ae1 B1
D
E
F
G
H
I
J
Ae1+/+
Ae1+/R607H
Ae1R607H/R607H
B1 -
Relative B1 subunit protein expression
150
100
50
0
****
****
*
Ae1+/+
Ae1+/R607H
Ae1R607H/R607H

Figure: 6

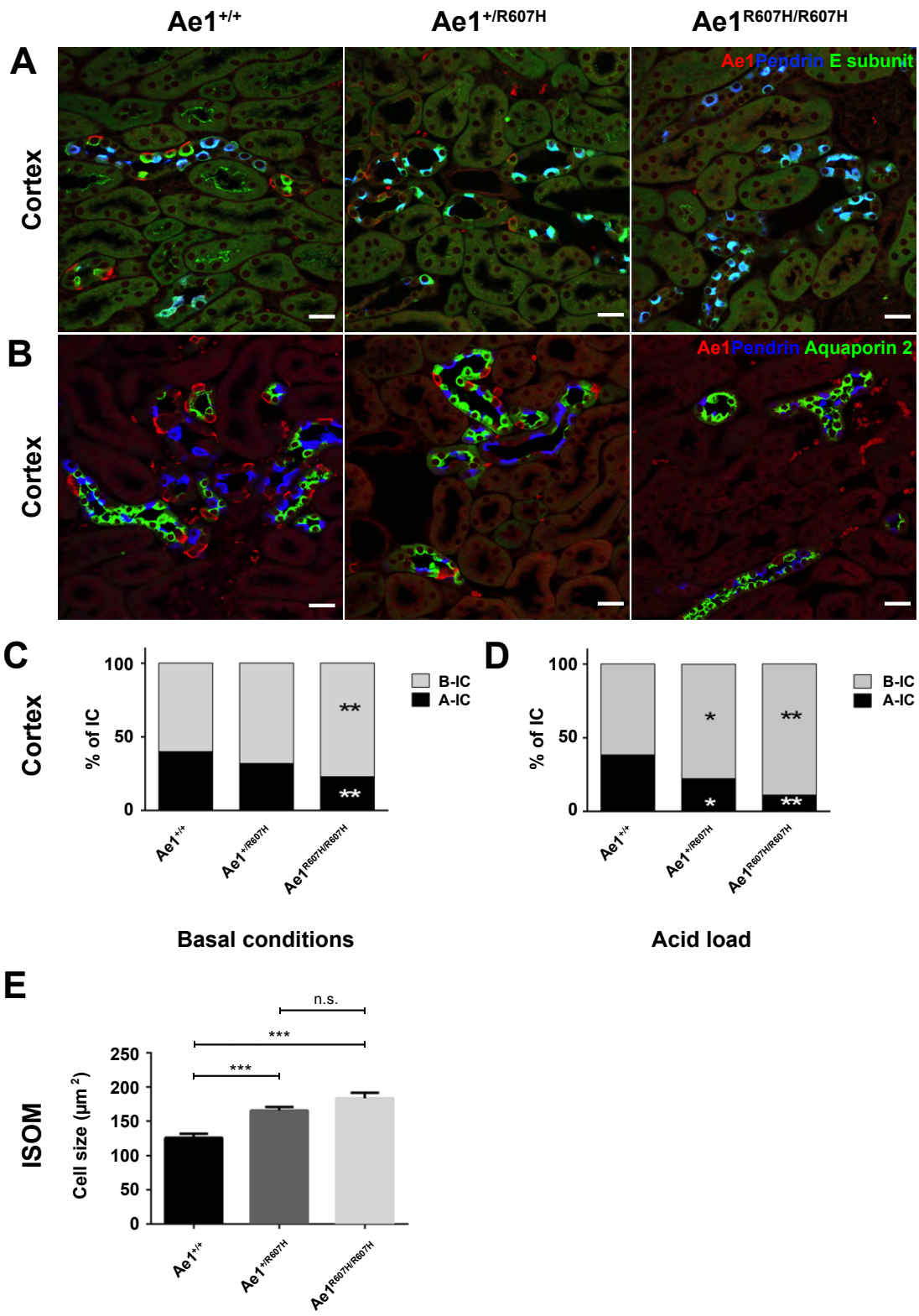

Ae1+/+
Ae1+/R607H
Ae1R607H/R607H
A
Cortex
Ae1 Pendrin E subunit
B
Cortex
Ae1 Pendrin Aquaporin 2
C
Cortex
% of IC
100
50
0
B-IC
A-IC
**
**
Ae1+/+
Ae1+/R607H
Ae1R607H/R607H
Basal conditions
D
% of IC
100
50
0
B-IC
A-IC
*
**
*
**
Ae1+/+
Ae1+/R607H
Ae1R607H/R607H
Acid load
E
ISOM
Cell size (µm2)
250
200
150
100
50
0
n.s.
***
***
Ae1+/+
Ae1+/R607H
Ae1R607H/R607H

Figure: 7

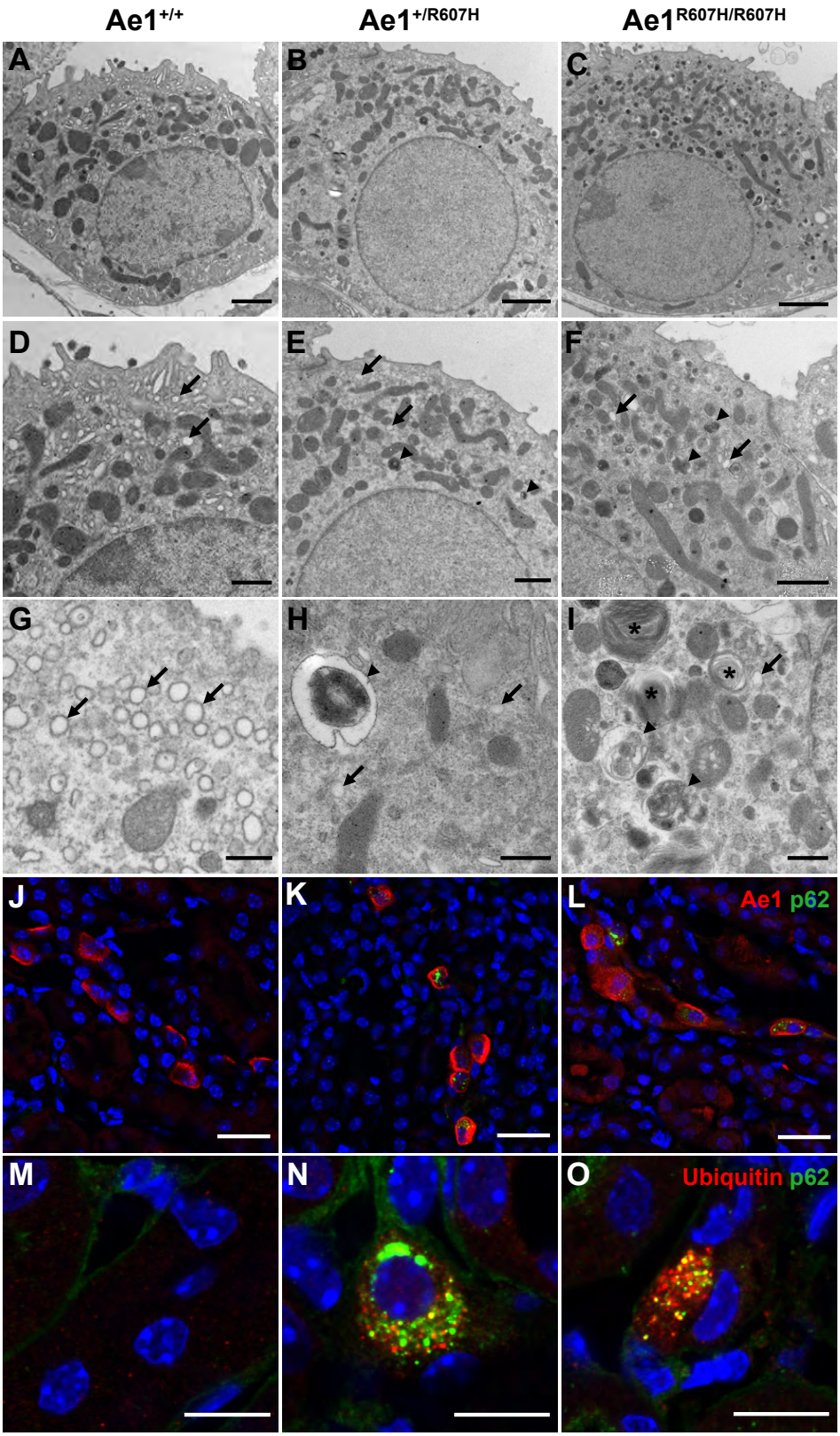

Ae1+/+
Ae1+/R607H
Ae1R607H/R607H
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L
Ae1 p62
M
N
O
Ubiquitin p62

Figure: 8

			$Ae1^{+/+}$		$Ae1^{+/R607H}$		$Ae1^{R607H/R607H}$	
General	**BW**	g	24.45 ± 0.39	(6)	24.11 ± 0.31	(10)	23.76 ± 0.48	(8)
	Food Intake	g/gBW/d	0.17 ± 0.01	(6)	0.17 ± 0.01	(10)	0.17 ± 0.01	(8)
	Water Intake	ml/gBW/d	0.18 ± 0.02	(6)	0.18 ± 0.01	(10)	0.18 ± 0.01	(8)
Blood	**Hct**	%	45 ± 0.65	(13)	45 ± 0.28	(12)	47 ± 0.80	(9)
	Hb	g/dl	15.1 ± 0.16	(9)	15.08 ± 0.16	(13)	15.3 ± 0.36	(15)
	Na^+	mM	146 ± 0.36	(13)	147 ± 0.46	(12)	147 ± 0.47	(9)
	Cl^-	mM	111 ± 0.74	(13)	115 ± 0.77*	(13)	118 ± 1.44****	(13)
	K^+	mM	4.56 ± 0.10	(7)	4.75 ± 0.07	(7)	4.45 ± 0.08	(5)
	Ca^{2+}	mM	1.25 ± 0.01	(13)	1.26 ± 0.01	(13)	1.25 ± 0.01	(12)
	pH		7.32 ± 0.02	(13)	7.32 ± 0.01	(13)	7.29 ± 0.02	(12)
	pCO_2	mmHg	43 ± 1.19	(12)	46 ± 1.16	(12)	43 ± 0.92	(11)
	HCO_3^-	mM	22 ± 0.55	(13)	22 ± 0.44	(12)	21 ± 0.70	(12)
Urine	**Urine Output**	ml/gBW/d	0.075 ± 0.008	(6)	0.069 ± 0.005	(10)	0.065 ± 0.004	(8)
	Urine Osm	mOsm/KgH_2O	3178 ± 383	(6)	2891 ± 246	(10)	2670 ± 108	(8)
	Urine pH		6.45 ± 0.04	(6)	6.95 ± 0.05****	(10)	7.09 ± 0.05****	(8)
	Na^+/Creat	mmol/mmol	17 ± 1.19	(6)	20 ± 0.68	(10)	21 ± 0.93	(8)
	K^+/Creat	mmol/mmol	57 ± 11.69	(6)	63 ± 6.41	(10)	64 ± 5.99	(8)
	Ca^{2+}/Creat	mmol/mmol	0.17 ± 0.02	(6)	0.15 ± 0.01	(10)	0.10 ± 0.01*	(8)

Supplementary Information

Materials and Methods

All animal experiments were approved by the Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz (TLLV) in Germany.

Generation of Ae1^{R607H} knock-in mice

A clone isolated from a 129/SvJ mouse genomic λ library (Stratagene, now Agilent, Santa Clara, CA, USA) was used to construct the targeting vector. A ~13.25 kb fragment including exons 2-18 of the *Ae1* gene was cloned into the pKO-V901 plasmid (Lexicon Genetics, The Woodlands, TX, USA) with a phosphoglycerate kinase (pgk) promoter-driven diphtheria toxin A cassette. A pgk promoter-driven neomycin resistance cassette flanked by loxP sites was inserted into the *Pci*I site of intron 9. The R607H point mutation was introduced by site-directed mutagenesis into a subcloned *Bst*Z17I-*Spe*I fragment (1541 bp) harboring exon 14. The construct was linearized with *Not*I and electroporated into R1 mouse embryonic stem (ES) cells. Neomycin-resistant clones were analyzed by Southern blot using *Hind*III and an external probe of 779 bp (Chromosome 11, 102350002-102350780) was amplified with primers "Ae1_SB1_for" (5'-GTC TAT ATG CAG GCC TTT GTC-3') and "Ae1_SB1_rev" (5'-CAT GAA AAG TGT CCT CCG T-3'). Two correctly targeted ES cell clones were injected into C57BL/6 blastocysts to generate chimeras. Chimeric mice were mated to a cre-Deleter mouse strain to remove the selection cassette (1). Studies were performed in a mixed 129Sv/C57BL/6 background in the F4 and F5 generation. Genotypes were determined by PCR of tail biopsy DNA. For PCR genotyping, the forward primer F1 (5′-TAG CTC CTT CTA CCC CAC CCA-3′) and the reverse primer R1 (5′-CCA GAG GTA CAT GGT AAA ACA TTG TC-3′) were used in a single PCR mix allowing detection of the 189 bp wild-type allele and the 320 bp knock-in (KI) allele. Detection of the introduced point mutation was performed by Sanger sequencing of the 498 bp PCR product amplified by forward primer F1 (5′-GCT CAA GTC AAG GCT TGG ATG G-3′) and reverse primer R1 (5′- CAA GGA TTC TGC TCA TCC GGA-3′).

NH_4Cl loading

We initially planned to study 8 mice of each genotype. However, as insufficient numbers of wild-type mice were available at the time metabolic cage experiments began, we increased the number of heterozygous mice. Thus, n=6 *Slc4a1*$^{+/+}$; n=10 *Slc4a1*$^{R607H/+}$; n=8 *Slc4a1*$^{R607H/R607H}$ 3-month-old male littermates were housed in metabolic cages (Tecniplast, Buguggiate, Italy). Urine was collected daily under mineral oil. After adjustment to metabolic cages and recording of baseline parameters drinking water was supplemented with 0.28 M NH_4Cl for 6 days.

The pH of urine samples was measured with a pH microelectrode (InLab Micro pH, Mettler Toledo, Viroflay, France) and samples were immediately frozen before further analysis. Retro-orbital blood was collected at days 3 and 6 following acid loading and analyzed with the ABL 77 pH/blood-gas analyser (Radiometer, Copenhagen, Denmark). Urinary ammonium and titratable acid was measured by titration with a DL 55 titrator (Mettler Toledo, Viroflay, France). Urine osmolalities were determined by freezing point osmometer (Roebling, Berlin, Germany). Urine creatinine was measured by Jaffé colorimetric method. Urinary Na^+ and K^+ were measured by flame photometry (IL 943; Global Medical Instrumentation, Ramsey, MN, USA). Urine aldosterone was measured via RIA (DPC Dade Behring, now Siemens Healthcare, Erlangen, Germany).

Histology and immunohistochemistry

Kidneys were fixed by retrograde perfusion of the aorta with 4 % PFA in phosphate buffer. Dissected kidneys were washed in ice-cold PBS for 30 minutes and flash frozen in isopentane cooled with liquid nitrogen. 6 µm thick cryosections were subjected to Masson-Goldner stain or von Kossa stain. Kidney sections from a4 knockout mice served as a positive control (2). For immunohistochemistry, cryosections were blocked with goat or donkey serum (3). Sections were incubated overnight at 4°C with primary antibody, washed with PBS, incubated with fluorophore-conjugated secondary antibody, washed with PBS and then mounted with Glycergel mounting medium (DAKO/Agilent, Santa Clara, CA, USA). Each experiment included three mice per group. Representative images were acquired with a Confocal SP8 workstation (Leica, Wetzlar, Germany).

Cell culture

M1 (cortical collecting duct cells, ATCC CRL-2038) and mIMCD-3 cells (ATCC CRL-2123) underwent infection with mouse moloney leukemia virus to induce quasi-stable expression of human kidney anion exchanger 1 (kAE1) WT-myc, of R589H-HA (the human equivalent of R607H), or of both kAE1 WT-myc and kAE1 R589H-HA, as previously described (4). However, despite continued G418 exposure of cell cultures (1 mg/ml for M1 cells; 2 mg/ml for mIMCD-3 cells), kAE1 protein expression declined over a two-to-three week period. For immunostaining, cells were grown for 7 days on semi-permeable filter supports, fixed with 4 % paraformaldehyde, quenched, rinsed, and blocked with 0.1 % Triton X-100, followed by 1 % bovine serum albumin in PBS. Epitope-tagged kAE1 proteins were detected either with mouse anti-myc (Cell Signalling, Danvers, MA, USA) or mouse anti-HA antibodies (Covance, Princeton, NJ, USA), each followed by Cy3-coupled anti-mouse Ig (Jackson ImmunoResearch laboratories, West Grove, PA, USA). Samples were examined with an IX81 microscope (Olympus, Tokyo, Japan) equipped with a Nipkow spinning-disk (Quorum Technologies, Guelph, Canada).

Counting of intercalated and principal cells

Kidney sections were co-stained either for AE1, pendrin, and V-type ATPase E subunit (Atp6v1e1) or for AE1, pendrin, and AQP2. Ten random fields from cortex and inner stripe of the outer medulla (ISOM) were acquired at 20X magnification. Numbers of principal cells (defined by apical expression of AQP2), type A intercalated cells (basolateral AE1 expression), and type B intercalated cells (apical pendrin expression) were counted (n=3 mice per genotype).

Electron microscopy

After perfusion *in situ* with 4 % PFA as above, tissues were shipped in fixative to Boston, where they were further fixed in 2 % glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate pH 7.4 (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA). Tissues were then rinsed in cacodylate buffer and post-fixed in 1 % osmium tetroxide (Electron Microscopy Sciences) in 0.1 M cacodylate buffer for 1 h at room temperature, and then rinsed as above. After washing in double distilled water, the samples were stained, en bloc, in an aqueous solution of 2 % uranyl acetate for 1 h at room temperature. The samples were rinsed in water and dehydrated through a graded

ethanol series to 100 % ethanol, then infiltrated with EPON (Ted Pella Inc., Redding, CA USA) in a solution of 1:1, EPON: 100 % ethanol overnight. They were then placed in fresh EPON for several hours and subsequently embedded in EPON overnight in a 60°C oven. Ultrathin sections were cut on a Leica EMUC7 ultramicrotome (Leica), collected on formvar-coated grids, stained with lead citrate and uranyl acetate, and examined at 80 kV in a JEOL 1011 transmission electron microscope (TEM; JEOL, Peabody, MA, USA). Images were acquired using an AMT digital imaging system (Advanced Microscopy Techniques, Danvers, MA, USA).
For immunogold staining, samples fixed in 4 % paraformaldehyde alone were embedded in LRWhite resin as previously described (5). Ultrathin sections were incubated 2 h with anti-AE1 or V-type ATPase antibodies (6), rinsed, and incubated 45 min with gold-labeled goat anti-guinea-pig Ig (Ted Pella). Sections were rinsed again in PBS and counterstained with lead citrate and uranyl acetate before imaging as above in the JEOL 1001 TEM.

Immunoblotting

Mice were perfused transcardially with PBS at RT. Perfused kidneys were placed in ice-cold PBS and homogenized in ice-cold isolation buffer (250 mM sucrose, 20 mM Tris-Hepes, pH 7.4) supplemented with protease inhibitor cocktail (Complete; Roche Diagnostics, Risch-Rotkreuz, Switzerland) and phosphatase inhibitor cocktail (PhosSTOP; Roche Diagnostics). Cellular debris was removed by centrifugation at 4,000 g for 15 min at 4°C. Membrane-enriched fractions were prepared by centrifugation at 17,000 g for 30 min at 4°C. Protein concentration was determined using the Bradford protein assay (microBradford, BioRad, Hercules, CA, USA). Total homogenates and membrane-enriched fractions were prepared with 6x SDS-loading buffer (0.375 mM Tris-HCl pH 6.8, 12 % SDS, 0.6 M dithiothreitol, 60 % glycerol and bromophenol blue) and incubated 30 min at room temperature. 15-30 µg of protein were loaded on 10 % polyacrylamide gels (XCell *SureLock* Mini-cell; Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) separated and blotted onto a nitrocellulose membrane. Membranes were blocked with 5 % milk in TBS and incubated overnight at 4°C with the primary antibody. The secondary horseradish-conjugated anti-Ig antibody was incubated on membranes for 2 h at RT, detected with Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), and analyzed by LAS 4000 ImageQuant (GE Healthcare, Little Chalfont, UK).

Half-life measurement

M1 or mIMCD-3 cells expressing kAE1 WT-myc or kAE1 R589H-HA were plated to sub-confluency on 6-well plates, then incubated 0, 4, 8, 16 or 24h with 10 µg/ml cycloheximide in DMEM:F12 culture medium supplemented with 10 % fetal bovine serum and 1 mg/ml penicillin/streptomycin. Cells were lysed in PBS containing 1 % Triton X-100, 1 µg/ml aprotinin, 2 µg/ml leupeptin, 1 µg/ml pepstatin A, and 100 µg/ml PMSF. kAE1 polypeptides were subjected to immunoblot analysis using mouse anti-HA or anti-myc antibody, followed by horseradish peroxidase-coupled anti-mouse Ig (Cell Signaling). Bound peroxidase was detected by enhanced chemiluminescence (ECL Prime; GE Healthcare) and relative band intensities were analyzed with ImageJ.

AE1-mediated transport activity in red blood cells by stopped-flow analysis

200 µl mouse blood was washed three times in PBS. Washed red blood cells were resuspended in 32 ml hypotonic lysis buffer (7 mM KCl, 10 mM Hepes/KOH, pH 7.2) for 40 min on ice, followed by resealing for 1h at 37°C in resealing buffer (100 mM KCl, 10 mM Hepes/KOH, pH 7.2, 1 mM $MgCl_2$ and 2 mg/ml bovine carbonic anhydrase) containing 0.15 mM of the fluorescent pH sensitive dye pyranine (1-hydroxypyrene-3,6,8-trisulfonic acid, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). After three washes in ice-cold incubation buffer (100 mM KCl, 10 mM Hepes/KOH, pH 7.2), resealed ghosts were kept on ice until stopped-flow experiments were performed (7) at 30°C (SFM400; Bio-logic, Grenoble, France). Excitation was at 465 nm and emitted light was filtered with a 520 nm cut-off filter. For measurement of HCO_3^-/Cl^- exchange activity, dye-loaded ghosts resuspended in 3 ml “chloride buffer” (100 mM KCl and 10 mM HEPES/KOH pH 7.2) were rapidly mixed with an equal volume of bicarbonate buffer (100 mM $KHCO_3$ and 10 mM HEPES/HCl pH 7.2), generating an inwardly directed HCO_3^-/CO_2 gradient of 50 mEq/L and an outwardly directed Cl^- gradient of equal magnitude. Data from six-to-eight time courses were averaged and fit to a mono-exponential function using the simplex procedure of Biokine software (Bio-logic).

Surface AE1 expression on erythrocytes was determined by immunostaining with an anti-Diego b (Dib) antibody followed by flow cytometric analysis on a FACSCanto II flow cytometer (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Secondary antibodies were goat anti-human PE-conjugated F(ab')2 fragments (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Results were analysed using FlowJo software (FlowJo, Ashland, OR, USA).

AE1 transport in mIMCD-3 cells

mIMCD-3 cells expressing either kAE1 WT, R589H, or WT and R589H mutant were grown on glass coverslips to 70 % confluence. AE1 transport activity was measured using BCECF-AM (Sigma-Aldrich) as described previously (8). After washing with serum-free OptiMEM medium (Gibco/ Thermo Fisher), coverslips were incubated with 10 µM BCECF-AM (Sigma-Aldrich) for 10min at 37°C. Coverslips were then placed in fluorescence cuvettes and the cells were perfused at room temperature with: 5 mM glucose, 5 mM K^+ gluconate, 1 mM Ca^{2+} gluconate, 1 mM $MgSO_4$, 10 mM Hepes, 2.5 mM NaH_2PO_4, 25 mM $NaHCO_3$, 140 mM chloride, followed by a chloride-free medium containing 140 mM gluconate to induce intracellular alkalization. Solutions were continuously bubbled with 5 % CO_2. Using a PTI fluorimeter (Photon Technologies International (PTI), Edison, NJ, USA), fluorescence was excited at 440 and 490 nm, and fluorescence emission was recorded at 510 nm. Intracellular BCECF fluorescence was calibrated with buffers at pH values of 6.5, 7.0, or 7.5, each containing 100 µM nigericin sodium salt. Cellular anion exchange rates were determined by linear regression of the initial 60 s of fluorescence perturbation, and normalized to pH calibration measurements, using FelixGX 4.1.0 software (PTI). Results represent $\geq$ 3 independent experiments.

Reverse transcription and quantitative PCR

Total RNA (2 µg from renal cortex or medulla; 5 µg from liver) was reverse-transcribed with SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) as described previously (9). Duplicate qPCR reactions were perfomed with SsoFast EvaGreen Supermix (BioRad, Hercules, CA, USA) using a CFX96 Touch Real-Time PCR Cycler (BioRad). Primer sequences were "flAe1_for" (5'-CCCCATACACCATCCTCTC-3', "flAe1_rev" (5'-CGGTTATGCGCCATGGA-3'), and the ActB Quantitect Primer Assay QT01136772 (Qiagen, Hilden, Germany)

Antibodies

Primary antibodies use in this study: rabbit anti-pendrin (10) (1:10,000); rabbit anti-Atp6v1b1 subunit (11) (1:30,000); chicken anti-Atp6v1e1 subunit (12) (1:500); rabbit anti-Atp6v0a4 subunit (6) (1:500); guinea pig anti-AE1 (6) (1:5,000); guinea pig anti-pendrin (6) (1:1000); goat anti-AQP2 (C-17; Santa Cruz, Dallas, TX, USA) (1:1,000); sheep anti-CA2 (AHP206; Serotec, Kidlington, UK) (1:500); anti-Diego b (1:4) human monoclonal antibodies were kindly donated by Dr. M. Uchikawa, Japanese Red Cross Central Blood Center, Tokyo; mouse anti-HA (Covance, Princeton, NJ, USA) (1:500 for immunofluorescence and 1:1,500 for immunoblots); mouse anti-myc (Cell Signalling, Danvers, MA, USA) (1:500 for immunofluorescence and 1:1,500 for immunoblots); anti-mouse coupled to HRP (Cell signalling, Danvers, MA, USA) (1:10,000).

Secondary antibodies used in this study: goat anti-rabbit Alexa 555 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) (1:2000); goat anti-rabbit Alexa 488 (Invitrogen) (1:2000); goat anti guinea pig Alexa 555 (Invitrogen) (1:2000); goat anti guinea pig Alexa 488 (Invitrogen) (1:2000).

Cell surface measurements

The cell surface of type A intercalated cells (basolateral AE1 and apical B1 subunit localization) was determined in the inner stripe of the outer medulla with ImageJ. Briefly, a grid of arbitrary size was placed on immunohistochemistry pictures and the stained cell area within each grid was calculated as a ratio of unit grid. To avoid biased measurements of type A intercalated cells 5 different randomly selected grid sizes were applied and the mean calculated (13). In total, type A intercalated cells of 2 different mice per genotype were measured. Cortical type A intercalated cells were not measured due to weak staining in heterozygous and homozygous Ae1-R607H knock-in mice.

Statistics

The three genotype groups were compared by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test. P-value < 0.05 was considered significant.

Supplementary Figures

Supplementary Figure 1. After 3 days under standard conditions to determine baseline values, *Ae1*$^{+/+}$ (n=6; diamond), *Ae1*$^{+/R607H}$ (n=10; square) and *Ae1*$^{R607H/R607H}$ (n=8; triangle) mice were acid-challenged for 6 days with 0.28 M NH_4Cl in drinking water. Body weight (**A**), water intake (**B**), and food intake (**C**) for WT, *Ae1*$^{+/R607H}$ and *Ae1*$^{R607H/R607}$ mice. Data are presented as mean ± SEM. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001 indicated for *Ae1*$^{+/R607H}$ or *Ae1*$^{R607H/R607H}$ vs. *Ae1*$^{+/+}$, other data points not significant, *Ae1*$^{+/R607H}$ vs. *Ae1*$^{R607H/R607H}$ no significant difference at any time point (Two-way ANOVA).

Supplementary Figure 2. Grey scaled images of the immunofluorescence stainings displayed in Figure 2. Scale bars: 10 µm.

Supplementary Figure 3. (**A**) Coomassie blue stained gel of RBC lysates from WT (n=4), *Ae1*$^{+/R607H}$ (n=5), and *Ae1*$^{R607H/R607H}$ (n=5) mice (**B**) Quantification of Ae1 protein expression normalized to actin. No significant differences between genotypes.

Supplementary Figure 4. Representative western blots for Ae1 protein abundance in protein lysates from cortex (**A**) and medulla (**B**) of WT, *Ae1*$^{+/R607H}$ and *Ae1*$^{R607H/R607}$ mice.

Supplementary Figure 5. Representative western blot for pulse-chase experiments. (**A**) M1 cells transfected with human kAE1-WT. (**B**) M1 cells transfected with human kAE1-R589H. (**C**) mIMCD-3 cells transfected with human kAE1-WT. (**D**) mIMCD-3 cells transfected with human kAE1-R589H. Unfilled circles indicate non-glycosylated protein; filled circles indicate glycosylated protein.

Supplementary Figure 6. Merged channels (**A-C**) for co-immunostainings for the Ae1 (**D-F**) and the B1 subunit of the V-type ATPase (**G-I**) in inner stripe of outer medulla under baseline conditions. Single channels for Ae1. (**G-I**) Single channel for B1. Scale bars: 10 µm.

Supplementary Figure 7. Merged channels (**A-C**) for co-immunostainings for the Ae1 (**D-F**) and the B1 subunit of the V-type ATPase (**G-I**) in inner stripe of outer medulla under acid challenge. Single channels for Ae1. (**G-I**) Single channel for B1. Scale bars: 10 µm.

Supplementary Figure 8. Immunogold labelling of the A subunit of the V-type ATPase in type B intercalated cells in the cortex. (**A-C**) Overview from WT, *Ae1*$^{+/R607H}$ and *Ae1*$^{R607H/R607H}$ mice. Scale bar: 2 µm. (**D-F**) Magnification of the basolateral cell pole. Scale bar: 1 µm (**G-I**) Magnification of the apical cell pole. Scale bar: 1 µm.

Supplementary Figure 9. (**A-C**) Renal cortex showing merged channels of the co-staining for Ae1 (red), Pendrin (blue), and the E-subunit (green) of the V-type ATPase. (**D-F**) Single channels for Ae1. (**G-I**) Single channels for the E subunit. (**J-L**) Single channels for Pendrin. Scale bars: 25 µm.

Supplementary Figure 10. (**A-C**) Renal cortex showing merged channels of the co-staining for Ae1 (red), Pendrin (blue), and Aquaporin 2 (green). (**D-F**) Single channels for Ae1. (**G-I**) Single channels for Aquaporin 2. (**J-L**) Single channels for Pendrin. Scale bars: 25 µm.

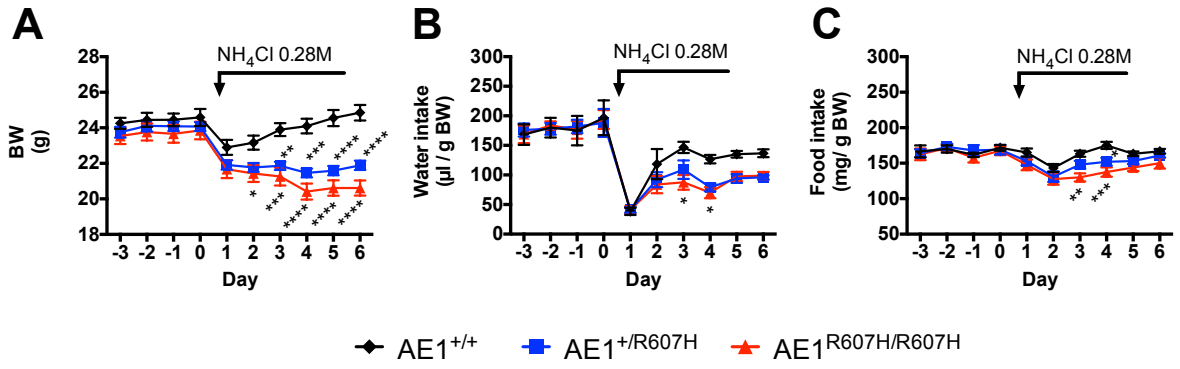
Supplementary Figure 11. (**A-C**) Renal cortex showing merged channels of the co-staining for Ae1 (red), p62 (green), and DAPI (blue). (**D-F**) Single channels for Ae1. (**G-I**) Single channels for p62. (**J-L**) Single channels for DAPI. Scale bars: 25 µm.

Supplementary Figure 12. (**A-C**) Renal medulla showing merged channels of the co-staining for Ae1 (red), p62 (green), and DAPI (blue). (**D-F**) Single channels for Ae1. (**G-I**) Single channels for p62. (**J-L**) Single channels for DAPI. Scale bars: 25 µm.

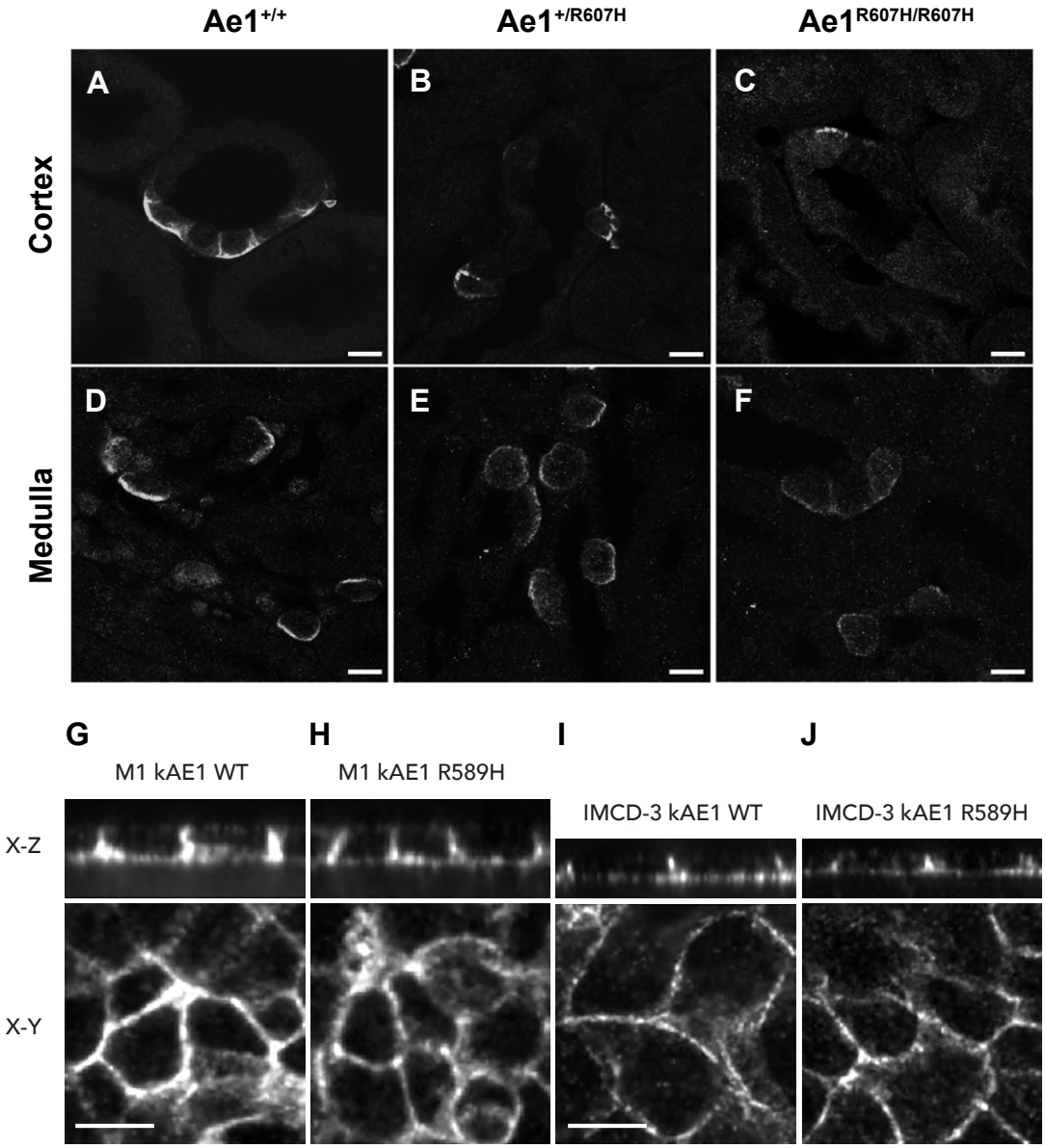
Supplementary Figure 13. (**A-C**) Renal cortex showing merged channels of the co-staining for Ubiquitin (red), p62 (green), and DAPI (blue). (**D-F**) Single channels for Ubiquitin. (**G-I**) Single channels for p62. (**J-L**) Single channels for DAPI. Scale bars: 10 µm.

Supplementary References

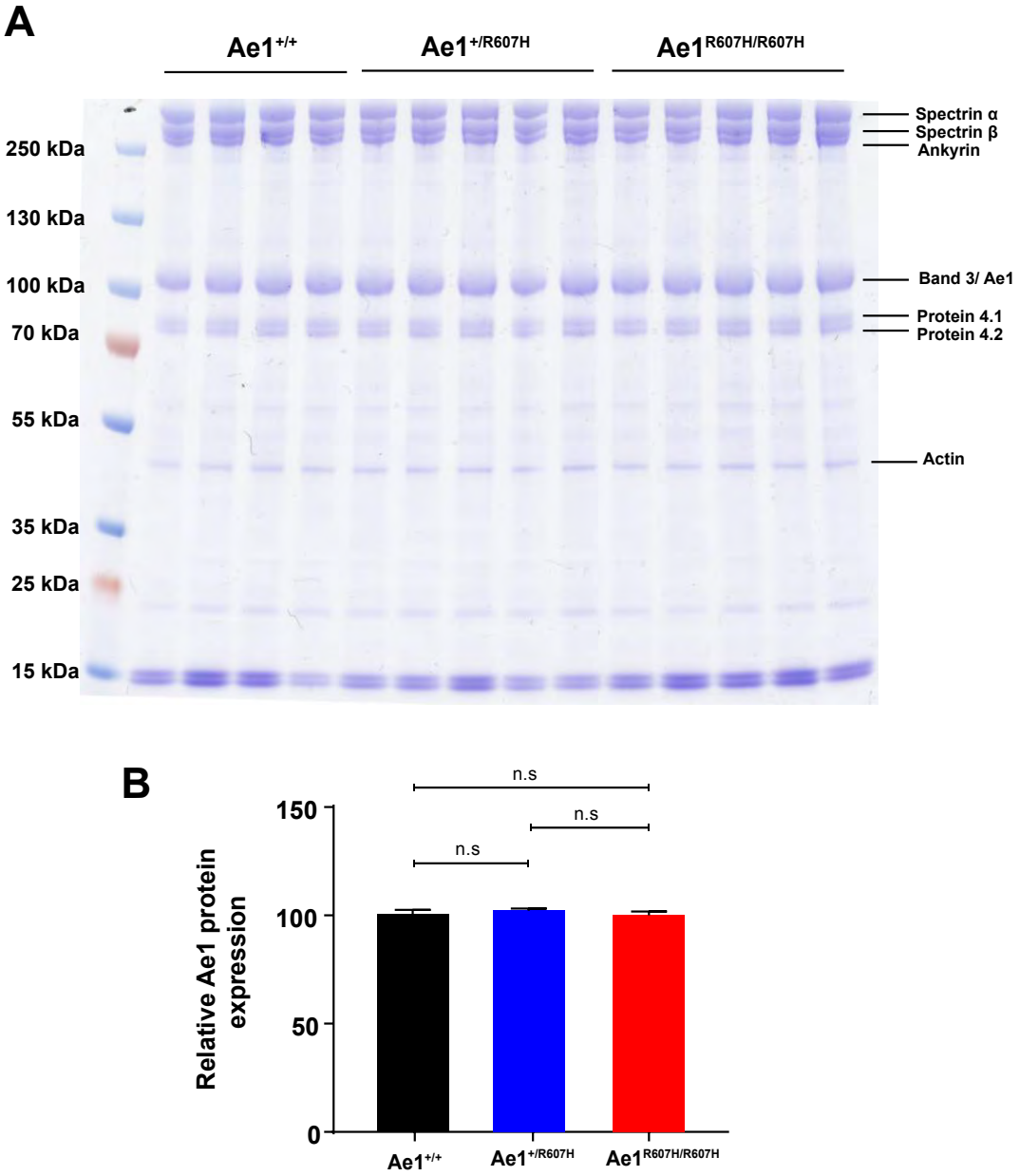
1. Schwenk F, Baron U, and Rajewsky K. A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells. *Nucleic acids research.* 1995;23(24):5080-1.
2. Hennings JC, Picard N, Huebner AK, Stauber T, Maier H, Brown D, Jentsch TJ, Vargas-Poussou R, Eladari D, and Hubner CA. A mouse model for distal renal tubular acidosis reveals a previously unrecognized role of the V-ATPase a4 subunit in the proximal tubule. *EMBO molecular medicine.* 2012;4(10):1057-71.
3. Sinning A, Liebmann L, Kougioumtzes A, Westermann M, Bruehl C, and Hubner CA. Synaptic glutamate release is modulated by the Na+ -driven Cl-/HCO(3)(-) exchanger Slc4a8. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 2011;31(20):7300-11.
4. Cordat E, Kittanakom S, Yenchitsomanus PT, Li J, Du K, Lukacs GL, and Reithmeier RA. Dominant and recessive distal renal tubular acidosis mutations of kidney anion exchanger 1 induce distinct trafficking defects in MDCK cells. *Traffic.* 2006;7(2):117-28.
5. Paunescu TG, Ljubojevic M, Russo LM, Winter C, McLaughlin MM, Wagner CA, Breton S, and Brown D. cAMP stimulates apical V-ATPase accumulation, microvillar elongation, and proton extrusion in kidney collecting duct A-intercalated cells. *American journal of physiology Renal physiology.* 2010;298(3):F643-54.
6. Stehberger PA, Shmukler BE, Stuart-Tilley AK, Peters LL, Alper SL, and Wagner CA. Distal renal tubular acidosis in mice lacking the AE1 (band3) Cl-/HCO3- exchanger (slc4a1). *Journal of the American Society of Nephrology : JASN.* 2007;18(5):1408-18.
7. Frumence E, Genetet S, Ripoche P, Iolascon A, Andolfo I, Le Van Kim C, Colin Y, Mouro-Chanteloup I, and Lopez C. Rapid Cl(-)/HCO(-)(3)exchange kinetics of AE1 in HEK293 cells and hereditary stomatocytosis red blood cells. *American journal of physiology Cell physiology.* 2013;305(6):C654-62.
8. Sterling D, and Casey JR. Transport activity of AE3 chloride/bicarbonate anion-exchange proteins and their regulation by intracellular pH. *The Biochemical journal.* 1999;344 Pt 1(221-9.
9. Rust MB, Faulhaber J, Budack MK, Pfeffer C, Maritzen T, Didie M, Beck FX, Boettger T, Schubert R, Ehmke H, et al. Neurogenic mechanisms contribute to hypertension in mice with disruption of the K-Cl cotransporter KCC3. *Circulation research.* 2006;98(4):549-56.
10. Knauf F, Yang CL, Thomson RB, Mentone SA, Giebisch G, and Aronson PS. Identification of a chloride-formate exchanger expressed on the brush border membrane of renal proximal tubule cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2001;98(16):9425-30.
11. Vallet M, Picard N, Loffing-Cueni D, Fysekidis M, Bloch-Faure M, Deschenes G, Breton S, Meneton P, Loffing J, Aronson PS, et al. Pendrin regulation in mouse kidney primarily is chloride-dependent. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN.* 2006;17(8):2153-63.
12. Breton S, Wiederhold T, Marshansky V, Nsumu NN, Ramesh V, and Brown D. The B1 subunit of the H+ATPase is a PDZ domain-binding protein. Colocalization with NHE-RF in renal B-intercalated cells. *The Journal of biological chemistry.* 2000;275(24):18219-24.
13. West MJ. Estimating volume in biological structures. *Cold Spring Harbor protocols.* 2012;2012(11):1129-39.



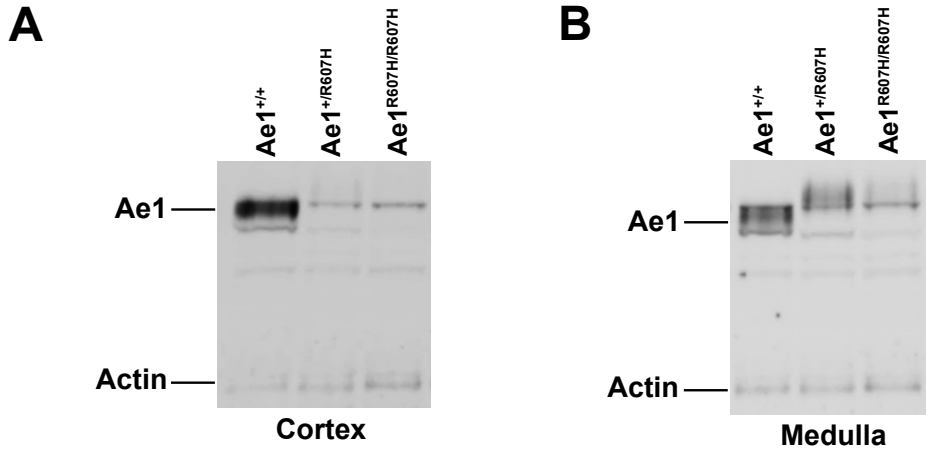
Supplementary Figure: 1



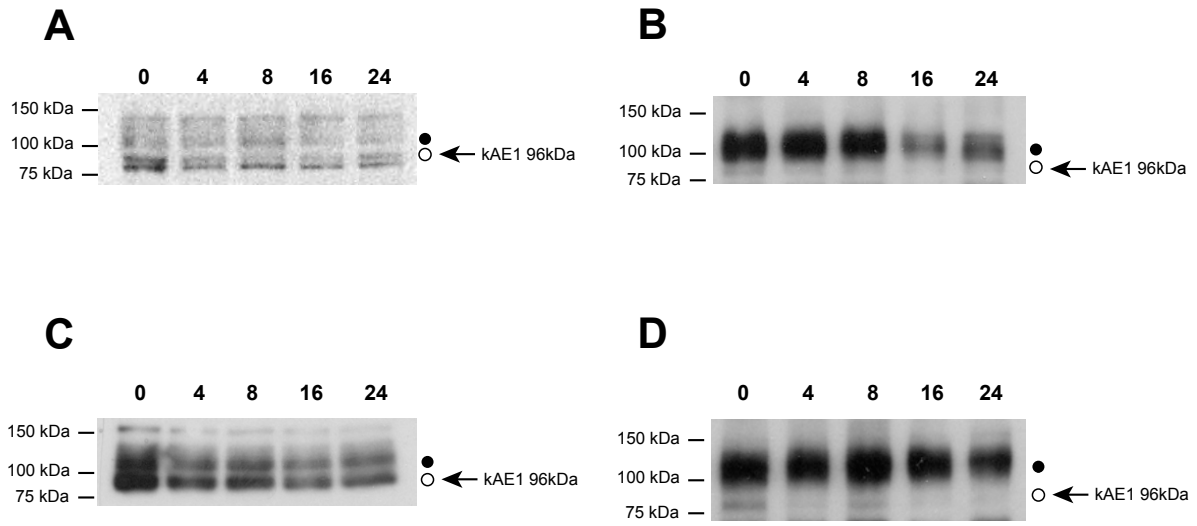
Supplementary Figure: 2



Supplementary Figure: 3

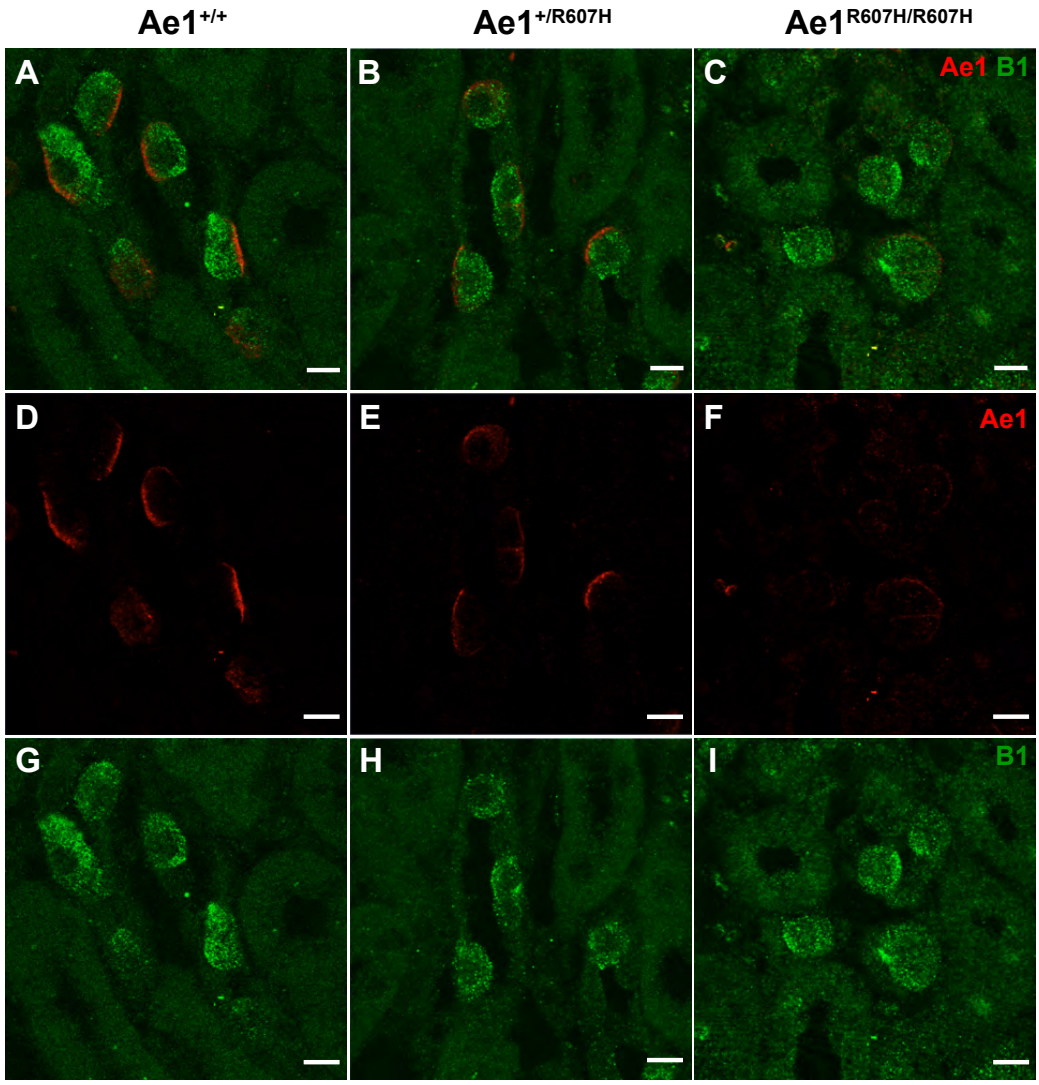


Supplementary Figure: 4

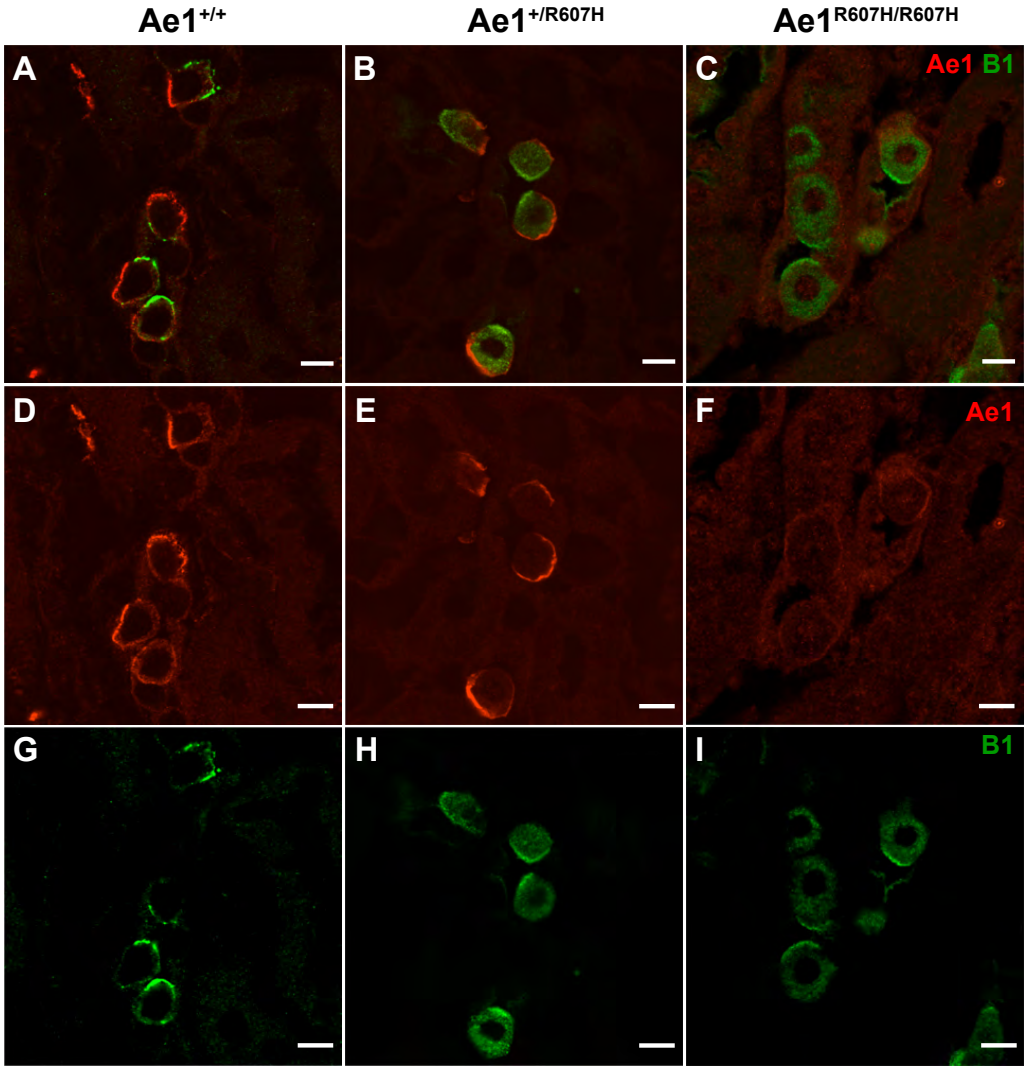


Supplementary Figure: 5

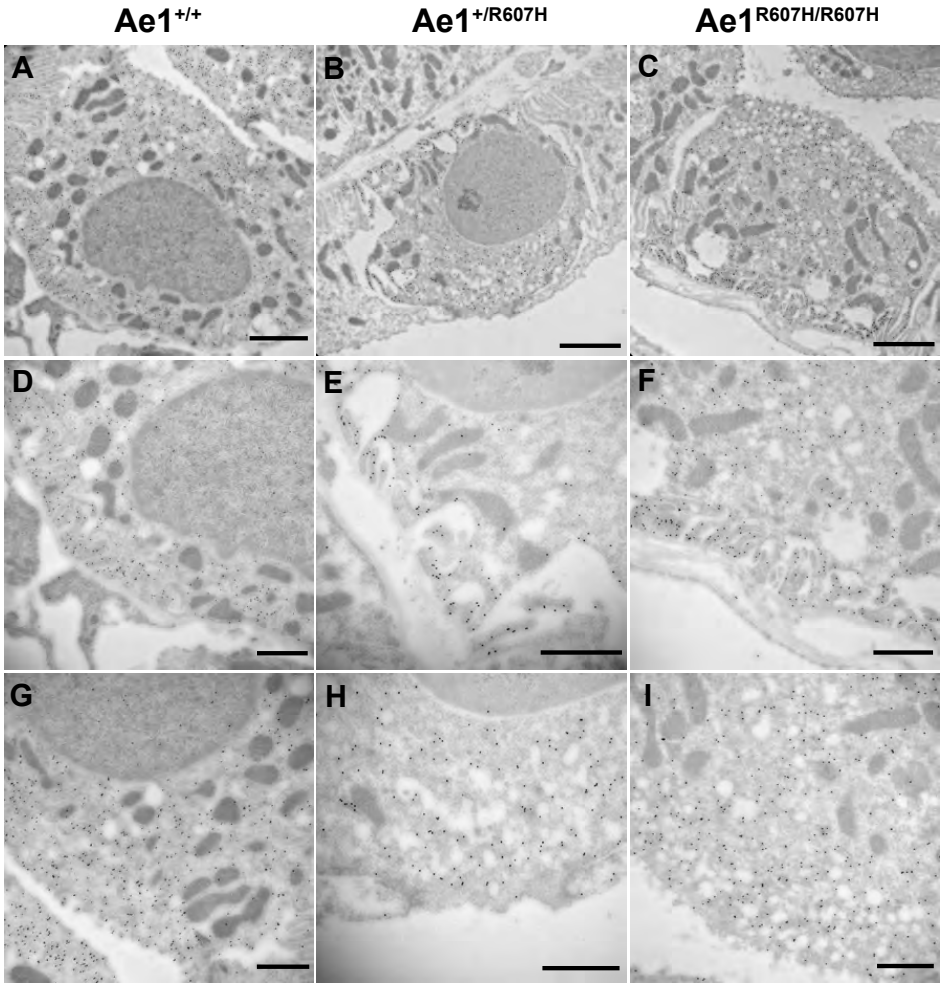
A M1 AE1-WT
B M1 AE1-R589H
C mIMCD3 AE1-WT
D mIMCD3 AE1-R589H



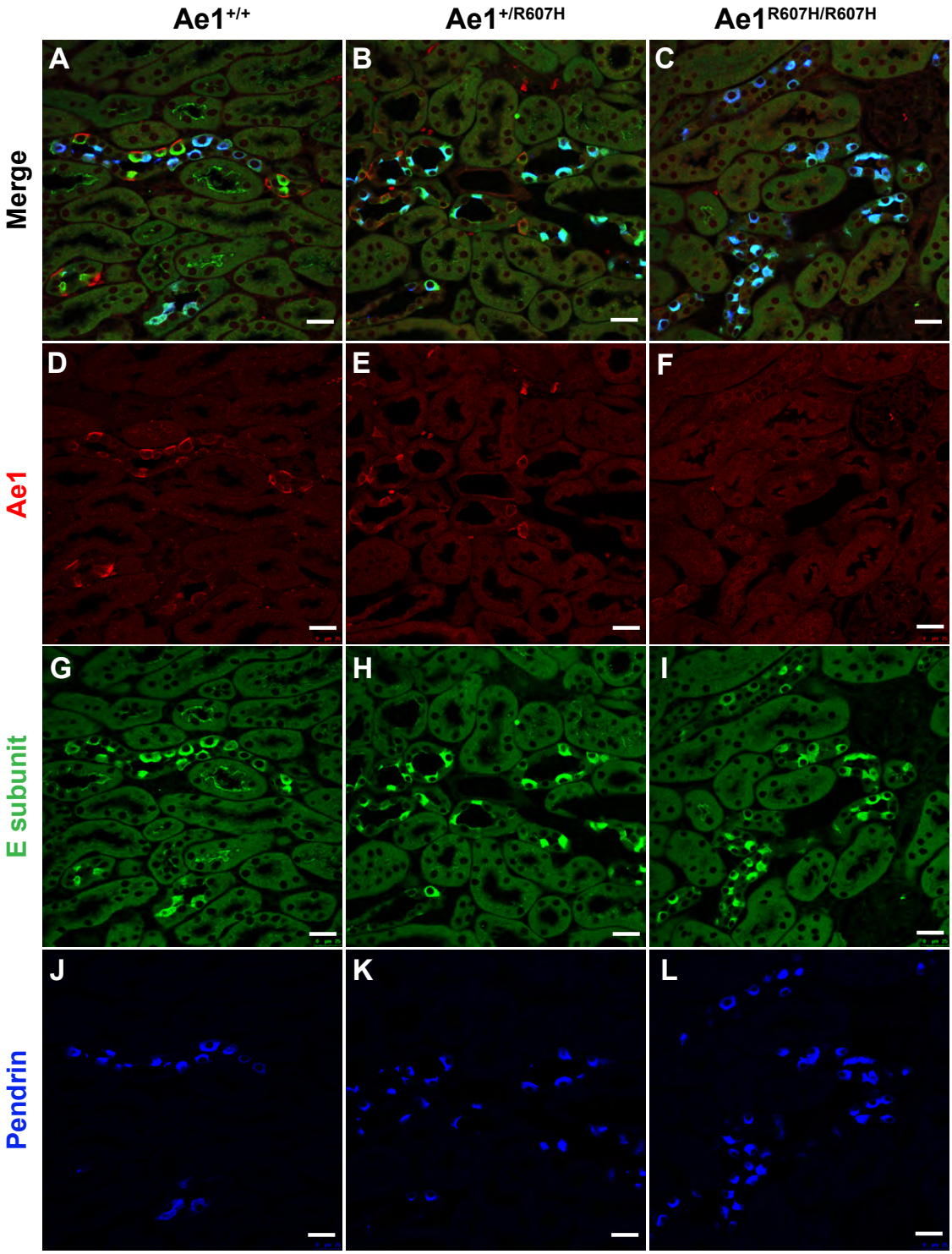
Supplementary Figure: 6



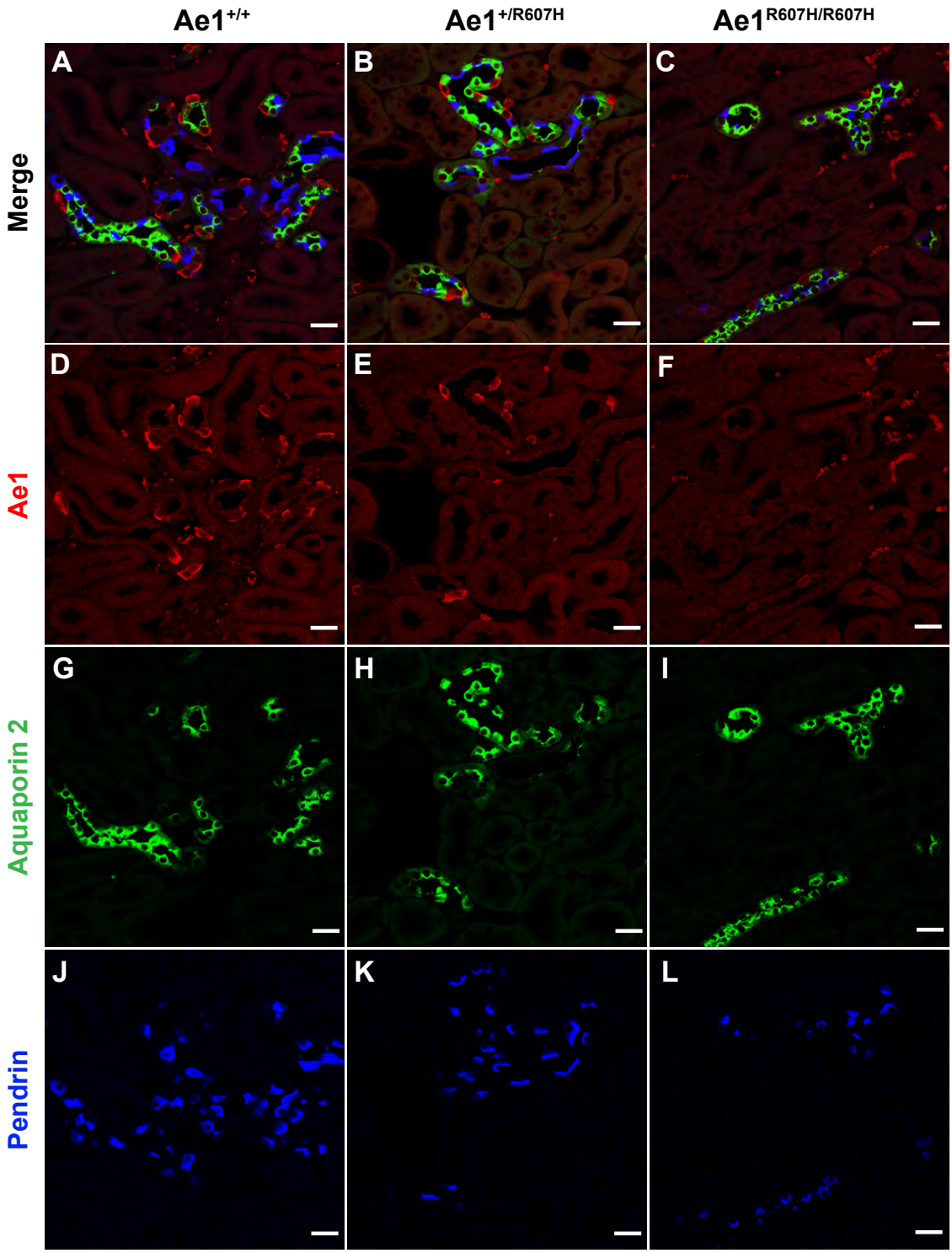
Supplementary Figure: 7



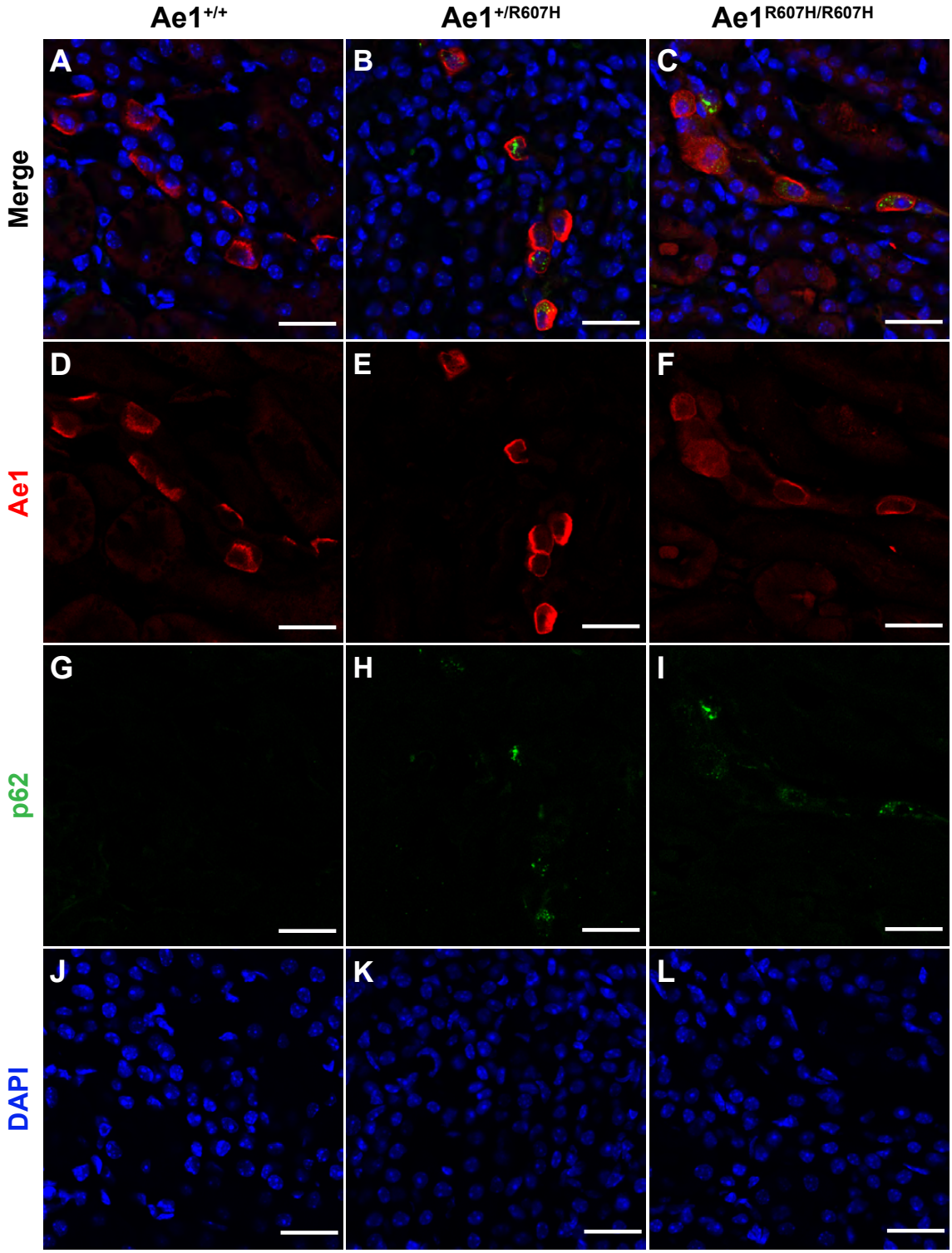
Supplementary Figure: 8



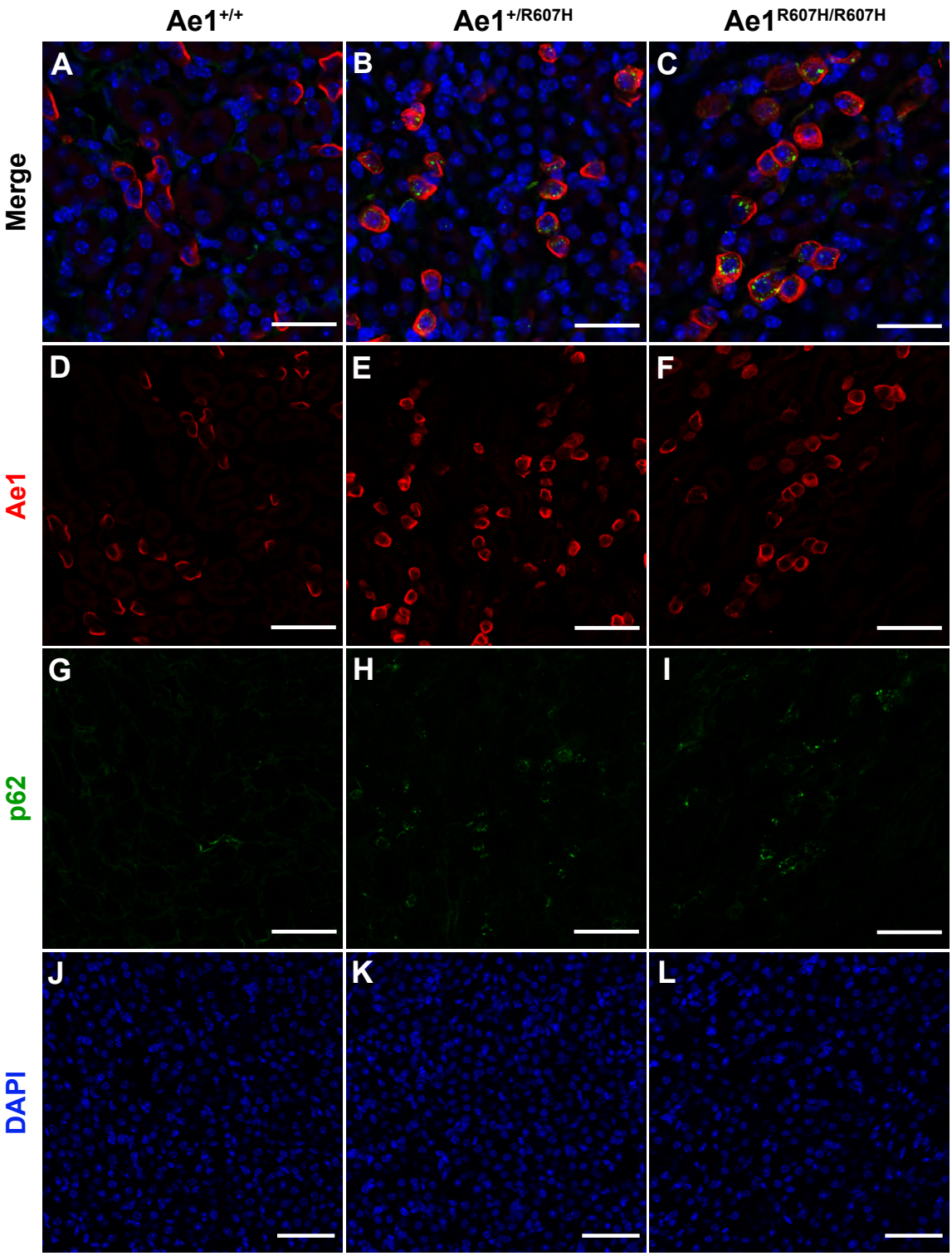
Supplementary Figure: 9



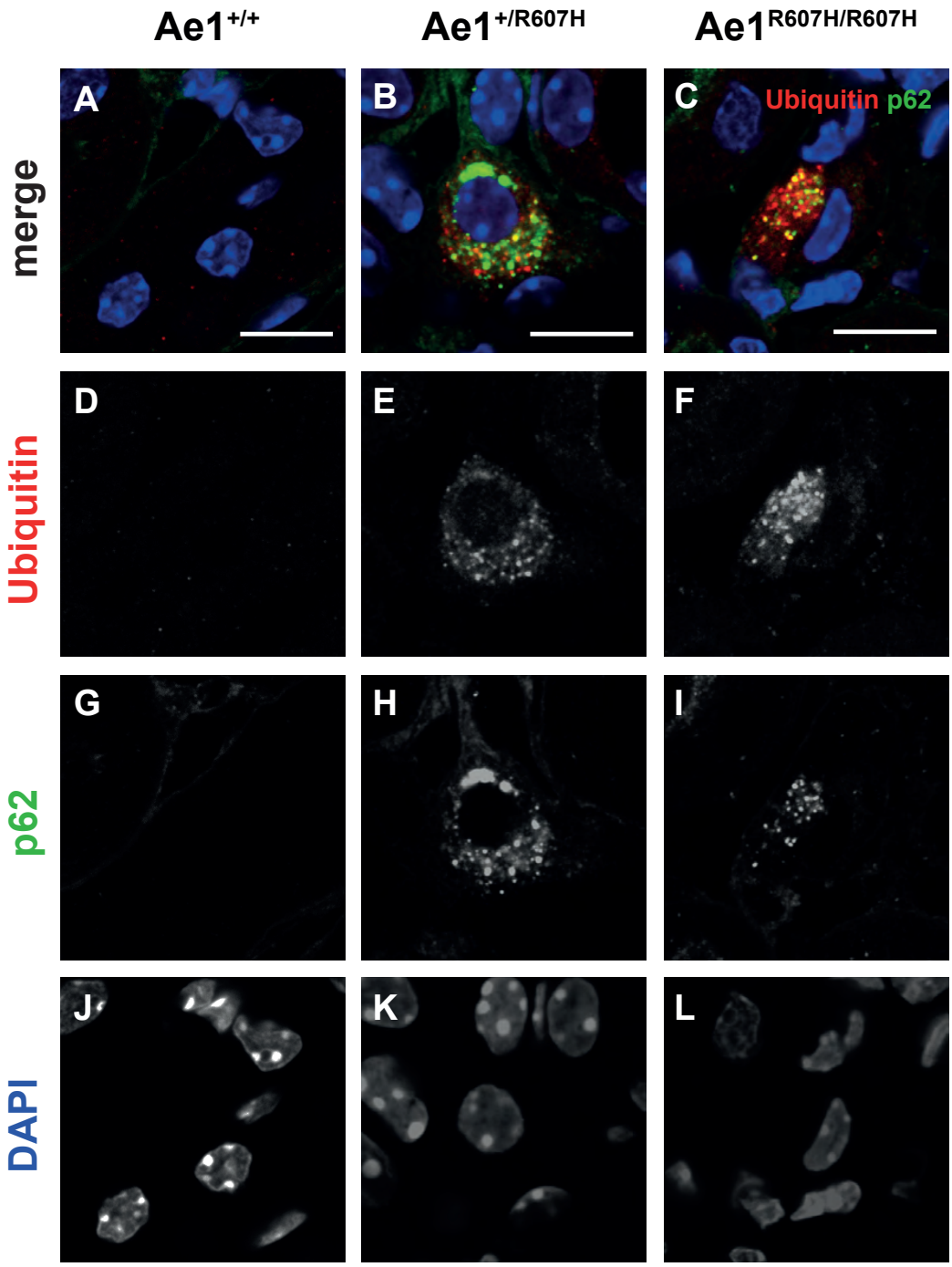
Supplementary Figure: 10



Supplementary Figure: 11



Supplementary Figure: 12



Supplementary Figure: 13

SECONDE ÉTUDE

Régulation du transport de chlore par le complexe protéique ClC-Kb/Barttin dans le néphron distal

INTRODUCTION

I. Les CLC : une grande famille de canaux et transporteurs de chlore

1. Généralités sur les CLC

La famille de canaux et transporteurs de chlore CLC représente la plus grande famille de canaux et transporteurs d'anions décrite à ce jour (Jentsch, 2008). L'étude de l'organe électrique de la raie torpille, *Torpedo marmorata*, a permis le clonage, par expression hétérologue dans l'oocyte de Xénope, du membre fondateur de cette famille, le ClC-0 (Jentsch TJ, 1990). Dans les années qui ont suivi, neuf autres gènes homologues ont été identifiés chez les mammifères : ClC-1 à ClC-7 ainsi que ClC-Ka/ClC-K1 et ClC-Kb/ClC-K2.

Les différentes protéines CLC ont des répartitions tissulaires distinctes et sont impliquées dans diverses fonctions biologiques : contrôle de l'excitabilité membranaire, transport transépithélial, régulation du volume cellulaire ou acidification d'organites intracellulaires. Les gènes codant pour des protéines de type CLC s'expriment dans tous les phylums et ont notamment été retrouvés dans des organismes aussi divers que les bactéries, les levures ou les plantes.

Les différents membres de cette famille peuvent être classés, sur la base de l'homologie de leur séquence primaire, en trois sous-familles ayant moins de 30% d'identité entre elles. La première sous-famille comporte les canaux chlorure exprimés à la membrane plasmique : ClC-1, ClC-2, ClC-Ka et ClC-Kb.

Les deux autres sous-familles regroupent les échangeurs électrogéniques $2Cl^-/H^+$ majoritairement exprimés au niveau des endosomes et lysosomes. (Accardi & Miller, 2004; Picollo & Pusch, 2005; Scheel, Zdebik, Lourdel, & Jentsch, 2005). ClC-3, ClC-4 et ClC-5, qui présentent près de 80% d'homologie de séquence, constituent la seconde sous-famille, tandis que ClC-6 et ClC-7 partagent 45% d'homologie et constituent la troisième sous-famille. [Figure 15]

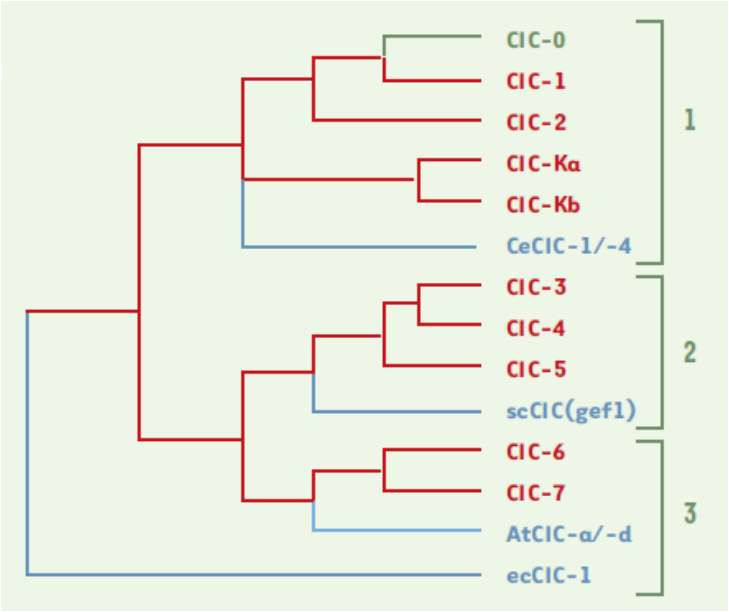


Figure 15: Arbre phylogénétique de la famille CLC.
Sont représentés en rouge les 9 ClC décrits chez l'Homme, en vert le canal de l'organe électrique de la raie torpille ClC-0, et en bleu les ClC de Caenorhabditis elegans (Ce), Saccharomyces cerevisiae (sc), Arabidopsis thaliana (At) et Escherichia coli (ec). (D'après Teulon et al. 2002)

Trois membres de la famille des CLC, les ClC-K, ClC-7 et ClC-2, sont aussi connus pour nécessiter la présence de petites sous-unités β régulatrices, indispensables à leur fonctionnement. La Barttin est associée aux canaux ClC-K, Ostm1 est associé à l'échangeur ClC-7 et GlialCAM au canal ClC-2 (Estevez et al., 2001; Jeworutzki et al., 2012; Lange, Wartosch, Jentsch, & Fuhrmann, 2006).

À l'exception de ClC-1, exprimé spécifiquement dans le muscle squelettique, tous ces gènes sont exprimés de façon non-spécifique dans le rein. L'analyse des mutations pathogènes et de modèles murins *knock-out* (KO) a permis de mettre en évidence que quatre de ces gènes (*CLCNKa, CLCNKb, CLCN5 et CLCN7*), jouent un rôle important dans la fonction rénale.

2. Structure et régulation des CLC

2.1 Structure générale des CLC

Les canaux CLC fonctionnent sous forme de dimères, où chaque monomère contient une voie de translocation des ions. Les monomères contiennent chacun un pore, appelé « protopore ». Ces pores sont équipés de portes qui s'ouvrent et se ferment rapidement (appelé ensuite « fast gate » chez ClC-0), et de façon indépendante l'une de l'autre. Le dimère, quant à lui, est contrôlé par une porte commune aux deux protopores qui fonctionne de façon plus lente (appelé ensuite « slow gate » chez ClC-0) (Miller & White, 1984). [Figure 16]

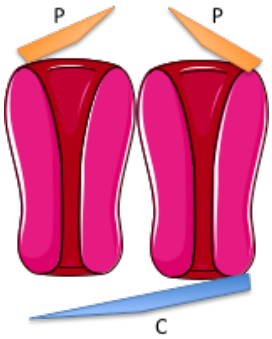


Figure 16: Structure en dimère des CLC
Schéma d'un dimère CLC. Chaque protopore est commandé par une porte (p) tandis qu'une porte commune (c) contrôle l'ouverture et la fermeture du dimère.

Par ailleurs, la cristallographie a permis de comprendre la structure 3D des CLC. Chacun des monomères CLC est formé de 18 hélices α dont 16 sont transmembranaires, l'hélice A étant cytosolique et l'hélice R partiellement transmembranaire (Dutzler, Campbell, Cadene, Chait, & MacKinnon, 2002). Les monomères présentent des motifs répétés, formé par un assemblage antiparallèle des hélices B à I et J à Q [Figure 17]. La structure cristallographique des canaux CLC a également révélé l'existence de trois sites de fixation des anions par protopore, qui peuvent être occupés simultanément. (Lobet & Dutzler, 2006). Chez les eucaryotes, les hélices transmembranaires sont suivies d'un long domaine C-terminal cytosolique contenant deux domaines cystathionine-β-synthase (CBS) [Figure 17]. Des données suggèrent que ces domaines pourraient être impliqués dans le trafic intracellulaire des CLC (Bennetts et al., 2005; Estevez, Pusch, Ferrer-Costa, Orozco, & Jentsch, 2004; Fong, Rehfeldt, & Jentsch, 1998) ou jouer un rôle de capteur métabolique en liant l'ATP, l'ADP ou l'AMP intracellulaire. (Zifarelli & Pusch, 2009).

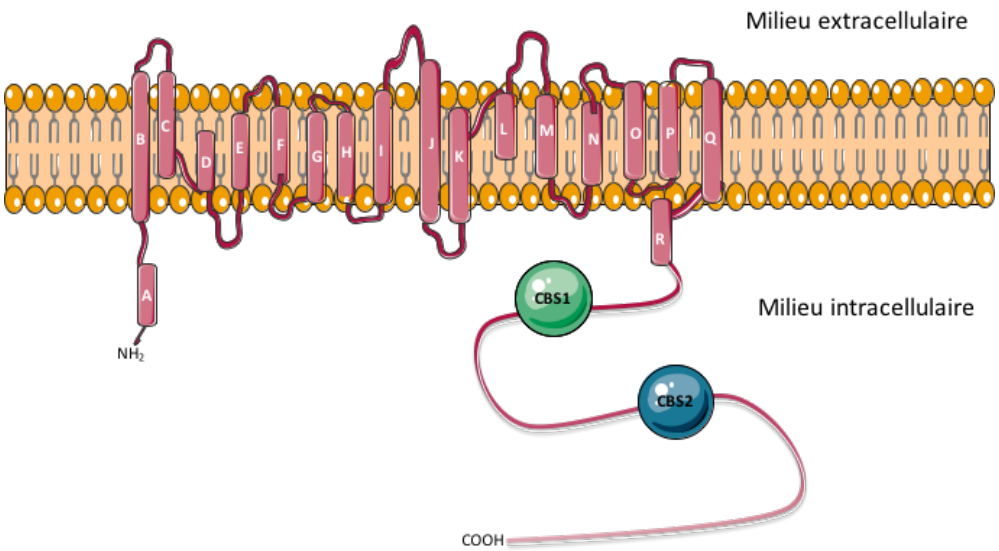


Figure 17: Structure d'un monomère de CLC eucaryote.
Les CLC possèdent 18 hélices α (indiqués par les lettres A à R) ainsi qu'un long domaine cytoplasmique C-terminal pourvu de deux domaines CBS. Les hélices A à I et J à R constituent des motifs antiparallèles.
(D'après Dutzler 2006)

2.2 Dépendance au voltage et régulation des CLC

2.2.1 Dépendance au voltage

Les CLC, à l'exception des ClC-K, sont tous voltage-dépendants (Estevez et al., 2001; Waldegger et al., 2002). La dépendance au voltage des CLC est dû à la présence d'un résidu glutamate situé au sein de l'hélice α F protopore (Pusch, 1996, 2004). L'accès externe du protopore est obstrué par la chaine latérale de ce glutamate, qui agit comme une porte pour réguler le flux des ions Cl^- dans ces canaux : c'est le « gating glutamate ». Ce glutamate sert aussi de relais pour l'échange de H^+ dans les échangeurs CLC (Dutzler et al., 2002; Dutzler, Campbell, & MacKinnon, 2003). Chez les ClC-K, ce glutamate est remplacé par une valine (V166). Cependant, ce résidu valine ne détermine pas le gating des ClC-K, mais uniquement la voltage-dépendance (Fischer, Janssen, & Fahlke, 2010; Waldegger & Jentsch, 2000).

2.2.2 Dépendance au pH

Les CLC sont tous pH-dépendants. Les ClC-K sont activés par un pH externe alcalin (Estevez et al., 2001; Waldegger et al., 2002) contrairement à d'autres canaux de la famille CLC, tels que le ClC-0 ou le ClC-1, qui sont activés par un pH acide (Hanke & Miller, 1983; Rychkov et al., 1996). Enfin, les ClC-K sont sensibles au Ca^{2+} extracellulaire, une propriété unique parmi les CLC. (Gradogna, Babini, Picollo, & Pusch, 2010).

3. Rôles physiologiques des CLC et pathologies associées

Les fonctions physiologiques des canaux et transporteurs CLC ont été déduites, en majeure partie, des phénotypes des souris KO et des pathologies humaines. Six canaux/transporteurs CLC (ClC-1, ClC-2, ClC-3, ClC-Kb, ClC-5 et ClC-7) sont responsables de maladies génétiques humaines associées à des symptômes aussi variés que la myotonie (raideur musculaire), la perte rénale de sel, la protéinurie tubulaire, les calculs rénaux, la surdité, l'ostéopétrose, la cécité ou les maladies lysosomales (Jentsch, Maritzen, & Zdebik, 2005). Il existe des souris invalidées pour chacun des 9 gènes CLC de mammifères.

3.1 ClC-1 : un canal Cl^- qui stabilise le potentiel membranaire du muscle squelettique

ClC-1 a été le premier canal Cl^- de mammifère isolé à partir du muscle squelettique. Exprimé dans des systèmes hétérologues tels que l'oocyte de Xénope ou les cellules de mammifères, ClC-1 induit un courant rectifiant entrant, de conductance unitaire d'environ 1-2pS. Ce canal est ouvert au potentiel de repos du muscle squelettique et est activé par une dépolarisation (Steinmeyer, Ortland, & Jentsch, 1991).

Le transport du Cl^- stabilise le potentiel de la membrane musculaire, et permet la repolarisation après un potentiel d'action. Plusieurs études ont démontré que la perte de fonction de ClC-1 était responsable de myotonie, tout d'abord chez les souris *adr*, un modèle murin de myotonie (Steinmeyer, Klocke, et al., 1991), puis chez des patients avec la découverte de mutations pathogènes de *CLCN1* (Koch et al., 1992). La myotonie congénitale est une des premières « canalopathies » décrites. À l'heure actuelle, environ 30 mutations pathogènes du gène *CLCN1* ont été décrites chez l'Homme. Chez les patients avec une myotonie dominante, il a été montré que les canaux ClC-1 mutants s'ouvrent à des potentiels non physiologiques, et peuvent également imposer cette propriété pathogène au ClC-1 sauvage lorsqu'ils sont sous forme d'hétéromères sauvage/mutant (Pusch, Steinmeyer, Koch, & Jentsch, 1995). Ces canaux ne peuvent, par conséquent, ni repolariser la membrane après un potentiel d'action, ni stabiliser le potentiel de membrane.

3.2 ClC-2 : un canal Cl^- largement exprimé dans l'organisme et aux multiples rôles

ClC-2 est un canal à rectification entrante exprimé dans presque tous les tissus (cœur, cerveau, pancréas, poumon, foie...) (Thiemann, Grunder, Pusch, & Jentsch, 1992). ClC-2 a une conductance unitaire d'environ 3pS (Weinreich & Jentsch, 2001), et est activé par le gonflement cellulaire, l'hyperpolarisation et un pH extracellulaire peu acide (Grunder, Thiemann, Pusch, & Jentsch, 1992; Jordt & Jentsch, 1997).

Les informations sur les rôles physiologiques de ClC-2 ont été déduites du phénotype du modèle murin invalidé pour ClC-2, *Clcn2*$^{-/-}$ qui présente une dégénérescence postnatale de la rétine et des testicules (Bosl et al., 2001). Cela suggère que ces pathologies seraient le résultat d'une perturbation de l'homéostasie ionique dans les compartiments extracellulaires entourant les photorécepteurs et les cellules germinales. Plus récemment, il a été montré que les souris *Clcn2*$^{-/-}$ présentent une vacuolisation de la substance blanche du cerveau, rappelant celle observée chez des patients atteints de leucoencéphalopathie mégalencéphalique avec kystes sous-corticaux (MLC) (Blanz et al., 2007). L'analyse des mutations humaines de *CLCN2* a montré, comme chez la souris, elles entrainent plutôt la MLC, (Depienne et al., 2013), et peuvent également être associées à une azoospermie (Di Bella et al., 2014).

Récemment, il a été montré que ClC-2 est lié à la protéine d'adhésion GlialCAM (Jeworutzki et al., 2012), qui est elle-même liée à la protéine transmembranaire Mlc1 (Lopez-Hernandez et al., 2011). Des mutations de *GlialCAM* et de *Mlc1* sont responsables de la MLC (Leegwater et al., 2001; Lopez-Hernandez et al., 2011), ce qui suggère une physiopathologie commune à ces trois gènes. GlialCAM et ClC-2 colocalisent dans la glie de Bergmann au niveau du cervelet, dans les jonctions astrocyte-astrocyte, et dans les prolongements astrocytaires au niveau des vaisseaux sanguins et des fibres de myélinisées (Blanz et al., 2007; Hoegg-Beiler et al., 2014; Jeworutzki et al., 2012; Lopez-Hernandez et al., 2011). GlialCAM favorise la distribution de ClC-2 dans les jonctions cellulaires, augmente les courants Cl- et supprime presque entièrement la rectification de ClC-2 (Jeworutzki et al., 2012).

Les propriétés et fonctions physiologiques des canaux ClC-K et de leur sous-unité régulatrice la Barttin, qui s'expriment dans le rein et dans l'oreille interne, seront traitées dans le chapitre II.

3.3 ClC-3 : un échangeur Cl^-/H^+ endosomal très controversé

ClC-3 est le membre le plus controversé de la famille des CLC car plusieurs types de courants Cl^- avec des caractéristiques incompatibles lui ont été assignés. L'hypothèse est que ClC-3 serait un canal anionique régulé par le volume (VRAC) (Duan et al. 1997). Cependant, cela n'a pas été confirmée par l'analyse de différents modèles murins invalidés pour ClC-3 car les courants VRAC ne sont pas affectés dans ces modèles (Arreola et al., 2002; W. Gong et al., 2004; Stobrawa et al., 2001).

ClC-3 est exprimé dans presque tous les tissus. On le retrouve principalement dans les endosomes/lysosomes tardifs (Hara-Chikuma et al., 2005; Stobrawa et al., 2001; Suzuki et al., 2006). ClC-3 serait vraisemblablement un échangeur intracellulaire $2Cl^-/H^+$ voltage dépendant (Guzman, Grieschat, Fahlke, & Alekov, 2013; Jentsch, 2008). Néanmoins, cela n'a pas été montré de façon aussi probante que pour ClC-4 ou ClC-7 car son activité de transport à la membrane plasmique est très faible dans les divers systèmes d'expression hétérologue (Leisle, Ludwig, Wagner, Jentsch, & Stauber, 2011; Neagoe, Stauber, Fidzinski, Bergsdorf, & Jentsch, 2010; Picollo & Pusch, 2005). ClC-3 pourrait jouer un rôle dans l'acidification des endosomes (Hara-Chikuma et al., 2005). La délétion de ClC-3 chez la souris entraine une dégénérescence des neurones de la rétine et de différentes zones du cerveau avec, notamment, une perte massive de l'hippocampe mais le mécanisme par lequel la délétion de ClC-3 conduirait à un syndrome neurodégénératif n'est pas clairement identifié (Dickerson et al., 2002; Stobrawa et al., 2001; Yoshikawa et al., 2002).

3.4 ClC-4 : un échangeur Cl^-/H^+ endosomal avec un rôle probable dans le développement cérébral.

ClC-4 est exprimé dans un grand nombre de tissus incluant le cerveau, le muscle squelettique, le foie et les reins (Jentsch, Gunther, Pusch, & Schwappach, 1995). ClC-4 est un échangeur Cl^-/H^+ dont les propriétés biophysiques ressemblent à celles du ClC-5 (Friedrich, Breiderhoff, & Jentsch, 1999). Il est exprimé au niveau des endosomes (Mohammad-Panah et al., 2003; Suzuki et al., 2006). ClC-4 serait impliqué dans l'acidification et le trafic des endosomes (Mohammad-Panah et al., 2003). Cependant, contrairement aux souris KO pour ClC-5 qui présentent un défaut d'endocytose dans le tube proximal (Piwon, Gunther, Schwake, Bosl, & Jentsch, 2000), les souris *Clcn4* $^{-/-}$ n'ont aucun phénotype apparent (Rickheit et al., 2010).

L'analyse génétique de mutations humaines suggère que la perte de fonction de ClC-4 impacte la fonction cérébrale. Le gène *CLCN4* humain est localisé sur le chromosome X (Rugarli et al., 1995). Une mutation perte de fonction *de novo* (G544R) a été identifiée chez un patient présentant une épilepsie sévère et un retard du développement (Veeramah et al., 2013). De façon plus convaincante, cinq familles avec différentes mutations de *CLCN4* ont été identifiées par un screening de gènes du chromosome X potentiellement impliqués dans le syndrome de l'X fragile (Hu et al., 2016). Toutes ces mutations réduisent les courants chlore ClC-4 dans des systèmes d'expression hétérologue.

3.5 ClC-5 : un échangeur Cl^-/H^+ endosomal indispensable à l'endocytose dans le rein

Le canal ClC-5 est un échangeur Cl^-/H^+ (Picollo & Pusch, 2005; Scheel et al., 2005) dont les propriétés biophysiques sont proches du ClC-4 (Friedrich et al., 1999). Ce canal est principalement exprimé au niveau des épithélium rénaux et intestinaux (Steinmeyer, Schwappach, Bens, Vandewalle, & Jentsch, 1995; Vandewalle et al., 2001). Dans le rein, on le retrouve dans deux types cellulaires ayant de fortes capacités d'endocytose: les cellules du tubule proximal et, les cellules α intercalaires du tubule connecteur (CNT) et canal collecteur (CD), où il colocalise avec la pompe à proton vH^+-ATPase au niveau des endosomes précoces (Gunther, Luchow, Cluzeaud, Vandewalle, & Jentsch, 1998; Sakamoto et al., 1999).

Des mutations du gène *CLCN5* causent la maladie de Dent (Fisher et al., 1994), une maladie rénale associée à une protéinurie tubulaire (essentiellement une β2-microglobulinurie), une hypercalciurie, la présence de calculs rénaux, une néphrocalcinose et une insuffisance rénale (Wrong, Norden, & Feest, 1994). La maladie de Dent est une maladie liée à l'X, par conséquent, elle affecte essentiellement les hommes, les femmes étant généralement porteuses saines (Scheinman, 1998). Dans la majorité des cas, la maladie se manifeste dans l'enfance et, dans bon nombre de cas, évolue vers l'insuffisance rénale. À ce jour, plus de 148 mutations de ClC-5 ont été identifiées. Ces mutations peuvent être réparties en au moins 3 classes (Lourdel et al., 2012). La première classe de mutations conduit à un défaut d'adressage de ClC-5 à la membrane plasmique et aux endosomes précoces. La deuxième classe entraîne un retard de la maturation et de l'adressage à la membrane de ClC-5. Quant à la troisième classe, elle induit un défaut dans les propriétés conductrices de l'échangeur sans affecter son adressage.

Les études menées sur les souris invalidées pour ClC-5, *Clcn5*$^{-/-}$ reproduisent le phénotype des patients avec, notamment, une protéinurie qui traduit un défaut d'endocytose dans les cellules du tubule proximal (Piwon et al., 2000; S. S. Wang et al., 2000). Les souris *Clcn5*$^{-/-}$ produites par Wang et al, (S. S. Wang et al., 2000), présentent une polyurie, une hyperprotéinurie, une aminoacidurie et une glycosurie. Elles développent aussi une hypercalciurie et des dépôts calciques avec des lésions minimes de néphrocalcinose.

Piwon et al, (Piwon et al., 2000), ont démontré que dans leur modèle de souris *Clcn5*$^{-/-}$, l'invalidation du gène altère les capacités d'endocytose dans le tubule proximal. Ces souris présentent aussi une diminution de l'expression de la mégaline dans le tubule proximal, une protéine impliquée dans l'endocytose et l'activation de la 25(OH) vitamine D3, (Nykjaer et al., 1999), ainsi que des anomalies de l'internalisation de l'échangeur sodium-proton NHE3 et du transporteur sodium-phosphate (NaPi-2). Ces défauts sont en partie responsables d'une élévation des concentrations de parathormone (PTH) dans la lumière du tubule, ainsi que de l'activation de ses récepteurs. Ces résultats ont apporté la preuve directe du rôle essentiel du canal ClC-5 dans les mécanismes généraux d'endocytose dans le tubule proximal, et laissent fortement suggérer que l'hyperphosphaturie et l'hypercalciurie retrouvées dans la maladie de Dent sont la conséquence indirecte d'un défaut d'endocytose de la PTH et de la 25 (OH) vitamine D_3.

3.6 ClC-6 : un échangeur Cl^-/H^+ des endosomes tardifs des neurones

Avec le ClC-7, ClC-6 compose la troisième sous famille des CLC (Brandt & Jentsch, 1995). ClC-6 est un échangeur électrogénique Cl^-/H^+ majoritairement exprimée dans le système nerveux. Il est présent dans les endosomes et, dans une moindre mesure, dans les lysosomes (Neagoe et al., 2010; Poet et al., 2006).

Les souris invalidées pour ClC-6, *Clcn6*$^{-/-}$ présentent une forme particulière de maladie de surcharge lysosomale où la majorité des dépôts intracellulaires sont localisés dans les segments initiaux des axones des neurones (Poet et al., 2006). Contrairement aux souris *Clcn7*$^{-/-}$, cette maladie de surcharge progresse lentement et n'est ni associée à une perte significative du tissu neuronal ni à une activation de la microglie (Poet et al., 2006; Pressey et al., 2010). De plus, la délétion de ClC-6 ne modifie pas le pH des lysosomes.

Les souris *Clcn6*$^{-/-}$ ont un phénotype peu sévère associé notamment à une sensibilité à la douleur réduite, qui est une conséquence de la surcharge lysosomale dans le ganglion spinal de la racine dorsale (Poet et al., 2006). Le phénotype de ces souris ressemble aux formes légères de céroïdes-lipofuscinoses neuronales (CLN), un groupe de maladies génétiques neurodégénératives. *CLCN6* est donc considéré comme un gène candidat pour les formes bégnines de cette pathologie. Cependant, seulement deux mutations faux-sens de ClC- 6 à l'état hétérozygote, ont été identifiées chez deux individus d'une cohorte de 75 patients CLN (Poet et al., 2006). Mais c'est sans doute seulement une question de temps avant que des mutations évidentes de *CLCN6* ne soient retrouvées chez des patients CLN.

3.7 ClC-7/Ostm1 : un échangeur Cl^-/H^+ lysosomal indispensable à l'intégrité du cerveau et des os.

L'échangeur électrogénique ClC-7 a été cloné par homologie avec le ClC-6 avec lequel il partage 45% d'homologie (Brandt & Jentsch, 1995). ClC-7 est exprimé dans de nombreux tissus, dont le tissu osseux, le cerveau et le rein (Brandt & Jentsch, 1995). Il est spécifiquement exprimé dans les lysosomes (Poet et al., 2006). Par ailleurs, ClC-7 nécessite sa sous-unité β, Ostm1, une protéine transmembranaire, pour son activité de transport ionique (Leisle et al., 2011), et sa stabilité dans les lysosomes (Lange et al., 2006).

Les fonctions physiologiques de ClC-7 ont été déduites de l'analyse de souris invalidées pour ClC-7*, Clcn7*$^{-/-}$, (Kornak et al., 2001), qui présentent une ostéopétrose sévère et une dégénérescence de la rétine et du système nerveux en lien avec une surcharge lysosomale (Kasper et al., 2005). Les souris « *Grey-lethal* » sont porteuses d'une mutation spontanée responsable de la forme autosomique récessive la plus sévère d'ostéopétrose. Ces souris sont, en fait porteuses d'une mutation de Ostm1 et présentent un phénotype presque identique à celui des souris *Clcn7*$^{-/-}$ (Chalhoub et al., 2003; Lange et al., 2006; Pressey et al., 2010). De la même façon, la délétion de ClC-7 ou de Ostm1 entraîne une sévère ostéopétrose infantile chez l'Homme (Chalhoub et al., 2003; Kornak et al., 2001), qui est très probablement associée à une dégénérescence du système nerveux (Frattini et al., 2003).

Dans les oscléoclastes, les cellules de dégradation du tissu osseux, ClC-7/Ostm1 est inséré dans la membrane plissée par exocytose des lysosomes, et permet la neutralisation des protons générées par la pompe vH^+-ATPase de type V, ainsi que l'acidification des lacunes où s'effectue la résorption osseuse (Kornak et al., 2001; Lange et al., 2006).

Dans le rein, bien que sa présence ait été détectée dans tous les segments du néphron, ClC-7 est majoritairement exprimé dans le tubule contourné proximal où il jouerait un rôle central dans la dégradation lysosomale des protéines, sans influer sur leur endocytose (Wartosch, Fuhrmann, Schweizer, Stauber, & Jentsch, 2009).

L'ensemble des caractéristiques des différents CLC est résumé dans la figure ci-après :

		Sous-unité ß	Localisation	Fonction	Maladie humaine associée	Modèle murin
ClC-1	Canaux Cl^- Membrane plasmique	*GlialCam*	Muscle squelettique	Stabilisation du potentiel membranaire	Myotonie congénitale	Myotonie congénitale
ClC-2			Étendue	Transport transépi. Régulation concentration ionique et volume extracellulaire ?	Leucodystrophie Azoospermie	Dégénération testicule, rétine Leucodystrophie
ClC-Ka (K1)		**Barttin**	Rein et oreille interne	Transport transépithélial	Bartter (perte rénale de sel)	Diabète insipide
ClC-Kb (K2)						Bartter (perte rénale de sel)
ClC-3	Échangeurs Cl^-/H^+ Vésicules (endo/lyso)		Étendue (cerveau, rein, foie)	Homéostasie des endosomes		Dégénération rétine, hippocampe
ClC-4			Étendue (cerveau, rein, muscle)	Homéostasie des endosomes	Retard mental	
ClC-5			Rein et intestin	Homéostasie des endosomes	Maladie de Dent	Défaut rénal d'endocytose
ClC-6			Neurones	Homéostasie des endosomes		Maladie de surcharge lysosomale (NCL)
ClC-7		**Ostm1**	Étendue	Acidification des ostéoclastes Homéostasie des lysosomes	Ostéopétrose Dégénération rétine, NCL	Ostéopétrose Dégénération rétine, NCL

Figure 18: Résumé des principales caractéristiques des CLC de mammifère

II. Propriétés et régulation du canal ClC-Kb/Barttin

1. Découvertes des ClC-K et de la Barttin

Les canaux ClC-K forment un sous-groupe de canaux CLC exprimés spécifiquement dans le rein (K pour kidney) et dans l'oreille interne (Jentsch, 2008). La première isoforme ClC-K1 a été clonée chez le rat (Uchida et al., 1993) et par la suite, les isoformes associées ont été identifiées : rClC-K2 chez le rat (Adachi et al., 1994) et ClC-Ka et ClC-Kb chez l'Homme (Kieferle, Fong, Bens, Vandewalle, & Jentsch, 1994). D'autres études chez la souris ont ensuite permis d'identifier mClC-K1 et mClC-K2 par homologie de séquence avec leurs orthologues chez le rat.

ClC-Ka et ClC-Kb montrent environ 90% d'identité de séquence et sont situés sur le chromosome 1 où ils ne sont séparés que de 11kb d'ADN génomique (Kieferle et al., 1994). Il est donc probable que les gènes *CLCNKA* et *CLCNKB* résultent d'une duplication génique. Bien que les canaux ClC-K présentent environ 50% d'identité avec ClC-1 ou ClC-2, ces canaux ne sont pas fonctionnels lorsqu'ils sont exprimés dans l'oocyte de Xénope ou dans les cellules transfectées. Seul le canal rClC-K1 de rat montre une activité, bien que les courants générés soient très faibles (Adachi et al., 1994; Kieferle et al., 1994; Uchida et al., 1993).

Cependant, le rôle physiologique du ClC-Kb humain dans le transport de chlorure est devenu évident puisque des mutations du gène *CLCNKB* causent le syndrome de Bartter classique ou de type III, une pathologie caractérisée par une perte rénale de sel (Simon et al., 1997). C'est ainsi que l'hypothèse d'une sous-unité régulatrice nécessaire au fonctionnement des ClC-K a été soulevée (Kieferle et al., 1994).

La sous-unité manquante, codée par le gène *BSND* a été découverte chez des patients souffrant d'une forme anténatale sévère du syndrome de Bartter, associée à une surdité et une insuffisance rénale qui ne présentent pas de mutations dans les gènes précédemment décrits comme étant responsables de ce syndrome (Birkenhager et al., 2001). La protéine codée par le gène *BSND* a été appelée Barttin, et elle est capable d'interagir avec les deux isoformes ClC-K (Estevez et al., 2001). C'est une petite protéine membranaire de 320 acides aminés qui possède deux domaines transmembranaires, une courte queue N-terminale et une longue extrémité C-terminale. La Barttin ne montre pas d'homologie avec d'autres protéines humaines et est exclusivement exprimée chez les vertébrés [Figure 19].

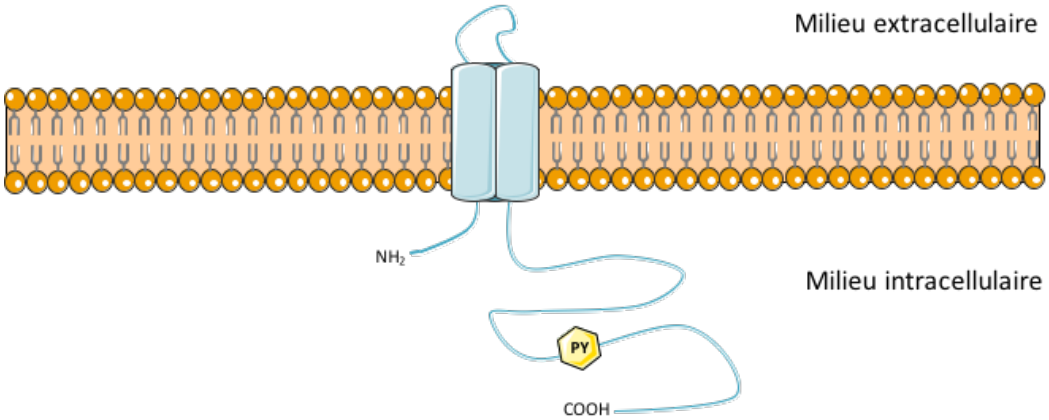


Figure 19: Structure de la Barttin.
Elle se compose d'un court domaine cytosolique N-terminal, de deux segments transmembranaires et d'un long domaine cytosolique C-terminal contenant un motif proline-tyrosine (PY) d'internalisation

2. Propriétés du canal ClC-Kb/Barttin

2.1 Propriétés biophysiques du canal ClC-Kb/Barttin

L'expression de ClC-Kb en l'absence de Barttin, que ce soit dans l'oocyte de Xénope ou dans des lignées cellulaires rénales humaines (HEK293, tsA201), ne produit pas de courants significativement différents des courants endogènes (Estevez et al., 2001; Scholl et al., 2006; Waldegger et al., 2002; Waldegger & Jentsch, 2000). La co-expression de ClC-Kb avec la Barttin donne des courants qui s'inactivent partiellement à des voltages négatifs, et s'activent à des voltages positifs. On obtient donc une courbe courant-voltage modérément rectifiante sortante (Estevez et al., 2001; Waldegger et al., 2002). [Figure 20]

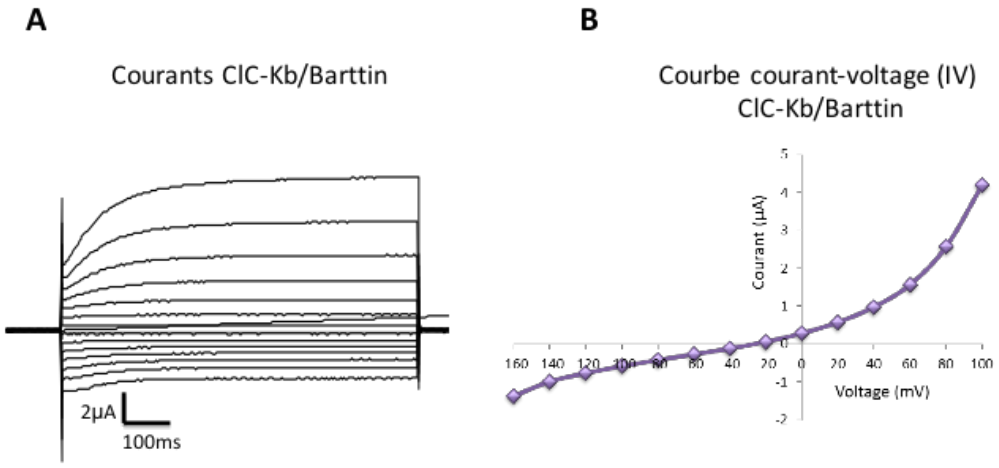


Figure 20: Les courants ClC-Kb/Barttin
A) Exemple d'enregistrement de courant (B) Courbe courant-voltage dans l'oocyte de Xénope (D'après Keck M. 2013)

.

La séquence de conductance anionique de ClC-Kb est la suivante : $Cl^- > Br^- > NO3^- = I^-$ (Waldegger et al., 2002). Ces propriétés sont différentes des courants du canal ClC-Ka/Barttin qui s'activent à des voltages négatifs, et se désactivent partiellement à des voltages positifs. La courbe courant-voltage de ClC-Ka est à peu près linéaire et sa séquence de conductance anionique est $Cl^- = Br^- > NO3^- = I^-$ (Waldegger et al., 2002).

Comme mentionné précédemment, le « gating glutatmate », très conservé parmi les CLC, est remplacé par une valine chez les ClC-K. Plusieurs équipes ont montré que chez le ClC-K1 de rat (rClC-K1), la mutation de cette valine en glutamate ne modifiait pas son gating mais uniquement sa dépendance au voltage (Fischer et al., 2010; Waldegger & Jentsch, 2000).

Les conductances unitaires de rClC-K1/Barttin et ClC-Ka/Barttin sont respectivement de 33pS et 26pS. Les conductances unitaires de ces deux canaux sont, jusqu'à aujourd'hui, les mieux décrites dans la famille des CLC, (Fischer et al., 2010). Les conductances unitaires des canaux rClC-K2/Barttin et ClC-Kb/Barttin n'ont, quant à elles, pas encore été étudiées cependant deux articles ont rapporté la présence de canaux chlore natifs de 10pS exprimés à la membrane basolatérale du tubule contourné distal, et des cellules intercalaires du canal collecteur chez la souris (Lourdel, Paulais, Marvao, Nissant, & Teulon, 2003; Nissant, Paulais, Lachheb, Lourdel, & Teulon, 2006). Ces canaux montrent une séquence de perméabilité anionique et une dépendance au Ca^{2+} et au pH comparables à celles des canaux rClC-K2(cloné)/Barttin et ClC-Kb(cloné)/Barttin (Lourdel et al., 2003; Nissant et al., 2006; Teulon et al., 2005).

Quelques propriétés, qui n'ont pas encore été étudiées chez le ClC-K2 ou le ClC-Kb clonés, ont pu être mises en évidence chez ces canaux chlore natifs (Lourdel et al., 2003):

- L'activité de ce canal est inhibée par le Phorbol Myristate Acétate (PMA) (un activateur de la PKC)
- Ce canal ne semble pas régulé par la voie de l'adénylate cyclase car ni la PKA ni la Forskoline (un activateur de l'adénylate cyclase) ne modifient son activité
- Ce canal n'est pas sensible à la concentration de calcium intracellulaire
- Ce canal est très sensible au pH intracellulaire (une augmentation du pH active le canal).

2.2 Régulation par le pH et le Ca^{2+} extracellulaire *in vitro*

L'activité des complexes ClC-Ka/Barttin et ClC-Kb/Barttin est modifiée par la composition du milieu extracellulaire. Ils sont bloqués par une diminution du pH extracellulaire (Estevez et al., 2001; Uchida et al., 1995; Waldegger et al., 2002). De plus, ces canaux sont uniques parmi les CLC car lorsqu'ils sont exprimés dans l'oocyte de Xénope, ils sont sensibles au Ca^{2+} extracellulaire (Estevez et al., 2001; Gradogna et al., 2010; Martinez & Maduke, 2008; Uchida et al., 1995; Waldegger et al., 2002). Une augmentation de la concentration extracellulaire en [Ca^{2+}] de 0 à 5mM multiplie l'activité du canal ClC-Kb/Barttin par deux environ (Martinez & Maduke, 2008). Le canal ClC-Kb est plus sensible au pH externe, mais moins sensible au Ca^{2+} extracellulaire que le ClC-Ka (Estevez et al., 2001; Gradogna et al., 2010). Le Ca^{2+} et le pH n'agissent pas en limitant directement l'accès au pore, mais par modulation allostérique ; c'est à dire qu'ils induisent un changement de conformation du canal. Ils semblent agir via des mécanismes et des sites de liaison indépendants l'un de l'autre (Gradogna et al., 2010).

Toutefois, les ClC-K sont relativement insensibles au Ca^{2+} dans une gamme de valeurs physiologiques (0,5mM à 2mM $[Ca^{2+}]_{libre}$) ; il est donc peu probable que des variations dans cette gamme affectent l'activité du canal (Andrini et al., 2015).

3. Fonctions de la Barttin

In vitro, la Barttin augmente le nombre de canaux ClC-K à la surface membranaire, modifie la distribution subcellulaire de ces canaux et, fait passer les ClC-K (excepté rClC-K1) d'une forme non conductrice à une forme active (Estevez et al., 2001; Scholl et al., 2006; Waldegger et al., 2002).

Dans la lignée cellulaire rénale MDCK (Madin-Darby Canine Kidney), lorsque que ClC-Kb est exprimé sans la Barttin il est majoritairement retenu dans le réticulum endoplasmique (Scholl et al., 2006). Toutefois, une petite proportion de canaux ClC-Kb est exprimée à la membrane plasmique mais ne produit pas de courants macroscopiques ; ce qui indiquerait que ces canaux ne sont pas fonctionnels (Estevez et al., 2001; Scholl et al., 2006).

Cette hypothèse a été vérifiée grâce des expériences utilisant des concatémères ClC-Kb/ClC-1, qui peuvent s'insérer dans la membrane plasmique indépendamment de la présence de Barttin (Steinmeyer, Ortland, et al., 1991). En effet, bien que ClC-Kb atteigne la membrane, aucun courant distinguable des courants générés par ClC-1 n'est détecté (Scholl et al., 2006). La co-transfection de ce concatémère avec la Barttin donne des courants anioniques qui correspondent à l'addition des courants de ClC-1 et de ClC-Kb/Barttin. Ainsi, la Barttin contrôle les courants macroscopiques de ClC-Kb en déterminant non seulement le nombre de canaux à la surface membranaire, mais aussi leur capacité à transporter les anions.

Ensuite, la co-expression avec la Barttin favorise l'insertion de ClC-Kb dans la membrane plasmique des cellules transfectées. (Scholl et al., 2006). En effet, la Barttin stimule la glycosylation de ClC-K, ce qui est un indicateur de la sortie effective du réticulum endoplasmique. (Janssen et al., 2009). Ceci pourrait également expliquer la plus grande stabilité des canaux ClC-Kb lorsqu'ils sont associés à la Barttin, car la glycosylation est un mécanisme de protection contre la dégradation des protéines (Hayama, Rai, Sasaki, & Uchida, 2003). Exprimés dans des cellules MDCK polarisées, les canaux ClC-Kb/Barttin sont majoritairement localisés à la membrane basolatérale, et la Barttin semble être un déterminant indispensable à cette distribution polarisée dans les épithéliums. De plus, en l'absence de ClC-Kb, la Barttin est exprimée préférentiellement dans la membrane apicale des cellules MDCK, et la co-transfection avec ClC-Kb ne modifie pas sa distribution subcellulaire (Janssen et al., 2009). Jusqu'à présent, les mécanismes qui régulent la distribution polarisée des canaux ClC-K/Barttin ne sont pas encore connus.

Enfin, une récente étude a mis en évidence que la palmitoylation de la Barttin est nécessaire à l'activation des canaux ClC-K présents à la membrane (Steinke et al., 2015). Deux résidus cystéines, aux positions 54 et 56, ont été identifiés sur la Barttin comme des sites de palmitoylation, *in vivo* et *in vitro*. Des mutations ponctuelles des deux résidus C54 et C56 réduisent l'amplitude des courants macroscopiques dans des lignées cellulaires transfectées avec les canaux ClC-K/Barttin. Cette réduction de courant est proportionnelle au niveau de palmitoylation de la Barttin (les mutants C54 et C56 réduisent les courants anioniques d'environ 50% et 25% respectivement, quand le double mutant C54/C56 les abolit complètement). Cependant, la palmitoylation de la Barttin ne modifie ni l'expression ni la distribution subcellulaire de canaux ClC-Kb/Barttin (Steinke et al., 2015).

4. Déterminants structurels des fonctions de la Barttin

Comme indiqué précédemment, la Barttin présente deux hélices transmembranaires comprenant les acides aminés 9 à 54 et une grande extrémité C-terminale [Voir Figure 18].
En utilisant différents mutants tronqués de la Barttin, il a été démontré que les fonctions clés de la Barttin sont médiées par la partie transmembranaire et par quelques acides aminés de la queue C-ter situés après la seconde hélice transmembranaire (Scholl et al., 2006).

La partie transmembranaire est suffisante pour la sortie des canaux ClC-Kb du réticulum endoplasmique et leur insertion dans la membrane. Les 15 à 17 acides aminés après la seconde hélice transmembranaire sont nécessaires pour transformer ClC-Kb en canal actif. Ainsi, deux régions distinctes de la Barttin confèrent deux propriétés fonctionnelles de la Barttin : l'activation des canaux ClC-Kb/Barttin et la promotion de l'insertion membranaire des canaux (Fahlke & Fischer, 2010).

Par ailleurs, dans le but d'étudier les domaines d'interactions entre les ClC-K et la Barttin, Tajima et al. ont co-exprimé la Barttin et des fragments de rClC-K2 dans un système cellulaire et ont immunoprécipité le complexe (Tajima, Hayama, Rai, Sasaki, & Uchida, 2007). Ils ont trouvé que les constructions tronquées de rClC-K2 contenant les hélices transmembranaire B ou J sont capables d'interagir avec la Barttin (Tajima et al., 2007). Cependant, la stœchiométrie et les régions précises d'interaction des canaux ClC-K avec la Barttin ne sont toujours pas connues.

Le domaine C-terminale de la Barttin contient un « motif PY » [Figure 18]. Ces motifs sont nécessaires à la régulation des protéines par ubiquitination, notamment par l'ubiquitine ligase Nedd4-2, à l'exemple du canal épithélial sodique ENaC (Staub et al., 1996). En effet, lorsque que les canaux ClC-Ka ou ClC-Kb sont exprimés dans l'oocyte de Xénope avec le mutant de la Barttin où le motif PY a été éliminé (Y98A), on observe une intensité des courants environ deux fois supérieure (Estevez et al., 2001). Cependant, les résultats suggérant que les canaux ClC-Ka/Barttin sont régulés par l'ubiquitine ligase Nedd4-2 et la kinase SGK1 (Embark et al., 2004), n'ont pas pu être reproduits (Jentsch, 2008). Ainsi, en l'absence d'une ligase convaincante ou de la démonstration d'une ubiquitination altérée, la pertinence du motif PY reste incertaine (Barrallo-Gimeno, Gradogna, Zanardi, Pusch, & Estevez, 2015).

III. Rôles physiologiques du complexe ClC-Kb/Barttin et son implication dans le Syndrome de Bartter

1. Transport de chlore dans le néphron distal et régulation de la pression artérielle

Les travaux de Guyton et al. ont établi de façon définitive que les reins jouaient un rôle essentiel dans la régulation à long terme de la pression artérielle (PA) en régulant notamment le contenu en sodium de l'organisme (Guyton et al., 1986). Les mêmes auteurs ont également mis en évidence le phénomène de natriurèse de pression (Hall, Guyton, Coleman, Mizelle, & Woods, 1986), et démontré le rôle fondamental du système Rénine-Angiotensine-Aldostérone. Dans la perspective de ces travaux, le chlore n'a que le rôle secondaire d'assurer l'électroneutralité. Cependant, un nombre croissant d'études a introduit l'idée que l'ion chlore pourrait jouer un rôle plus direct dans la régulation de la pression artérielle. Ainsi, un régime riche en sodium, sans apport de chlore, ne permet pas d'induire d'hypertension chronique chez des patients et des animaux (Kurtz, Al-Bander, & Morris, 1987; Whitescarver, Ott, Jackson, Guthrie, & Kotchen, 1984). Malgré cela, le lien entre transport de chlore et variation de la pression artérielle reste moins largement documenté que pour le sodium.

Dans l'anse de Henlé et le tubule contourné distal, le transport de chlore est couplé, de façon moléculaire, à celui du sodium. Il est bien connu que l'inhibition des transporteurs Na^+-Cl^- dans ces segments par le furosémide (inhibe NKCC2) ou les thiazidiques (inhibe NCC), deux diurétiques classiquement utilisés chez les patients, engendre une perte de sel associée à une hypovolémie. On sait également que des mutations perte de fonction des différents transporteurs ou canaux exprimés dans ces deux segments, sont à l'origine des syndromes de Bartter et de Gitelman – deux tubulopathies de perte de sel associées à une PA normale-basse.

Au niveau du tubule connecteur et du canal collecteur, la réabsorption transépithéliale de sodium et de chlore est découplée car, comme mentionné précédemment, le sodium est majoritairement réabsorbé dans les cellules principales par le canal apical ENaC et la pompe basolatérale Na^+/K^+-ATPase, alors que le chlore est réabsorbé dans les cellules intercalaires et par voie paracellulaire. Le rôle du chlore dans la régulation à long terme de la pression artérielle a été mis en lumière par l'étude des transporteurs de Cl^- des cellules intercalaires.

Chez la souris, l'inactivation de la Pendrine favorise le développement d'une hypotension sous régime pauvre en NaCl (< 0,01 mEq/day NaCl) (Wall et al. 2004), ou bien les protège contre une hypertension induite par les minéralocorticoïdes (Verlander et al., 2003). Au contraire, des souris surexprimant la Pendrine développent une hypertension sensible au sel lorsqu'elles sont soumises à un régime riche en sel (Jacques et al., 2013) .

Plusieurs données de la littérature suggèrent que les canaux ClC-K jouent un rôle dans le contrôle de la pression artérielle. En effet, des mutations perte de fonction du gène *CLCNKB*, qui code pour le canal ClC-Kb, sont à l'origine du syndrome de Bartter classique, une maladie qui peut être associé à une diminution de la pression artérielle (Simon et al., 1997). En outre, des analyses génétiques proposent que plusieurs polymorphismes des canaux ClC-K prédisposeraient à l'hypertension (Barlassina et al., 2007; Jeck, Waldegger, Doroszewicz, Seyberth, & Waldegger, 2004; Jeck, Waldegger, Lampert, et al., 2004; Sile et al., 2009). Par ailleurs, il est important de noter que les canaux ClC-K sont exprimés à la membrane basolatérale des cellules de la macula densa dans l'appareil juxta-glomérulaire.

La macula densa est un déterminant essentiel du Système Rénine-Angiotensine-Aldostérone, puisqu'elle est l'un des trois médiateurs de la sécrétion de rénine (avec les barorécepteurs locaux et l'innervation sympathique). Les cellules de la macula densa détectent les variations de la concentration en sodium et en chlore dans le fluide tubulaire, et sécrètent des facteurs paracrines - dont la PGE2, qui vont agir notamment, au niveau des cellules juxtaglomérulaires de l'artériole afférente pour stimuler la sécrétion de rénine. Il est alors vraisemblable qu'un dysfonctionnement des canaux ClC-K dans la macula densa puisse perturber fortement la signalisation vers les cellules à rénine.

En conclusion, durant ces quinze dernières années, de nouvelles découvertes ont modifié en profondeur notre compréhension du transport de NaCl dans le néphron distal en particulier, et ont mis en évidence l'importance de la régulation du transport de chlore - notamment via les canaux ClC-K, dans la régulation de balance du NaCl et de la pression sanguine.

2. Localisation du complexe ClC-Kb/Barttin dans le rein

Les protéines ClC-K et la Barttin sont exclusivement exprimées dans le rein et l'oreille interne. La localisation de la Barttin est superposée à celle des deux isoformes ClC-K ; ce qui indique que ces protéines forment un complexe protéique stable (Estevez et al., 2001; Rickheit et al., 2008). En raison de la très forte homologie de séquences (environ 90 %) entre ClC-Ka et ClC-Kb, il n'existe pas d'anticorps spécifiques de l'une ou l'autre des deux isoformes, si bien que la détermination de la répartition cellulaire de ces canaux a été compliquée à établir. Afin de contourner ce problème, deux types d'études ont permis de déterminer la localisation de mClC-K2/ClC-Kb chez la souris. On a pu observer le pattern d'expression de ClC-K2 dans un modèle de souris inactivées pour ClC-K1 (Kobayashi, Uchida, Mizutani, Sasaki, & Marumo, 2001), de même que dans un modèle de souris exprimant l'EGFP sous le contrôle du promoteur de ClC-Kb (Kobayashi et al. 2002). Ces études révèlent que les canaux mClC-K2 et ClC-Kb sont principalement présents à la membrane basolatérale de la branche large ascendante de l'anse de Henlé, du tubule contourné distal, et des cellules intercalaires du canal collecteur.

Quant au complexe ClC-K1/Barttin, il est surtout localisé dans la branche fine ascendante de l'Anse de Henlé (tAL) (Estevez et al., 2001; Nomura et al., 2011), où il joue un rôle important dans le système de concentration de l'urine. Ce rôle est d'autant plus mis en avant qu'on observe un défaut de la capacité à concentrer l'urine chez les souris inactivées pour ClC-K1 (Matsumura et al., 1999). Concernant la localisation des ClC-K dans la branche fine de l'Anse de Henlé, des résultats contradictoires ont été proposés, notamment par Uchida et al. qui ont rapporté que les canaux étaient exprimés aux pôles apical et basolatéral des cellules (Uchida et al., 1995), tandis que d'autres les ont trouvés uniquement à la membrane basolatérale dans ce segment (Vandewalle et al., 1997).

La Barttin a été retrouvée exclusivement à la membrane basolatérale de tous les segments du néphron dans lesquels elle est exprimée, soit l'anse de Henlé, le DCT et le CD (Birkenhager et al., 2001; Estevez et al., 2001). Par conséquent, si ClC-K1 (et ClC-Ka humain) est localisé à la membrane apicale, il lui faudrait probablement une autre sous-unité accessoire pour pouvoir fonctionner (Barrallo-Gimeno et al., 2015).

3. Transport de NaCl et fonction de ClC-Kb/Barttin dans le rein

Les reins filtrent environ 25500 mmoles de sodium (Na^+) par jour. Cette quantité de sodium est équivalente à celle contenue dans 1,5kg de sel de table (NaCl), et représente presque 9 fois la quantité totale de sodium contenue dans le milieu extracellulaire. Chez un individu consommant un régime occidental typique, plus de 99% du NaCl filtré sera réabsorbé, et seule une infime quantité sera excrétée dans l'urine.

Le NaCl est réabsorbé tout au long du néphron par des mécanismes variés. **Le tubule proximal** réabsorbe la plus grande fraction de la charge en NaCl filtré, soit environ 65%. La réabsorption dans ce segment est iso-osmotique, car la concentration de [Na^+] dans le fluide tubulaire est la même que dans le plasma. **L'anse de Henlé** réabsorbe environ 25% du NaCl filtré. À cause de la faible perméabilité à l'eau dans la TAL, ce segment réabsorbe le sodium plus rapidement que l'eau ; par conséquent, la concentration de [Na^+] dans le fluide tubulaire qui arrive au DCT est considérablement réduite. **Le néphron distal** réabsorbe la plus petite fraction de la charge en NaCl filtré. Environ 5% de la charge en NaCl est réabsorbée dans le DCT, le CNT et le CCD et, finalement, 3% est réabsorbé dans la partie médullaire du CD. Bien que le néphron distal ne réabsorbe qu'une petite quantité du NaCl filtré, il peut mettre en place un fort gradient de concentration transépithélial, et est sensible à plusieurs hormones dont l'aldostérone et l'arginine vasopressine (AVP).

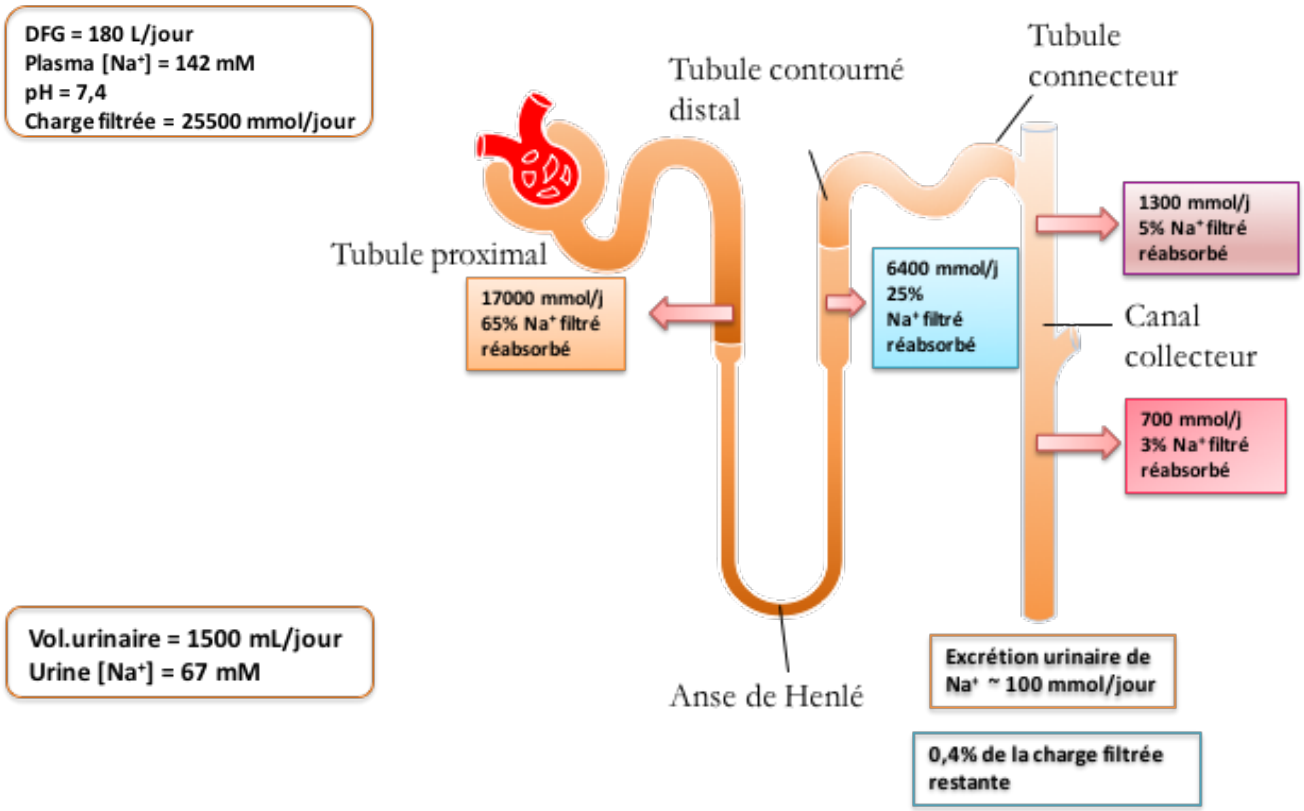


Figure 21: Réabsorption du Na^+ filtré le long du néphron.
D'après Medical physiology, Boron and Boulpaep

Le transport rénal du NaCl obéit à certaines constantes. L'entrée du sodium au pôle apical de la cellule est médiée par différents systèmes de transport, spécifiques de chaque segment du néphron. En revanche, la pompe Na^+/K^+-ATPase basolatérale est indispensable à la réabsorption transépithéliale de sodium tout au long du néphron hormis dans les cellules intercalaires. En effet, cette pompe permet de maintenir la concentration intracellulaire de sodium à une valeur basse (environ 15mM), et d'établir ainsi le gradient électrochimique nécessaire au fonctionnement d'un grand nombre de transporteurs et de canaux de la membrane apicale. Enfin, elle assure seule, dans la très grande majorité des cas, l'étape basolatérale du transport de sodium (contre son gradient électrochimique). Pour ces raisons, elle est exprimée de façon très abondante dans les cellules épithéliales.

À ce jour, les mécanismes de transport transcellulaire du chlore sont moins bien décrits que ceux du sodium. Les canaux ClC-Ka et ClC-Kb sont les canaux chlore les plus importants pour la fonction rénale chez l'homme. La fonction principale du canal ClC-Kb/Barttin, dans la TAL, le DCT et les cellules intercalaires du CD (Estevez et al., 2001), est d'assurer la sortie basolatérale des ions Cl^-. Le canal ClC-Kb/Barttin étant exprimé spécifiquement dans l'anse de Henlé et le néphron distal, le transport de NaCl sera détaillé uniquement dans ces segments.

3.1 Mécanismes de transport du NaCl dans la branche large ascendante de l'anse de Henlé

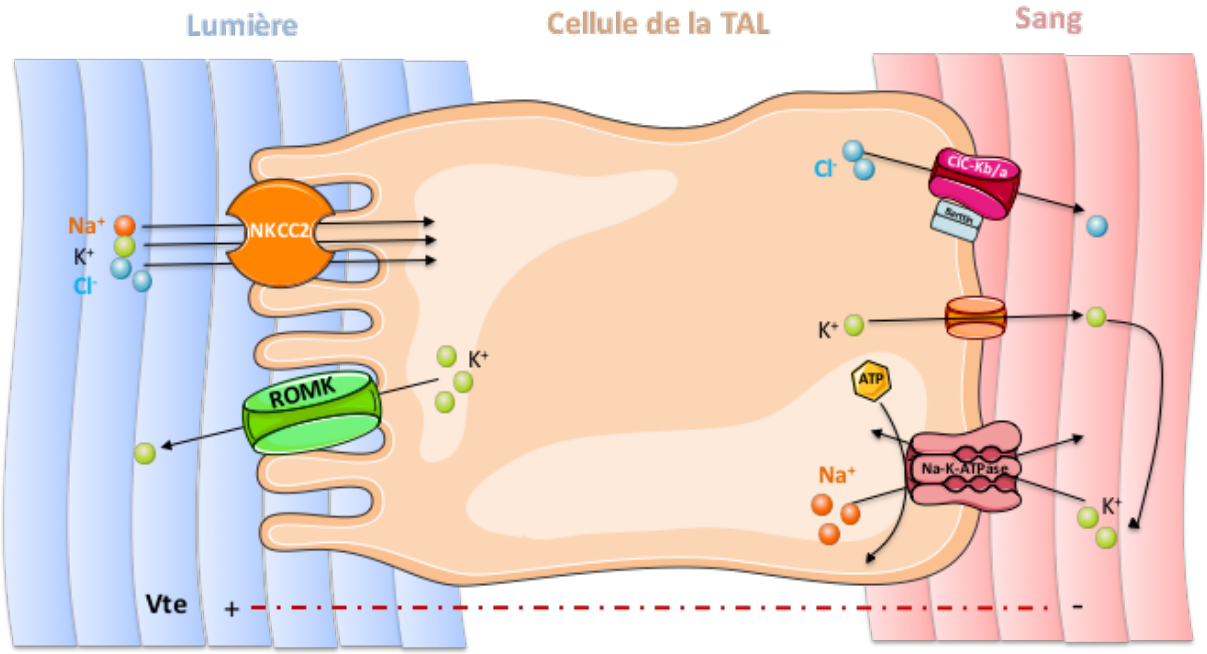


Figure 22: Mécanismes de réabsorption de NaCl dans les cellules de la TAL

La TAL réabsorbe environ 25% du NaCl filtré via un transport majoritairement transcellulaire. Le cotransporteur membranaire NKCC2 est responsable de la réabsorption apicale de NaCl. NKCC2 peut transporter un ion Na^+, un ion K^+ et deux ions Cl^-, et peut être inhibé par le furosémide, une molécule utilisée comme diurétique. Le potassium est recyclé dans la lumière tubulaire par le canal ROMK - un processus nécessaire à l'activité de NKCC2 (W. H. Wang, White, Geibel, & Giebisch, 1990) -, tandis que le sodium est réabsorbé au pôle basolatéral de la cellule via la pompe Na^+/K^+-ATPase. La sortie basolatérale du chlore s'effectue principalement grâce aux canaux ClC-Kb et, dans une moindre mesure, par ClC-Ka. Enfin, la différence de potentiel transépithélial positif dans la lumière - générée par les canaux potassiques apicaux et l'activité de NKCC2, permet la réabsorption paracellulaire de sodium, calcium, magnésium et potassium, accompagnée d'une rétrodiffusion de chlore (Quamme, 1997) [Figure 22].

Dans la partie corticale, la TAL est imperméable à l'eau, la réabsorption de NaCl favorise donc la dilution de l'urine en formation (un processus qui se poursuit dans le DCT). Cela permet d'établir une différence de pression osmotique entre la lumière du tubule et l'interstitium dans la partie médullaire, qui permettra alors une importante réabsorption d'eau au niveau du canal collecteur (Fahlke & Fischer, 2010). Enfin, la TAL est le moteur de la création du gradient de concentration cortico-papillaire dans la médullaire externe, qui va permettre de concentrer l'urine.

3.2 Mécanismes de transport du NaCl dans le tubule contourné distal

La régulation fine de la réabsorption du NaCl commence dans le DCT où environ 5% du NaCl filtré est réabsorbé via un transport exclusivement transcellulaire. Le cotransporteur membranaire Na^+-Cl^-, NCC, sensible aux diurétiques thiazidiques, est responsable de la réabsorption apicale du NaCl. Dans la partie terminale du DCT (DCT2), le canal sodique épithélial ENaC, sensible à l'amiloride, participe également à la réabsorption de NaCl. Au pôle basolatéral, le sodium est transporté dans l'interstium par la pompe Na^+/K^+-ATPase, et le chlore est réabsorbé par le canal ClC-Kb [Figure 23]. En effet, chez la souris, plusieurs études de patch-clamp en canal unitaire ont montré la présence d'un seul canal de 10pS dont les propriétés correspondent à celles attendues pour ClC-K2 (Lourdel et al., 2003; Teulon et al., 2005). Il est possible que ClC-Ka soit également exprimé dans le DCT sous forme inactive.

En effet, des études de RT-PCR sur des cellules isolées à partir de DCT micro-disséqués de souris, montrent que mClC-K2 s'exprime tout le long du DCT tandis que mClC-K1 est localisé préférentiellement dans le DCT2 (Nissant et al., 2004).

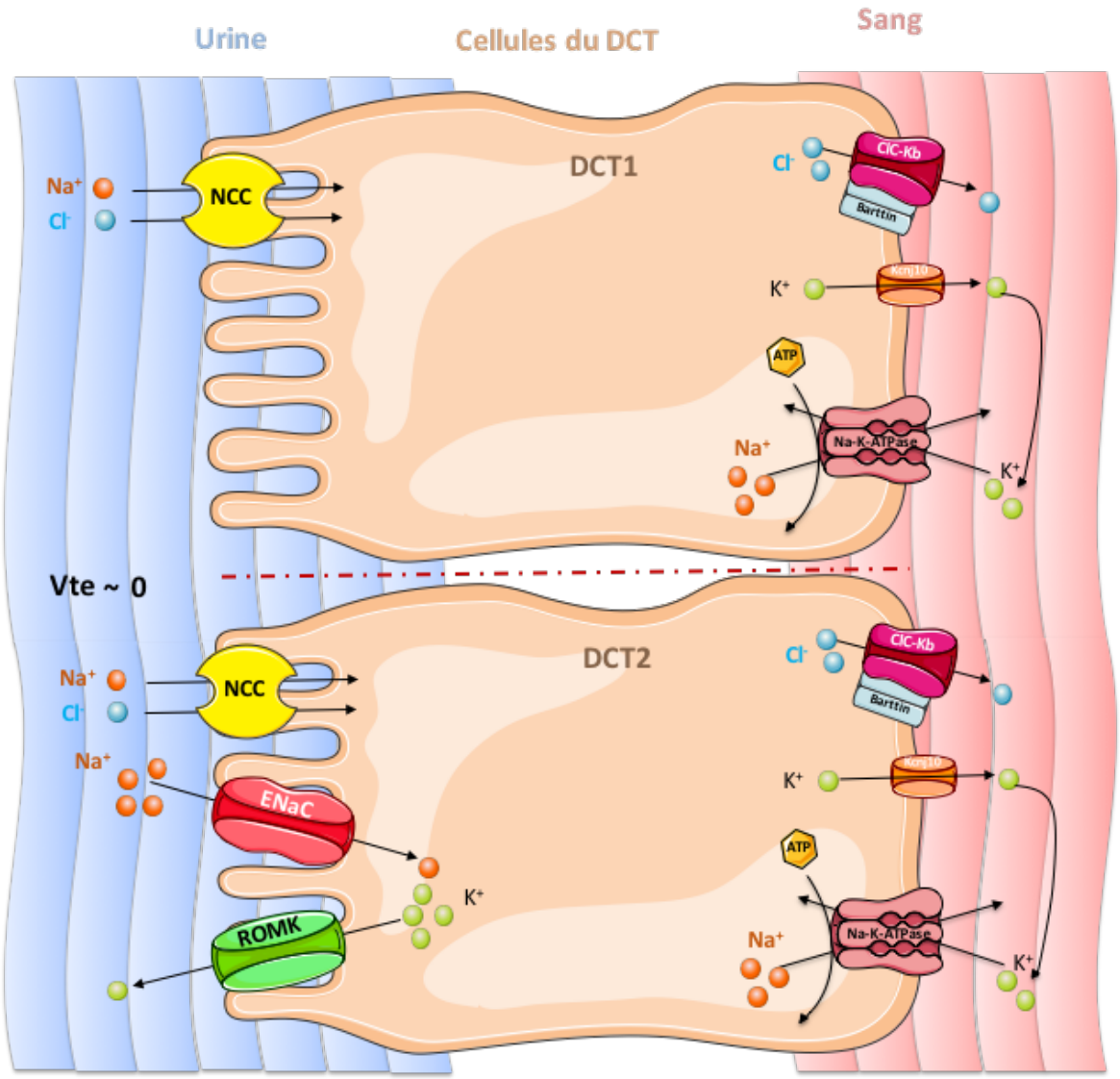


Figure 23: Mécanismes de réabsorption de NaCl dans les cellules du DCT
(D'après Eladari et al. 2014)

3.3 Mécanismes de transport du NaCl dans le tubule connecteur et le canal collecteur

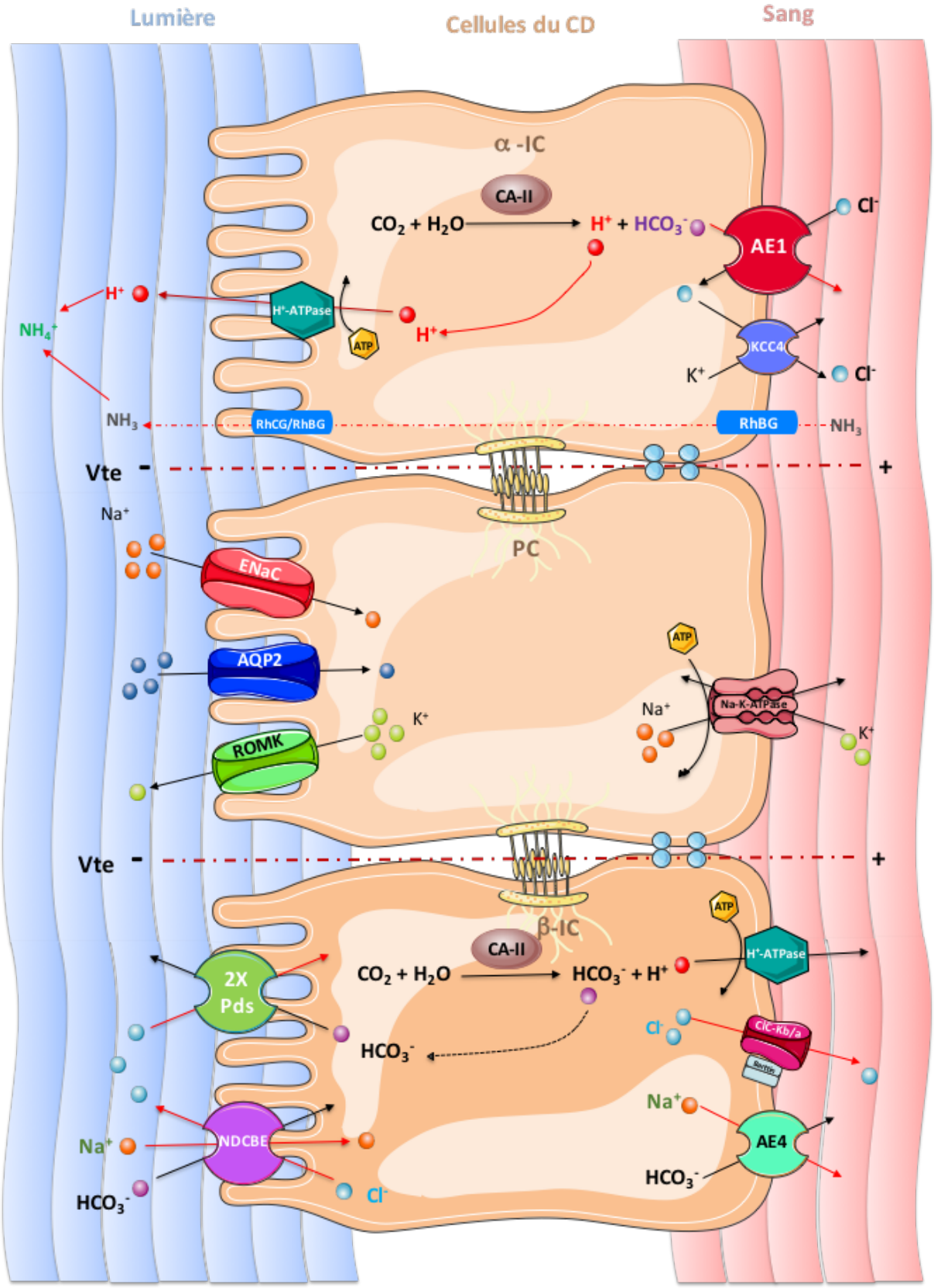


Figure 24: Mécanismes de réabsorption de NaCl dans les cellules du CD
(D'après Eladari et al. 2014)

Le tubule connecteur et le canal collecteur réabsorbent environ 3% de la charge en NaCl filtré. Ce segment hétérogène est composé de deux grands types cellulaires : les cellules principales et les cellules intercalaires qui ont chacune des fonctions spécifiques. Dans ce segment, le transport de sodium et de chlore sont découplés : Le transport de sodium s'effectue dans les cellules principales tandis que le chlore est transporté par voie transcellulaire dans les cellules intercalaires ou par voie paracellulaire.

Dans les cellules principales (PCs), le sodium est réabsorbé à la face apicale par le canal épithélial sodique ENaC. L'activité de ce canal génère la force électro-motrice nécessaire à la sécrétion apicale de potassium par le canal ROMK. La pompe Na^+/K^+-ATPase assure la réabsorption de sodium au pôle basolatéral [Figure 24]. L'expression du canal ENaC et de la pompe Na^+/K^+-ATPase est modulée par l'aldostérone, ce qui permet de réguler finement la réabsorption de NaCl en fonction de la charge en NaCl dans le fluide tubulaire (Rossier & Schild, 2008). La sécrétion d'aldostérone est stimulée par l'hypovolémie - où le système Rénine-Angiotensine-Aldostérone est activé, et par l'hyperkaliémie (Masilamani, Kim, Mitchell, Wade, & Knepper, 1999; Welling, Caplan, Sutters, & Giebisch, 1993). La réabsorption de Na^+ par le canal ENaC génère un potentiel transépithélial qui alimente la réabsorption paracellulaire de chlore. Plusieurs études ont suggéré que les Claudines 4 et 8 - deux protéines transmembranaires des jonctions serrées - seraient nécessaires pour le transport sélectif du chlore par la voie paracellulaire (Chambrey & Trepiccione, 2015).

Les PCs jouent également un rôle majeur dans la réabsorption d'eau car elles expriment les canaux hydriques Aquaporines 2, 3 et 4. Les protéines AQP3 et AQP4 sont exprimées constitutivement à la membrane basolatérale (Ecelbarger et al., 1995; Terris, Ecelbarger, Marples, Knepper, & Nielsen, 1995), tandis que les AQP2 sont stockées dans des vésicules sous-apicales. L'expression et la translocation de ces protéines à la membrane apicale sont contrôlées par l'arginine vasopressine (AVP), également appelée hormone antidiurétique (ADH) (Kwon et al., 2009). [Figure 24]

Les cellules intercalaires sont classiquement impliquées dans la régulation de l'équilibre acido-basique. Les cellules α-intercalaires assurent la sécrétion apicale de protons via la pompe H^+-ATPase et la réabsorption HCO_3^- par l'échangeur Cl^-/ HCO_3^-, AE1. À la membrane basolatérale, le recyclage du chlore est assuré par le cotransporteur KCC4 ou par le canal ClC-Kb (Estevez et al., 2001; Kobayashi et al., 2001; Kobayashi, Uchida, Okamura, Marumo, & Sasaki, 2002). [Figure 24]

Les cellules β-intercalaires permettent une réabsorption électroneutre de NaCl grâce au couple d'échangeurs Cl^-/ HCO_3^- Pendrine/NDCBE (Na^+-driven Cl^-/ HCO_3^- exchanger) (Leviel et al., 2010), sensible aux diurétiques thiazidiques. Les cellules β-intercalaires ont la particularité d'avoir une très faible activité de la pompe Na^+/K^+-ATPase ; dans ce cas, le transport de NaCl est donc plutôt alimenté par la pompe H^+-ATPase basolatérale (Chambrey et al., 2013). La pompe H^+-ATPase basolatérale favorise la génération de HCO_3^- en excrétant les H^+ via l'interstitium. Ce processus produit alors un gradient de HCO_3^-, dirigé vers la lumière. La Pendrine échange les ions HCO_3^- contre des ions Cl^- qui s'accumulent alors dans la cellule. Ce transport de Cl^- est le moteur pour la réabsorption de Na^+ et de HCO_3^- par NDCBE (*SLC4A8*) (Grichtchenko et al., 2001). À la membrane basolatérale, le canal ClC-Kb/Barttin est responsable de la réabsorption du chlore (Estevez et al., 2001; Kobayashi et al., 2001; Kobayashi et al., 2002; Nissant et al., 2006). Le cotransporteur K^+-Cl^-, KCC4, est probablement aussi impliqué dans le transport basolatéral du chlore (Eladari, Chambrey, Picard, & Hadchouel, 2014). Quant à la sortie de Na^+, elle est assurée quant à elle par l'échangeur Na^+- HCO_3^-, AE4 (*SLC4A9*) (Chambrey et al., 2013) [Figure 24].

Ainsi, dans ce segment du néphron, le complexe ClC-Kb/Barttin est impliqué à la fois dans le maintien de l'équilibre acido-basique et dans la réabsorption de NaCl. Cela est souligné par le fait que des mutations de ClC-Kb ou de la Barttin sont responsables du Syndrome de Bartter qui se traduit notamment par une perte rénale de sel et une alcalose métabolique (Simon et al., 1997).

4. Le Syndrome de Bartter

4.1 Etiologies

Le syndrome de Bartter est un groupe de maladies génétiques à transmission autosomique récessive, caractérisées par un défaut de concentration urinaire, une polyurie, une polydipsie, une hypokaliémie, une alcalose métabolique, des concentrations plasmatiques élevées de rénine et d'aldostérone, et une pression artérielle normale à basse. Cette maladie a une prévalence d'environ 1/1000000. Le syndrome de Bartter a été décrit pour la première fois par l'endocrinologue Frederic Bartter (Bartter, Pronove, Gill, & Maccardle, 1962) et, sur le plan clinique, on peut distinguer deux formes de la maladie : une forme classique et une forme anténatale ou infantile. Le syndrome de Bartter classique est généralement diagnostiqué durant l'enfance et est associé à un retard de croissance, une faiblesse musculaire et une calciurie normale à élevée et conduit rarement à une néphrocalcinose ou à une insuffisance rénale (Briet, Vargas-Poussou, Lourdel, Houillier, & Blanchard, 2006; Brochard et al., 2009).

Le syndrome de Bartter anténatal, également appelé syndrome d'hyperprostaglandine E à cause de la concentration élevée de PGE2 dans le sang et l'urine, constitue la forme la plus sévère de cette affection (Hebert, 2003). La perte de sel et d'eau entraine un polyhydramnios anténatal qui se traduit généralement par une naissance prématurée. Ces enfants présentent une polyurie congénitale aggravée par de sévères épisodes de déshydratation, des vomissements, un retard de croissance, une faiblesse musculaire, une hypercalciurie et développent parfois une néphrocalcinose (Briet et al., 2006; Brochard et al., 2009). Une des variantes du syndrome de Bartter anténatal, associée à une surdité, est particulièrement sévère, car la majorité des patients développent très tôt une insuffisance rénale (Briet et al., 2006).

Dans certains cas, on observe un syndrome mixte Bartter-Gitelman. Le syndrome de Gitelman est une maladie moins sévère que le syndrome de Bartter car elle cause souvent une hypokaliémie asymptomatique, et est diagnostiquée à la fin de l'enfance ou pendant la vie adulte. Ce syndrome se caractérise par une perte rénale de sel, un hyperaldostéronisme secondaire, une hypokaliémie, une hypocalciurie et une hypomagnésémie et, parfois des faiblesses musculaires (Briet et al., 2006; Brochard et al., 2009). L'hypocalciurie et l'hypomagnésémie distinguent le syndrome de Gitelman du syndrome de Bartter, caractérisé plutôt par une hypercalciurie (Briet et al., 2006; Pearce, 1998).

Plusieurs symptômes du syndrome de Bartter s'expliquent aisément :

- **La perte rénale de sel** reflète le défaut de réabsorption du NaCl au niveau de la TAL, dans le cas du Bartter, ou du DCT, dans le cas du Gitelman
- **La polyurie**, caractéristique du syndrome de Bartter, est secondaire au défaut de réabsorption du NaCl dans la TAL qui entraine une diminution du gradient de concentration cortico-papillaire et, ainsi, un défaut de concentration urinaire.
- **L'hyperaldostéronisme** secondaire est consécutive à l'hypovolémie causée par la diminution de la réabsorption du NaCl. Il entraine une suractivation du canal ENaC dans les PCs pour essayer de compenser la perte de sodium.
- **L'hypokaliémie** est une conséquence indirecte de l'activation du canal ENaC qui augmente le gradient électrochimique pour la sécrétion de K^+ par le canal ROMK dans les PCs.
- **L'hypercalciurie**, représentative du syndrome de Bartter, est la conséquence de la diminution de la réabsorption paracellulaire de calcium au niveau de la TAL. Elle est causée par une baisse du potentiel transépithélial, suite au défaut de réabsorption du NaCl. De ce fait, on s'attendrait à observer également une hypermagnésurie dans le syndrome de Bartter puisque 80% du magnésium sont absorbés dans la TAL. La diminution de la réabsorption paracellulaire dans la TAL doit donc être compensée au niveau du DCT.

À l'heure actuelle, on dispose uniquement de traitements symptomatiques du syndrome de Bartter pour réduire la perte de sel et l'hypokaliémie, ainsi que pour stabiliser, voire relancer, la croissance (Brochard et al., 2009).

4.2 Données génétiques

Des études de génétique humaine ont permis de mettre en évidence cinq gènes responsables des différents types de Syndrome de Bartter. Tous ces gènes codent pour des canaux ou des transporteurs exprimés dans la TAL ou le néphron distal, et sont impliqués dans la réabsorption de NaCl [Figure 24].

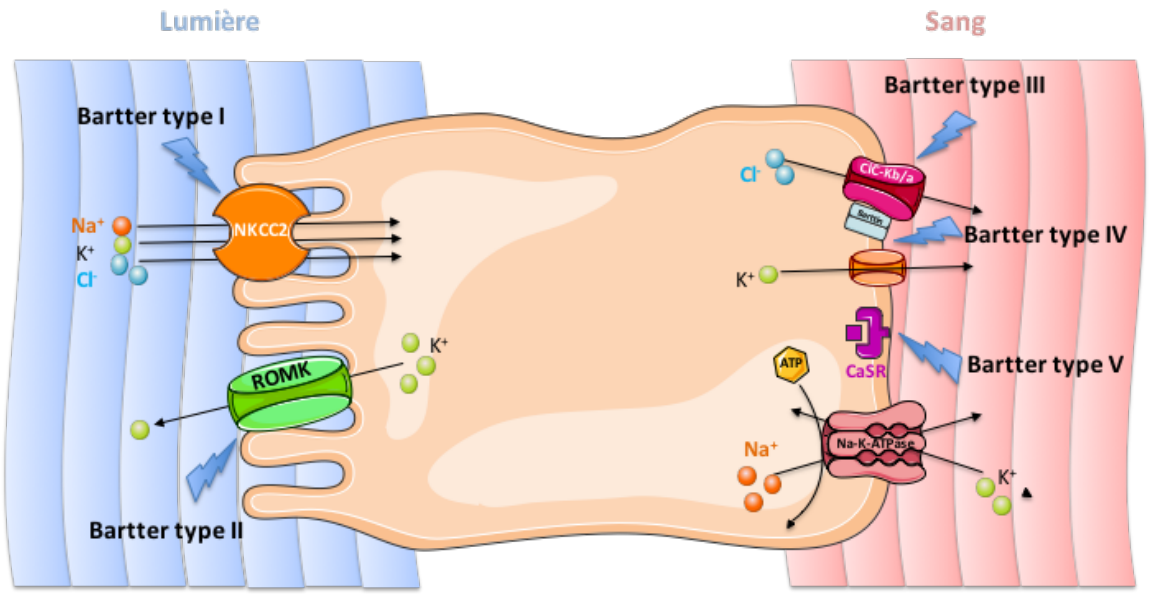


Figure 25: Les différents types de Syndrome de Bartter

Les syndromes de Bartter de type I et de type II sont causés par des mutations perte de fonction dans les gènes codant respectivement pour NKCC2 et ROMK (Simon et al., 1996). Le Bartter de type V est causé par des mutations gains de fonctions du récepteur sensible au calcium, CaSR, qui est exprimé à la membrane basolatérale des cellules de la TAL. L'activation constitutive de CaSR inhibe NKCC2 et ROMK et, par conséquent, la réabsorption de NaCl (Hebert, 2003).

Le syndrome de Bartter classique ou de type III est causé par des mutations pertes de fonction du gène *CLCNKB* qui code pour le canal ClC-Kb (Simon et al., 1997). Les mutations pathogènes de *CLCNKB* peuvent être classées principalement en 2 groupes (Andrini et al., 2015):

- Des mutations qui altèrent complètement ou réduisent l'expression des canaux à la membrane
- Des mutations qui combinent une expression réduite des canaux à la membrane, et une altération des propriétés du canal.

Le Syndrome de Bartter de type IV est une variante rare et sévère du syndrome de Bartter qui combine une importante perte rénale de sel et une surdité congénitale. Cette pathologie est causée par des mutations du gène *BSND* qui entrainent une réduction ou une perte de fonction de la Barttin (Birkenhager et al., 2001). La perte de fonction de la Barttin conduit à un phénotype plus sévère que le syndrome de Bartter de type III, car il mime une perte de fonction des deux isoformes de ClC-K (Estevez et al., 2001). En effet, des mutations de perte de fonction simultanée de ClC-Ka et ClC-Kb entraînent aussi un syndrome de Bartter sévère avec surdité (Nozu et al., 2008; Schlingmann et al., 2004).

Jusqu'à présent, sept mutations du gène *BSND* ont été identifiées chez les patients : R8L (Birkenhager et al., 2001), R8W (Birkenhager et al., 2001), G10S (Birkenhager et al., 2001; Shalev, Ohali, Kachko, & Landau, 2003), G47R (Garcia-Nieto et al., 2006), Q32X (Kitanaka, Sato, Maruyama, & Igarashi, 2006) et E88X (Ozlu et al., 2006). De plus, une autre mutation I12T a été retrouvée dans quatre familles avec une surdité, mais sans atteinte rénale (Riazuddin et al., 2009). [Figure 25]

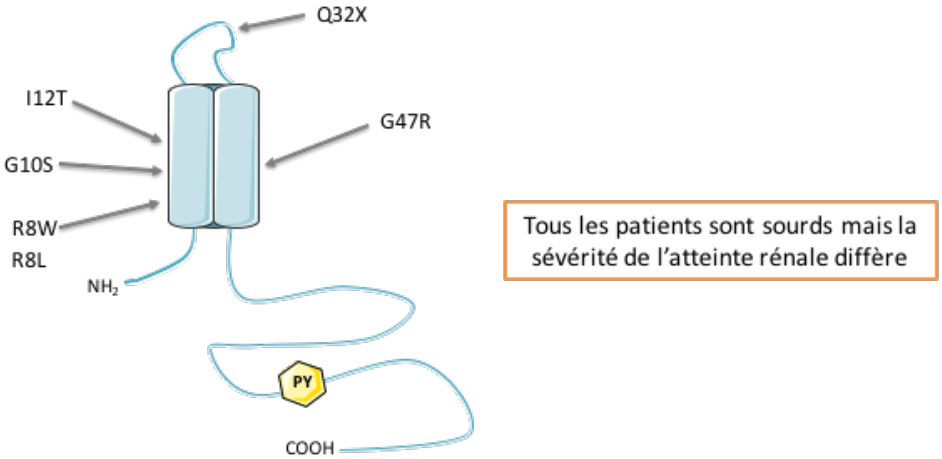


Figure 26: Mutations de la Barttin associées au Bartter de type IV

Exprimées dans des cellules MDCK ou l'oocyte de Xénope, les trois mutations faux-sens R8L, R8W et G10S conduisent à une perte de fonction des canaux ClC-K/Barttin mais n'empêchent pas leur insertion à la membrane plasmique (Estevez et al., 2001; Janssen et al., 2009). Cependant, Hayama et al. ont montré que, *in vitro*, la mutation R8L entraine la rétention de la Barttin dans le cytosol. En accord avec ces derniers résultats, l'analyse du phénotype des souris porteuses de la mutation R8L de la Barttin, confirme un défaut d'adressage à la membrane de la protéine mutante (Nomura et al., 2011).

Un autre mutant de la Barttin (G47R), qui produit un phénotype rénal modérée, est capable d'assurer les mêmes fonctions que la Barttin WT *in vitro*, mais interagit avec les canaux ClC-K moins efficacement (Janssen et al., 2009). La mutation non-sens E88X affecte la distribution polarisée de la Barttin. En effet, elle est exprimée à la membrane apicale et basolatérale de façon équivalente (Janssen et al., 2009). Enfin, une autre mutation non-sens de la Barttin, Q32X, permet l'interaction de la Barttin avec ClC-Kb mais empêche l'expression du complexe à la membrane ainsi que l'activation de ClC-Kb (Janssen et al., 2009).

Ainsi, la variété des défauts fonctionnels de la Barttin, à l'origine du Bartter de type IV, est sans doute la cause de la diversité phénotypes observés.

Les différentes mutations de la Barttin et défauts associés sont résumés dans le tableau ci-après.

Tableau 2: Les mutations pathogènes de la Barttin

Mutation	Dysfonction du canal	Atteintes rénales
I12T	Défaut de trafic des ClC-K	Pas de symptômes
G47R	Activation partielle de ClC-K	Phénotype très modéré
R8L, R8W, G10S	Pas d'activation de ClC-K	Phénotype sévère sans insuffisance rénale
Q32X	Défaut de trafic cellulaire et d'activation des ClC-K	Insuffisance rénale
E88X	Distribution membranaire de la Barttin altérée	Phénotype sévère

OBJECTIF DE L'ÉTUDE

Comme nous l'avons vu, le transport de NaCl dans le rein joue un rôle essentiel dans la régulation de la pression artérielle, et les canaux chlore ClC-K sont indispensables à la réabsorption du NaCl dans le néphron distal. Les canaux ClC-Kb sont exprimés au pôle basolatérale des cellules de la branche large de l'Anse de Henlé (TAL), du tube contourné distal (DCT) et dans les cellules intercalaires du tubule connecteur (CNT) et du canal collecteur (CD). ClC-Kb nécessite la présence de sa sous unité accessoire, la Barttin, pour fonctionner.

L'importance du complexe ClC-Kb/Barttin a été mis en évidence par plusieurs maladies génétiques. En effet, des mutations de ClC-Kb et de la Barttin donnent deux formes du syndrome de Bartter, une tubulopathie de perte de sel associée à une pression artérielle normale à basse. Cependant, les mécanismes de regulation du transport de chlore par ces canaux demeurent encore mal connus.

La phosphorylation étant l'un des mécanismes de régulation les plus fréquents des canaux et transporteurs de NaCl dans le rein, nous avons effectués une analyse du phosphoprotéome de canaux collecteurs isolés de souris par une approche de spectrométrie de masse semi-quantitative. Nous avons alors identifié un résidu sérine sur la Barttin, conservé parmi les espèces, dont la phosphorylation est accrue lorsque les souris sont soumises à un régime sans sel (0% Na^+).

La réabsorption de chlore par le néphron distal étant stimulée par la déplétion en sel, nous avons étudié le rôle de ce site de phosphorylation dans la régulation du transport de chlore par les canaux ClC-Kb/Barttin.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. Expression hétérologue et Mutagénèse

1. Expression dans l'oocyte de Xénope et les lignées cellulaires

Pour étudier la fonction et la distribution cellulaire de ClC-kb/hBarttin, nous avons utilisé plusieurs types de système d'expression hétérologue : l'oocyte de Xénope et deux lignées cellulaires différentes, les cellules MDCK II et HEK293T. La fonction et la distribution cellulaire de ClC-kb/hBarttin sont comparables dans ces deux lignées cellulaires (Imbrici, Liantonio, Gradogna, Pusch, & Camerino, 2014; Scholl et al., 2006) et ces deux systèmes sont bien adaptés pour des analyses biochimiques. Les cellules HEK293T expriment abondamment le complexe ClC-kb/hBarttin et conviennent bien aux analyses par immunoblots. La lignée cellulaire MDCK II est un modèle très utilisé et validé pour l'étude de la distribution cellulaire dans des cellules épithéliales.

Les cellules MDCK II et HEK293T sont transfectées avec de l'ADN plasmidique codant pour ClC-Kb et la Barttin humaine en utilisant de la Lipofectamine 3000 (Waltham, MA USA) ou de l'Effectene (Qiagen, Valencia, CA, USA), deux réactifs de transfection par fusion des liposomes. Dans certaines expériences, des protéines avec des tags, ClC-Kb-Flag et hBarttin-myc ou des protéines fusions, YFP-ClC-Kb et hBarttin-CFP, ont été utilisées. L'épitope Flag (séquence a.a : DYKDDDDK) a été inséré au niveau de la boucle extracellulaire située entre les hélices L et M de ClC-Kb, et l'épitope Myc (séquence a.a : EQKLISEEDL) a été inséré à l'extrémité C-terminale de la Barttin. La YFP (Yellow Fluorescent Protein) est insérée à l'extrémité N-terminale de ClC-Kb ; et la CFP à l'extrémité C-terminale de la hBarttin.

Les différents plasmides utilisés sont résumés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 3: Vecteurs d'expression	
Vecteurs pour l'expression dans l'oocyte de Xénope	**Vecteurs d'expression dans les cellules en culture**
pTLN_ClC-Kb	prcCMV_YFP-ClC-Kb
pTLN_ClC-Kb-eGFP	pcDNA3.1_hBarttin-CFP
pT7T3_hBarttin	pV2_ClC-Kb-Flag_hBarttin-myc

Les plasmides prcCMV_YFP-ClC-Kb et pcDNA3.1_hBarttin-CFP nous ont été gracieusement fournis par les Dr Ute Scholl et Christoph Fahlke.

2. Mutagénèse dirigée

Les mutants de la Barttin ont été construits avec le kit QuikChange II Site-Directed Mutagenesis (Stratagene, La Jolla, Californie, USA). Deux types de mutants de phosphorylation de la Barttin ont été générés : une forme non phosphorylable où la Sérine (S) est changée en Alanine (A), et une forme phosphomimétique où la Sérine (S) est changée en Glutamate (E), un acide aminé dont la structure est proche d'une sérine phosphorylée. Pour toutes les constructions, les produits de PCR, ont été vérifiés par séquençage et deux clones indépendants ont été utilisés pour les expériences de distribution cellulaire.

Les différentes amorces de mutagénèse utilisées sont présentées dans le tableau ci-après.

Tableau 4: Amorces de mutagénèse de la hBarttin
S93A
GAT-GAA-GAG-CCC-CGC-TCC-CCA-GCC-GCC-C
GGG-CGG-CTG-GGG-AGC-GGG-GCT-CTT-CAT-C
S93E
CGA-GAT-GAA-GAG-CCC-CGA-GCC-CCA-GCC-GCC-CTA-TG
CAT-AGG-GCG-GCT-GGG-GCT-CGG-GGC-TCT-TCA-TCT-CG
Y98A
GTC-CCC-AGC-CGC-CCG-CTG-TAA-GGC-TGT-GGG
CCC-ACA-GCC-TTA-CAG-CGG-GCG-GCT-GGG-GAC

II. Électrophysiologie

Pour les expériences d'électrophysiologie, les oocytes de Xénope sont utilisés à leur stade mature, lorsqu'ils mesurent 1,2 à 1,3 mm de diamètre, et peuvent être conservés à 16°C dans une solution Barth à pH 7,4 [Tableau 6], contenant de la gentamycine (20 mg/L). Les ovocytes utilisés ont été fournis par la société Ecocyte Bioscience (Castrop-Rauxel, Allemagne). Les oocytes sont injectés avec les ARNs ClC-Kb et hBarttin qui ont été transcrits *in vitro* à partir des plasmides pTLN_ClC-Kb et pT7T3_hBarttin. Les plasmides pTLN_ClC-Kb et pT7T3_hBarttin ont d'abord été linéarisés par digestion avec les enzymes de restriction MluI et NotI respectivement, puis, ont été transcrits avec les kits de transcription *in vitro* SP6 et T7 mMessage mMachine (Ambion, Austin, Texas, USA).

1. Injection des oocytes

Chaque ovocyte est immobilisé au fond d'une boite de Pétri, contenant de la solution de Barth à pH7,4 supplémentée en gentamycine. Les ARNm d'intérêt sont injectés dans les oocytes sous une loupe binoculaire. Les pipettes d'injection (Drummond Scientific Company, Broomall, Pennsylvanie, USA) sont étirées par une étireuse de pipette verticale (Pipette Puller modèle 720 ; David Kopf Instruments, Tujunga, Californie, USA). Elles sont reliées à un injecteur à pression d'air (InjectMatic, Genève, Suisse), réglé pour injecter 50nL de solution par ovocyte. Les ovocytes sont conservés dans de la solution Barth-gentamycine pendant 48 à 72 heures, à 16°C afin de permettre l'expression des protéines et leur adressage à la membrane.

2. Voltage-clamp en double microélectrodes (TEVC)

La technique de voltage-clamp en double microélectrodes (TEVC) est une approche couramment utilisée pour étudier les propriétés biophysiques des canaux. Cette technique consiste à introduire deux microélectrodes à l'intérieur d'un ovocyte, préalablement injecté. Pour chaque expérience, les oocytes sont injectés avec 10ng d'ARN ClC-Kb et 5ng d'ARN hBarttin. Les oocytes non injectés et injectés avec le mix d'ARN ClC-Kb + hBarttin WT servent de contrôles pour chaque expérience. Les oocytes sont placés dans la chambre de perfusion et perfusé avec des solutions de composition différente. L'activité du ClC-Kb varie en fonction de la concentration en Ca^{2+} et du pH du milieu extracellulaire.

Pour chaque enregistrement, les oocytes sont perfusés avec une solution inhibitrice, une solution contrôle et une solution activatrice afin d'être sûre d'enregistrer les courants chlore générés par ClC-Kb [Tableau 6].

La première électrode est connectée à un circuit électronique permettant de mesurer le potentiel de membrane (V). Un amplificateur mesure les différences entre le potentiel de membrane et un potentiel de commande (Vc) dont la valeur est fixée par l'expérimentateur. La sortie de cet amplificateur est reliée à la seconde électrode. Le courant mesuré représente le courant global (I) généré en réponse aux voltages imposés [Figure 26]. Le protocole de voltage-clamp utilisé impose à la membrane de l'ovocyte une série de créneaux de voltages de -160 à +100mV par paliers de 20 mV, durant 800msec chacun, à partir d'un potentiel de maintien de -30mV.

Les électrodes sont préparées à partir de tubes capillaires de borosilicate (Harvard Apparatus, Edenbridge, Kent, UK), et sont étirées par une étireuse de pipette horizontale (Micropipette Puller modèle P97 ; Sutter Instrument Company, Novato, Californie, USA). Elles sont remplies d'une solution conductrice de KCl 3M. Leur résistance est comprise entre 0,1 et 1 MΩ. Les microélectrodes sont reliées à un amplificateur TEC-10CX (npi electronic GmbH, Tamm, Allemagne) par l'intermédiaire de fils d'argent chlorés. Cet amplificateur est lui-même relié à une interface analogique-numérique Digidata 1320A (Axon Instruments, Union City, Californie, USA). Les signaux provenant de l'amplificateur sont enregistrés et analysés avec le logiciel pCLAMP 10.0 (Axon Instruments, Union City, Californie, USA). La chambre de perfusion est déposée sur une table antivibratoire sur laquelle repose la cage de Faraday. Ces deux éléments garantissent la protection mécanique et électrique de la préparation.

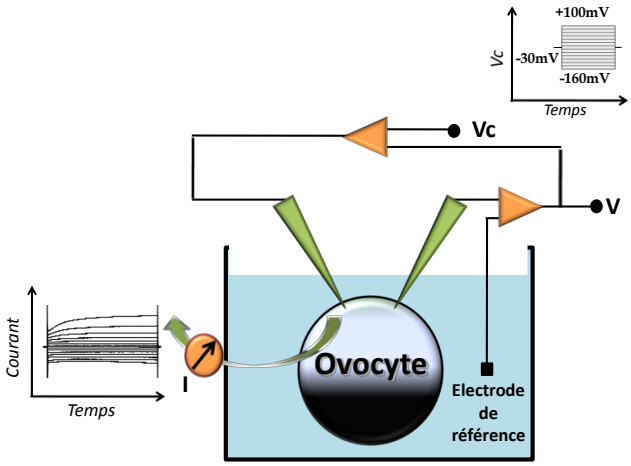


Figure 27: Schéma du dispositif de voltage-clamp en double microélectrodes (TEVC).
Un système électronique permet le maintien d'un potentiel de commande (Vc) à une valeur fixe pendant une durée déterminée. Une microélectrode mesure le potentiel de membrane (V), tandis qu'une seconde, reliée au système électronique, recueille le courant global généré (I), enfin une électrode de référence ferme le circuit appliqué à l'oocyte de Xénope. (D'après Keck.M, 2012)

Tableau 5: Composition des solutions d'élétrophysiologie						
Solution	**Composition de la solution**					
Barth, pH 7,4	88mM NaCl	1mM KCl	0,4mM $CaCl_2$	0,3mM $Ca(NO_3)_2$	0,8mM $MsSO_4$	10mM Hepes
ND-120, 1Ca^{2+},pH 5,0 Solution Inhibitrice	120mM NaCl	2mM KCl	1mM $CaCl_2$	1mM $MgCl_2$	5mM MES	
ND-120, 3Ca^{2+},pH 7,4 Solution Contrôle	120mM NaCl	2mM KCl	3mM $CaCl_2$	1mM $MgCl_2$	5mM HEPES	
ND-80, 20Ca^{2+},pH 9 Solution activatrice	80mM NaCl	2mM KCl	20mM $CaCl_2$	1mM $MgCl_2$	5mM TRIS	
ND-120, NaI ,pH 7,4 Solution activatrice	120mM NaI	2mM KCl	1mM $CaCl_2$	1mM $MgCl_2$	5mM HEPES	

III. Analyse biochimique de l'expression et de l'insertion membranaire du complexe ClC-Kb/Barttin

1. Analyse de l'expression membranaire de ClC-Kb dans l'oocyte

Cette technique permet de déterminer le niveau d'expression à la membrane plasmique d'une protéine d'intérêt, grâce à l'utilisation d'une protéine fusion couplée à un tag fluorescent. Ici, j'ai utilisé une protéine fusion ClC-Kb-eGFP où le tag eGFP (enhanced Green Fluorescent Protein) est inséré au niveau de la boucle extracellulaire située entre les hélices L et M de ClC-Kb. Afin de déterminer les quantités d'ARNc à injecter pour ne pas être à saturation du système, j'ai réalisé une gamme dose-réponse avec les constructions *wild-type* de ClC-Kb-eGFP et de la hBarttin (ClC-Kb-eGFP WT et hBarttin WT). Le ratio entre ClC-Kb-eGFP et la hBarttin est de 2 : 1 [Figure 27].

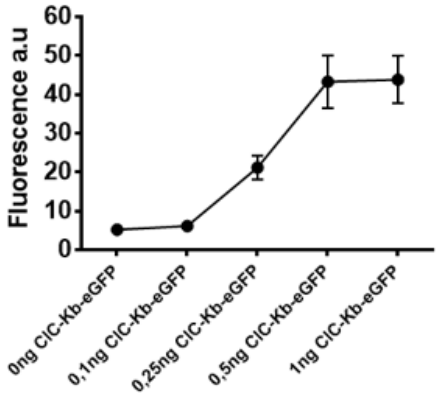


Figure 28: Gamme dose-réponse ClC-Kb-eGFP + hBarttin
. Les oocytes ont été injectés avec différents mélanges d'ARN de ClC-Kb-eGFP + hBarttin WT afin de déterminer les quantités optimales pour détecter la fluorescence dans ces conditions. Le ratio ClC-Kb-eGFP : hBarttin WT est 2 : 1

D'après cette gamme, la quantité d'ARNc médiane à injecter sont de 0,25ng d'ARNc ClC-Kb-eGFP WT et 0,125ng d'ARNc hBarttin. Après injection, les oocytes sont conservés 72h dans une solution de Barth-gentamicine pour permettre l'expression des protéines. La fluorescence à la membrane des oocytes est ensuite observée en microscopie confocale (Zeiss LSM 710). La fluorescence est quantifiée avec le logiciel d'analyse d'image, ImageJ. Compte tenu de la très grande variabilité du modèle oocyte dans l'expression des protéines, un minimum de 30 oocytes par groupe, issus de 5 expériences indépendantes, a été sélectionné. Est considéré comme « non exprimé » et exclu de la moyenne, un oocyte dont la fluorescence en unité arbitraire (u.a) est strictement inférieure à la fluorescence moyenne du groupe des oocytes non injectés (NI).

2. Analyse de l'expression de surface de la Barttin

L'expression de surface de la Barttin a été analysée en utilisant des cellules MDCK II transfectées transitoirement. Quarante-huit heures après transfection, les cellules sont incubées 40 min avec 0,25mg de biotine (Kit Pierce™ Cell Surface Protein Isolation) avant la lyse. Les protéines biotynylées sont purifiées par chomatographie d'affinité sur une collone NeutrAvidin et séparées par électrophorèse dans un gel de polyacrylamide, gradient 4-15%.

Les protéines sont ensuite transférées sur des membranes de nitrocellulose (Amersham) par électrophorèse pendant 2 h à 4°C. Les membranes sont colorées au rouge Ponceau afin de vérifier l'efficacité du transfert.
Les membranes sont incubées dans une solution de TBS-0,01%Tween-5% lait pendant 1 heure à température ambiante, afin de bloquer les sites de fixation de l'anticorps non spécifiques. Les membranes sont incubées avec l'anticorps primaire (TBST-5% lait), à 4°c et sous agitation, pendant une nuit. Après plusieurs lavages avec une solution de TBS-0,01%Tween, les membranes sont incubées avec l'anticorps secondaire conjugué à la HRP (TBST-5% lait) pendant 2 heures à température ambiante. Après plusieurs lavages avec du TBS-0,01%Tween, les protéines sont révélées avec une solution de chemiluminescence (ECL, Perkin Elmer Life Science Products), et l'appareil LAS 4000 mini (Fugifilm).
Anticorps primaires: mouse anti-myc 1:1000 (Cell Signaling Technology); mouse anti-Flag M2 1 :1000 (Sigma).
Anticorps secondaires: Goat anti mouse 1:5000 (Jackson ImmunoResearch Lab)

3. Mesure de la stabilité du complexe ClC-Kb/Barttin

La demie vie du complexe ClC-Kb/Barttin a été analysée dans des cellules HEK-293T transfectées transitoirement. Les cellules sont incubées 0, 2, 4, 16 ou 24 h avec 100 µg/ml de cycloheximide. Les cellules sont lysées dans une solution de PBS contenant 1% Triton X100 et un cocktail d'anti-protéases (Complete ; Roche). La quantité de protéine totales est déterminée par la méthode de Bradford (microBradford, Bio Rad Laboratories) puis les protéines sont dénaturées dans un tampon de charge (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 2% SDS, 100 mM dithiotreitol, 10% glycérol et bleu de bromophénol), 15 à 30 minutes à température ambiante. La stabilité du complexe ClC-Kb/Barttin est analysée par immunoblot.

IV. Microscopie confocale

La microscopie confocale sur cellules vivantes a été réalisée avec des cellules MDCK II transfectées transitoirement. Ces cellules sont cultivées sur des lamelles traitées spécialement pour l'imagerie confocale (Ibidi, Martinsried, Germany) et dans un milieu DMEM FluoroBrite optimisé pour l'observation de fluorescence sur cellules vivantes. Les images sont prises après 2 ou 3 jours d'expression des protéines fusions YFP-ClC-Kb et hBarttin-CFP, avec un microscope confocal SP8 (Leica, Wetzlar, Germany). Quatre puits sont utilisés en réplicat pour chaque conditions et l'expérience a été répétée au moins 8 fois. Les images traitées avec logiciel d'analyse ImageJ.

V. Isolation de fragments tubulaires par COPAS (Complex Object Parametric Analyser Sorter)

Afin d'obtenir les préparations de tubules isolés, des souris transgéniques exprimant la GFP dans le canal collecteur ont été anesthésiées avec une solution de Kétamine (Narketan 10, 80 mg/kg body wt; Chassot, Belp, Switzerland) et Xylazine (Rompun, 33 mg/kg body wt; Bayer, Leverkusen, Germany). Les souris sont perfusées par le cœur avec 10ml d'une solution de PBS froid puis avec 10ml d'une solution de digestion (1mg/ml, Worthington ; 1mg/ml hyaluronidase, Sigma ; 0.1mg/ml DNaseI, SIGMA preparé dans une solution de KREBS froid : 145 mM NaCl, 10 mM HEPES, 5 mM KCl, 1 mM NaH2PO4, 2.5 mM CaCl2, 1.8 mM MgSO4, 5 mM glucose, pH 7.3). Les cortex des reins sont disséqués sous une loupe puis les échantillons sont finement émincés et digérés dans 10ml de solution de digestion à 37°C pendant 15 min. Les échantillons sont ensuite filtrés à travers des tamis en nylon de 250 et de 212-µm. Le filtrat est filtré à nouveau avec des passoires cellules de 100-µm et de 40-µm (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ). Les tubules retenus dans la passoire de 40-µm sont dilués dans 50ml de KREBS froid. Le tri des tubules est réalisé avec un COPAS (Union Biometrica, Somerville, MA). Les tubules triés sont directement collectés dans du KREBS-0,05% BSA froid puis sont centrifugés à 800g pendant 10min. Les protéines sont extraites du culot et sont utilisées pour l'analyse du phosphoprotéome.

VI. Phosphoprotéomique semi quantitative par marquage métabolique : SILAC ou « Stable Isotope Labelling by Amino acids in Cell»

Le principe général de la stratégie SILAC est présenté dans la Figure 29.

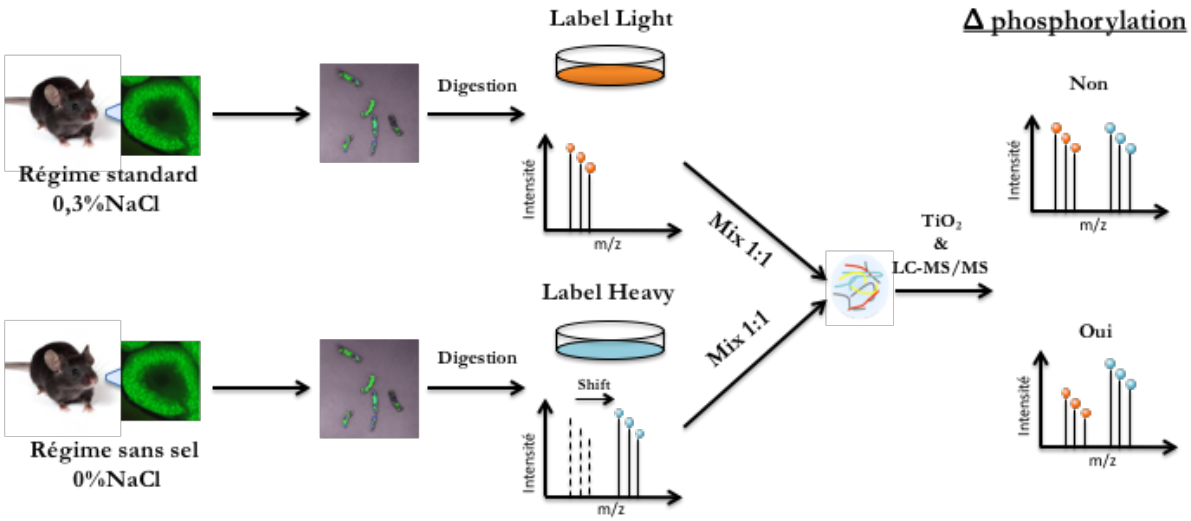


Figure 29: Représentation schématique du principe de la technique SILAC.

Les protéines d'intérêt issues des canaux collecteurs isolés sont excisées à partir de gels, puis digérées à la trypsine. Les échantillons sont incubés dans un milieu particulier contenant un ou plusieurs acides aminés essentiels isotopiquement alourdis (arginine, lysine, ^{13}C et/ou ^{15}N).

Les échantillons issus des souris sous régime standard sont incubés dans le milieu sans acides aminés alourdis dit « légers », et les échantillons des souris sous régime sans sel sont incubés dans le milieu avec les acides aminés alourdis dit « lourds ». Les protéines provenant des deux populations sont ensuite mélangées en quantités égales (rapport 1:1), puis les peptides marqués sont enrichis en phosphopeptides par chromatographie liquide en utilisant des colonnes Titansphere TiO2 (GL Sciences) comme décrit précédemment (Kettenbach & Gerber, 2011), pour être analysés en MS puis MS/MS.

En mode MS, chaque peptide est détecté sous la forme d'une paire constituée d'une forme « lourde » et d'une forme « légère » correspondant respectivement aux conditions expérimentales « régime sans sel » et « régime standard ». L'analyse phosphoprotéomique

quantitative différentielle consiste alors à repérer ces paires peptidiques et à mesurer le rapport des intensités (ou des aires) obtenues pour les formes lourdes et légères, qui traduit la différence de concentration de ces peptides entre les échantillons de tubules issus des différentes conditions expérimentales. La fragmentation des peptides par MS/MS permet ensuite de déterminer leur séquence en acides aminés, et d'identifier les protéines dont ils sont issus en confrontant les spectres MS/MS obtenus à des banques de données de séquences protéiques, au moyen de logiciels tels que Mascot ™ ou ProteinPilot™.

VII. Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM. Les différences significatives entre les résultats ont été déterminées soit par un « t-test » de Student, soit par un test ANOVA ($p < 0,05$ est considéré comme significatif), grâce au logiciel GraphPad Prism.

RÉSULTATS

I. Analyse du phosphoprotéome du canal collecteur par spectrométrie de masse

1. Le niveau de phosphorylation de la Barttin est régulé par l'apport en sel

Il a quelques années, notre équipe a lancé une étude large spectre dans le but d'identifier des facteurs régulés par le régime alimentaire en sel. La phosphorylation étant l'un des mécanismes de régulation les plus fréquents des canaux et transporteurs de NaCl dans le rein, nous avons réalisé une analyse du phosphoprotéome des canaux collecteurs par spectrométrie de masse. Cette technique permet de comparer les variations quantitatives de phosphorylation des protéines selon les conditions physiologiques. Les canaux collecteurs ont été isolés par COPAS à partir de reins de deux groupes de souris préalablement placés sous régime standard (0,3% Na) ou, sous régime sans sel (0%Na).

Notre étude a permis d'identifier un grand nombre de sites de phosphorylation régulé par le régime en sel sur de nombreux transporteurs de NaCl et protéines régulatrices. Cependant, un site de phosphorylation de la Barttin, qui n'a jusqu'alors jamais été étudié, a retenu notre attention, compte tenu du rôle essentiel de cette protéine dans la réabsorption de NaCl dans le néphron distal. Les études *in silico* ont identifié cinq sites de phosphorylation sur la Barttin qui s'avère être tous des sérines regroupées sur la queue C-terminale de la protéine [Figure 30A-B]. L'alignement des séquences de la Barttin de différentes espèces a mis en évidence que seul le résidus sérine en position 90 (S90) chez la souris (S93 chez l'homme) est conservée [Figure 30C].

La comparaison des spectres du phosphopeptide S90 entre le régime standard et le régime sans sel a montré une augmentation significative de la phosphorylation sur ce site en déplétion sodée, une condition où le transport de chlore est stimulé [Figure 30E]. Au contraire, la phosphorylation d'un résidu sérine non conservé, par exemple S79 chez la souris, n'est pas modifiée par le régime en sel [Figure 30D]. Ainsi, notre étude a démontré qu'*in vivo* un site de phosphorylation nouvellement identifié sur la Barttin est régulé par le régime en sel.

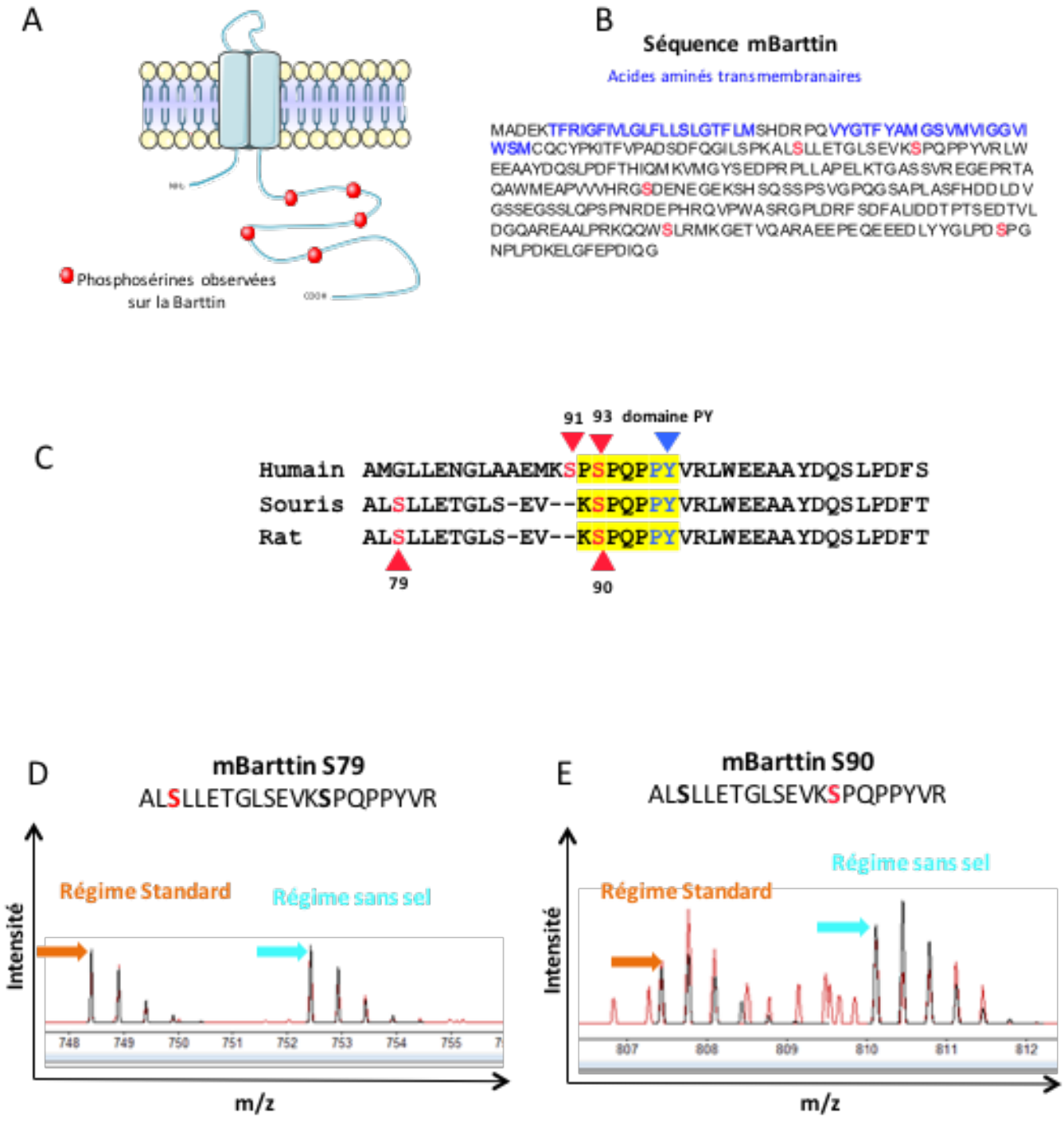


Figure 30: La phosphorylation sur la sérine S90 est augmentée par la restriction sodée

A. Les cinq sites de phosphorylation de la Barttin sont des sérines regroupées sur la partie C-terminale de la protéine. ***B.*** *Séquence de la mBarttin.* ***C.*** *L'alignement de séquence de la Barttin montre que la sérine S90 est conservée parmi les espèces.* ***D-E.*** *Comparaison des deux spectres MS/MS de la mBarttin phosphorylée sur les résidus S79 (D) et S90 (E) entre le régime standard et le régime sans sel. La phosphoralytion sur la S90 est augmentée par la restriction sodée (E) tandis que la phosphorylation sur la S79 n'est pas modifiée (D).*

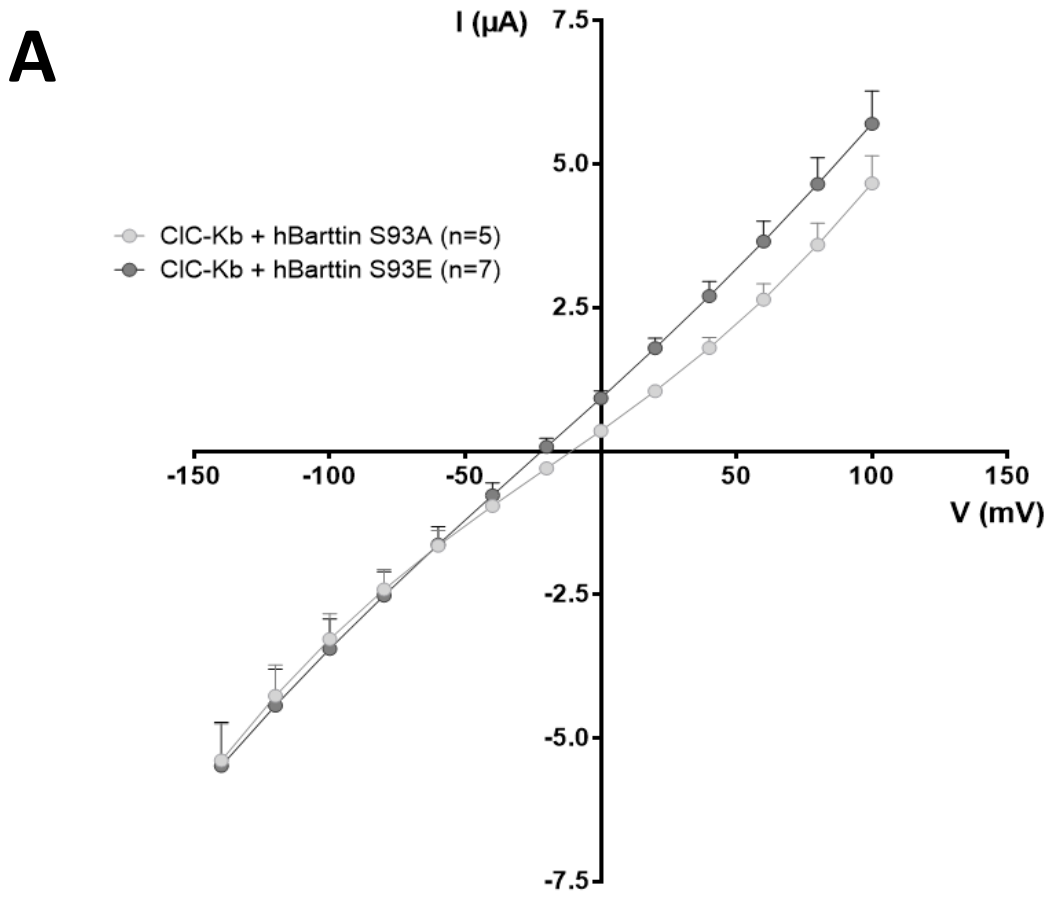
II. Mesure de l'activité de ClC-Kb

À la suite de ces expériences, nous avons décidé d'étudier, *in vitro*, le rôle de ce site de phosphorylation dans la régulation de la fonction du canal ClC-Kb/Barttin. Pour cela, nous avons généré deux mutant de phosphorylation de la Barttin humaine (hBarttin) par mutagénèse dirigée :

- une forme non phosphorylable où la sérine est changé en alanine, S→A
- une forme phosphomimétique où la sérine est changé en glutamate S→E, un acide aminé dont la structure est proche de celle d'une sérine phosphorylée.

1. La phosphorylation sur la sérine conservée de la Barttin augmente les courants chlore médiés par ClC-Kb

Nous avons exprimé le canal ClC-Kb dans l'oocyte de Xénope en présence des différentes formes de la hBarttin S93 et les courants macroscopiques médié par ClC-Kb, ont été mesurés par Two-Electrode-Voltage-Clamp (TEVC).



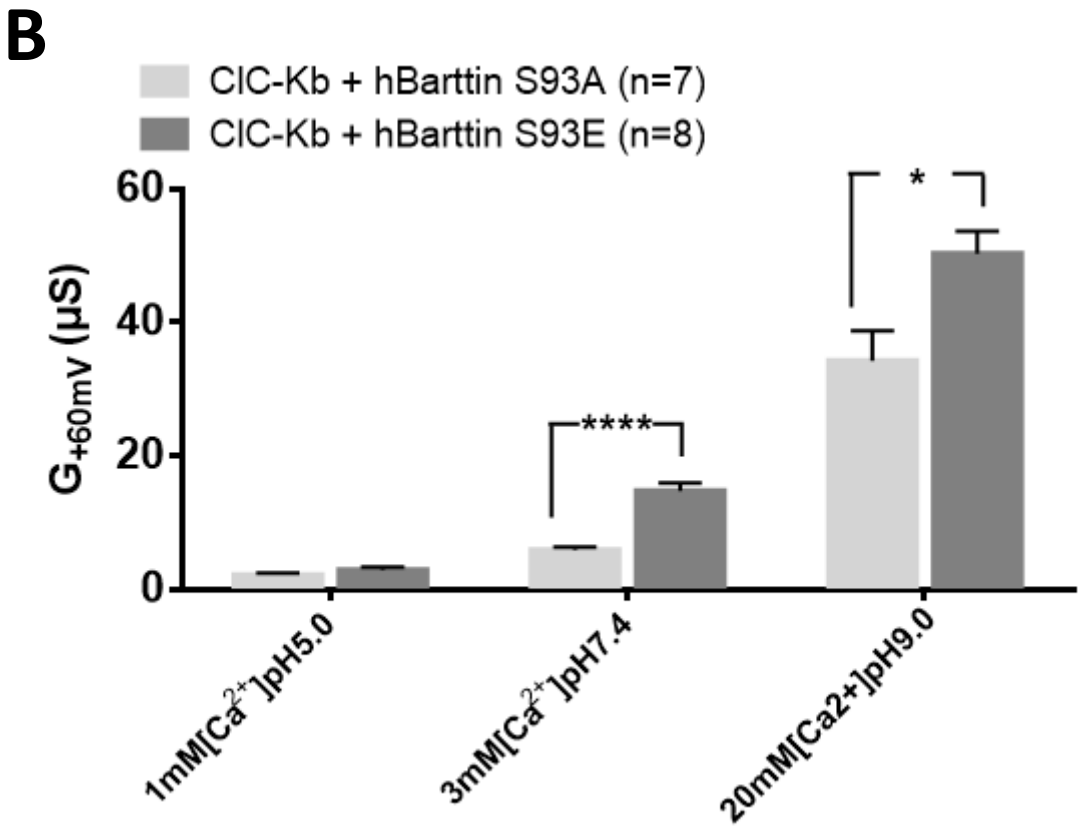


Figure 31: La phosphorylation sur le phospho-site S93 augmente l'activité de ClC-Kb.
A. *Relation Courant-Voltage à l'état stationnaire pour des oocytes exprimant ClC-Kb/hBarttin S93A et ClC-Kb/hBarttin S93E, en conditions contrôles.* ***B.*** *Conductance à +60mV, G_{+60mV}, de courants générés par des oocytes exprimant ClC-Kb/hBarttin S93A et ClC-Kb/hBarttin S93E. Chaque point ou colonne représente la moyenne d'au moins 5 oocytes provenant de deux lots différents.*
**p<0,05 ; ****p<0,0001 (test t de Student).*

La Figure 31A montre les courbes courant-voltage caractéristiques de ClC-Kb en conditions contrôles. Ces courants s'inactivent partiellement à des voltages négatifs, et s'activent à des voltages positifs ; ce qui donne une courbe courant-voltage légèrement rectifiante sortante. Ces enregistrements montrent qu'à des voltages positifs, les courants chlore générés par ClC-Kb sont plus importants en présence de Barttin phosphorylée S93E (pBarttin) qu'en présence de Barttin non phosphorylable S93A. La Figure 31B présente les conductances calculées à +60 mV, G_{+60mV}. Les G_{+60mV} ont été calculés en conditions inhibitrices, contrôles, et activatrices afin de moduler le gating de ClC-Kb. Ces résultats indiquent que l'activité de transport de ClC-Kb est augmentée de 45% ± 2% en présence de la pBarttin comparé à la Barttin non phosphorylable, en conditions contrôles et activatrices. Cette différence d'activité est abolie en conditions inhibitrices.

2. La phosphorylation sur une sérine non conservée de la Barttin n'a pas d'effet sur les courants chlore médiés par ClC-Kb

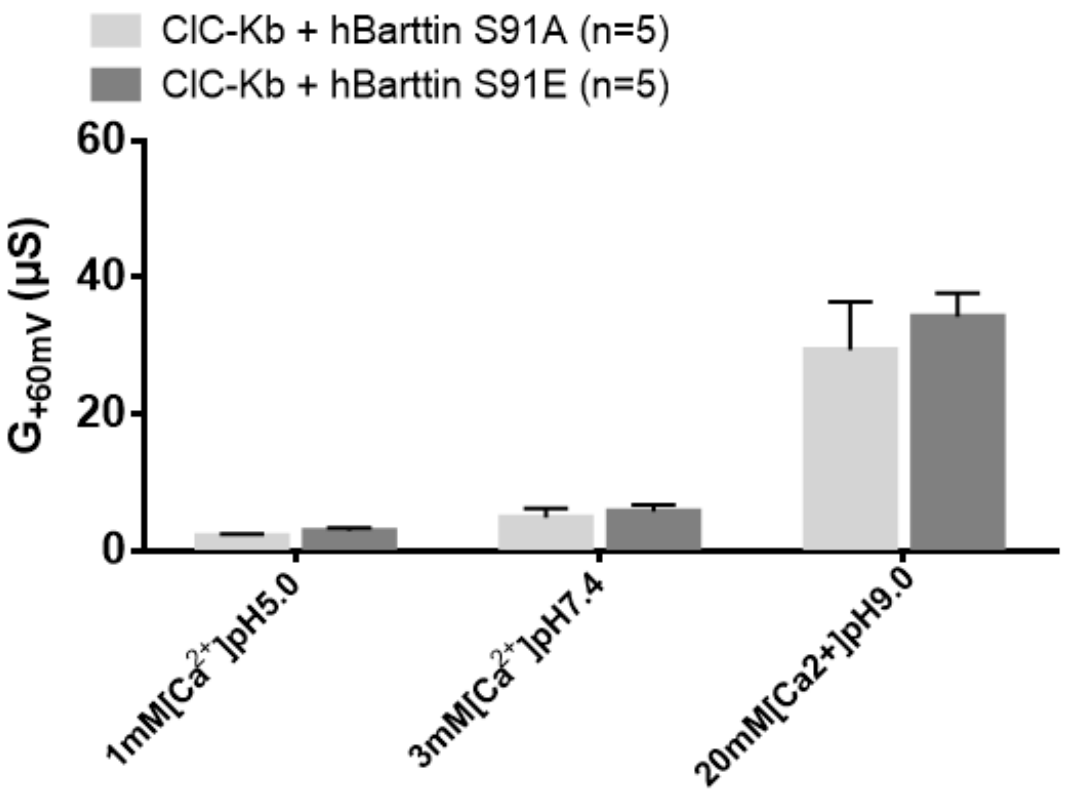


Figure 32: : La phosphorylation sur le phosphosite S91 ne modifie pas l'activité de ClC-Kb. *Conductance à +60mV, G_{+60mV}, de courants générés par des oocytes exprimant ClC-Kb/hBarttin S91A et ClC-Kb/hBarttin S91E. Chaque point ou colonne représente la moyenne d'au moins 5 oocytes issus de deux lots différents.*

Nous avons étudié l'effet de la phosphorylation sur une sérine non conservée de la Barttin sur l'activité de ClC-Kb. Dans la séquence de la Barttin, la sérine en position 91 est localisée seulement à deux acides aminés en amont du site de phosphorylation d'intérêt S93. L'analyse des conductances calculées à +60 mV, G_{+60mV} montrent que la phosphorylation sur la sérine S91 n'a pas d'effet sur l'activité de ClC-Kb quelques soient les conditions expérimentales. [Figure 32]

L'ensemble de ces résultats établissent que la phosphorylation sur le résidu S93 de la Barttin, qui est régulé par l'apport en sel, augmente donc de façon spécifique l'activité de ClC-Kb.

III. Analyse de l'expression de surface et de la distribution intracellulaire du canal ClC-Kb/Barttin

Nous avons ensuite étudié l'effet de la phosphorylation de la Barttin sur la distribution intracellulaire et sur l'expression de surface des canaux ClC-Kb/Barttin.

1. La phosphorylation de la Barttin augmente l'expression de ClC-Kb à la surface membranaire.

Nous avons tout d'abord étudié de façon quantitative l'expression de surface de ClC-Kb. La protéine de fusion ClC-Kb-eGFP a été exprimée exprimé seule ou en présence des mutants de la Barttin dans l'oocyte de Xénope. La fluorescence à la membrane des oocytes a été étudié en microscopie confocale,

Les oocytes non injectés (NI) présentent une faible autofluorescence détectable. Lorsque les canaux ClC-Kb sont exprimés sans la Barttin, une petite proportion des canaux ClC-Kb atteint la surface membranaire. La présence de la Barttin favorise l'insertion membranaire de ClC-Kb. La Barttin phosphorylée (ClC-Kb + hBarttin S93E) augmente d'environ 45% la densité des canaux ClC-Kb à la membrane, comparée à la forme non phosphorylable de la Barttin (ClC-Kb + hBarttin S93A). [Figure 33]

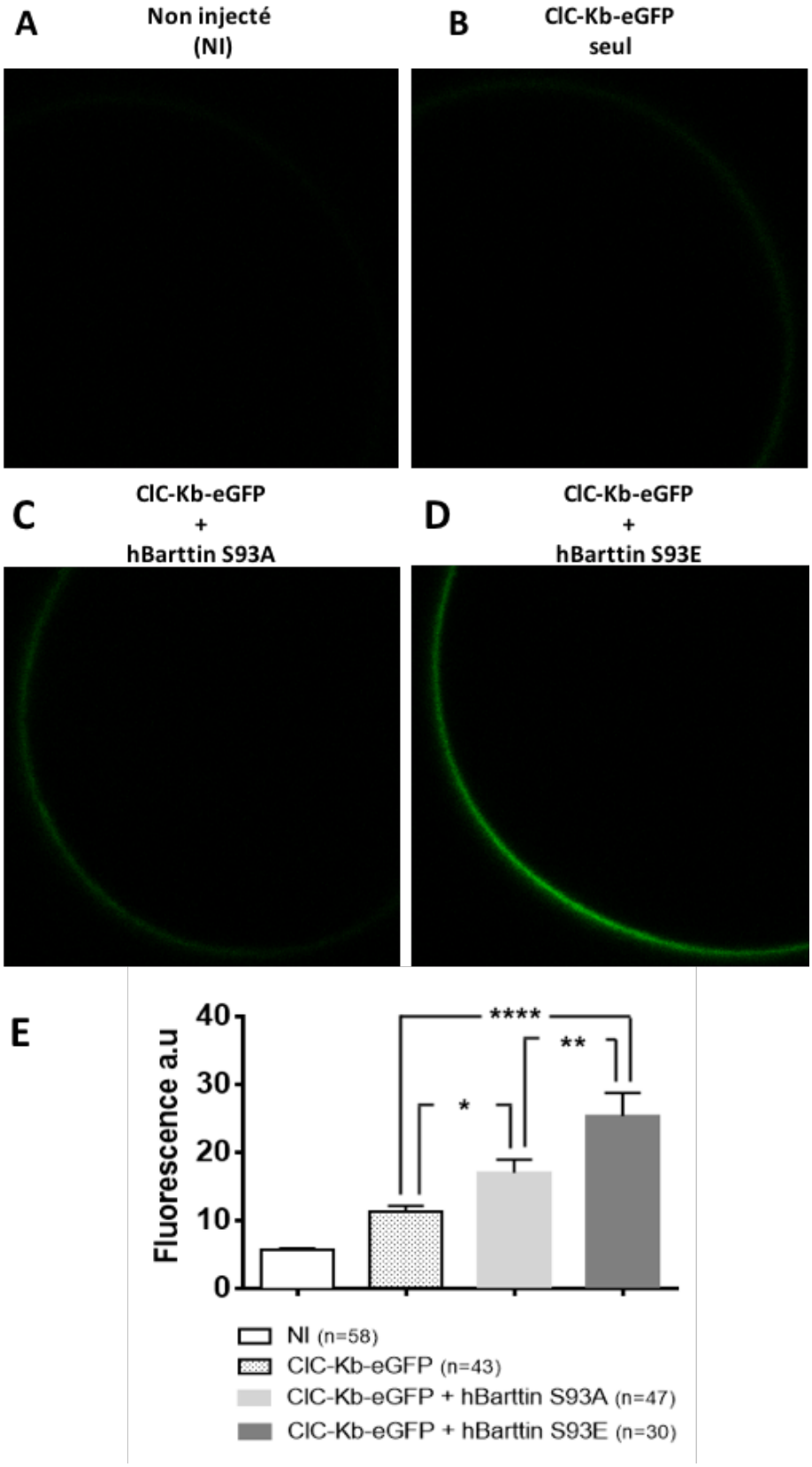


Figure 33: La phosphorylation de la Barttin stimule l'insertion de ClC-Kb à la membrane.
*Images de microscopie confocale, de la surface membranaire d'oocytes non injectés (A) ou exprimant ClC-Kb-eGFP seul (B), ClC-Kb- eGFP + hBarttin non phosphorylable S93A (C) ou ClC-Kb- eGFP + hBarttin phosphomimétique S93E (D). Quantification de la fluorescence (E). Chaque histogramme représente la fluorescence moyenne d'au moins 30 oocytes issus de 6 lots différents. La fluorescence a été mesurée avec le logiciel d'analyse ImageJ. Les résultats sont donnés en moyenne ± s.e.m. *p<0,05 ; **p<0,01 ; ****p<0,0001.*

2. La phosphorylation de la Barttin favorise le trafic intracellulaire du complexe ClC-Kb/Barttin vers la surface membranaire.

Nous avons ensuite étudié la distribution intracellulaire de la hBarttin-CFP en microscopie confocale, exprimée seule ou en présence de YFP-ClC-Kb dans les cellules MDCK II.

En accord avec de précédentes publications, les canaux ClC-Kb sont très majoritairement retenus dans les compartiments intracellulaires en l'absence de Barttin (Estevez et al., 2001; Scholl et al., 2006) [Figure 34A]. Les mutants Barttin, S93E et S93A, sont correctement exprimés à la membrane. De plus, on observe que la Barttin phosphorylée S93E est plus présente à la membrane que la Barttin non phosphorylée S93A [Figure 34B-C]. Les deux mutants de la Barttin sont capables d'induire l'insertion des canaux ClC-Kb à la membrane [Figure 34D,G]. Toutefois, comparée à la Barttin non phosphorylée, la la Barttin phosphorylée S93E semble stimuler plus efficacement la sortie des canaux des compartiments intracellulaires, et augmenter, de ce fait, le nombre de canaux ClC-Kb exprimés à la membrane [Figure 34I].

L'ensemble de ces résultats suggèrent que la phosphorylation de la Barttin augmente le transport de chlore en stimulant la sortie des canaux ClC-Kb des compartiments intracellulaires, et en favorisant leur insertion dans la membrane plasmique.

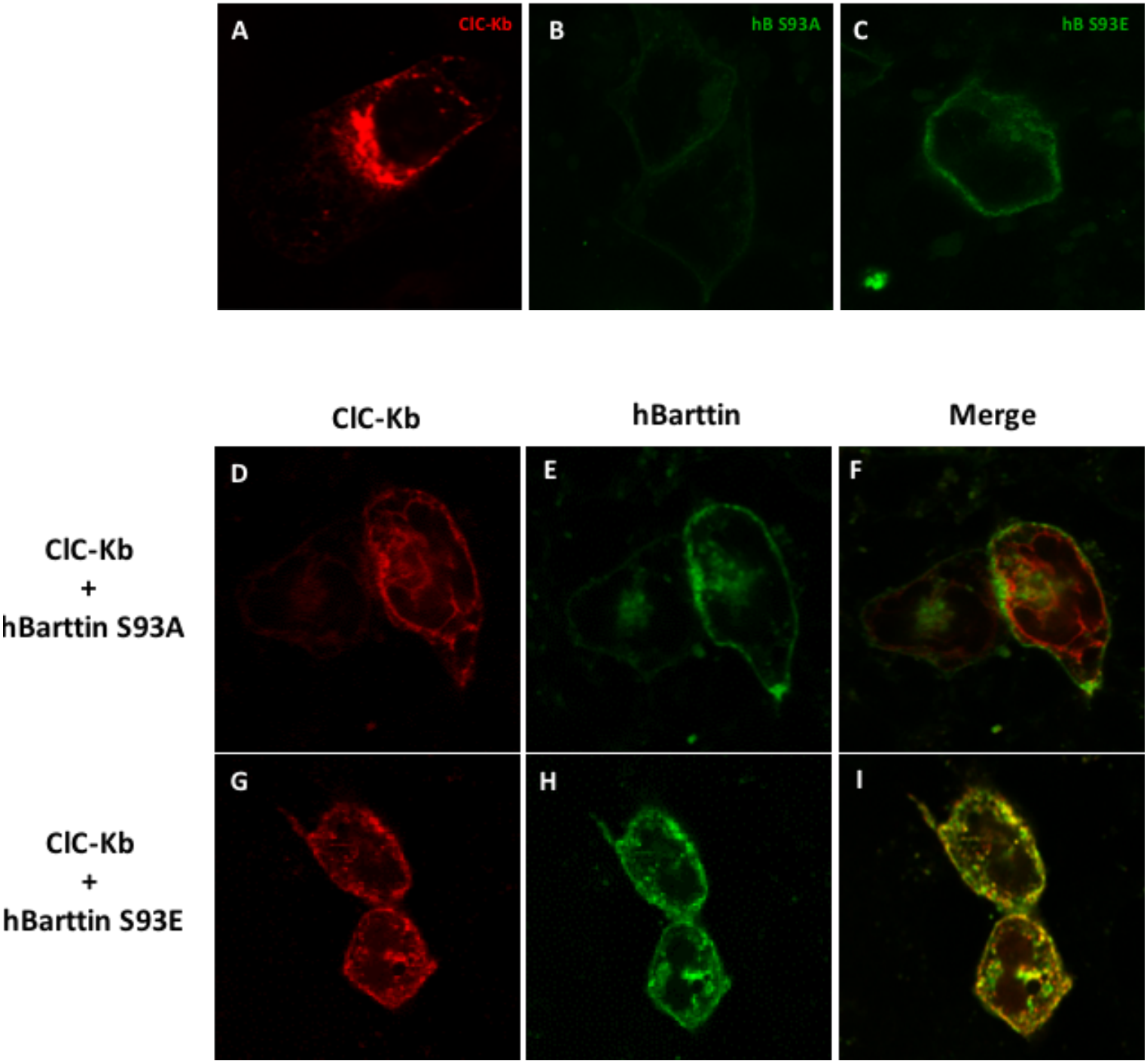


Figure 34: La phosphorylation de la Barttin favorise le trafic cellulaire du complexe vers la membrane. .
A-I. *Images en microscopie confocale de cellules MDCK II exprimant YFP-ClC-Kb seul (A), la hBarttin-CFP non phosphorylable S93A seule (B), la hBarttin-CFP phosphomimétique S93E seule (C), le complexe YFP-ClC-Kb + hBarttin-CFP S93A (D-F) ou le complexe YFP-ClC-Kb + hBarttin-CFP S93E (G-I).*

IV. Analyse de la stabilité de la Barttin

Après avoir observé dans l'expérience précédente que la phosphorylation de la Barttin entrainait une augmentation de la densité des canaux ClC-Kb à la membrane, nous avons étudié l'effet de cette phosphorylation sur la stabilité de la Barttin. Pour cela, nous avons mesuré le temps de demi-vie de la Barttin. On désigne par demi-vie le temps nécessaire pour que l'expression d'une protéine soit réduite de moitié. Nous avons donc mesuré l'expression de la Barttin au cours du temps par western blot, après avoir incubé les cellules avec de la cycloheximide (CHX), un inhibiteur de la synthèse protéique. Nous avons observé que le temps de demi-vie de la Barttin non phosphorylée est d'environ 4h [Figure 35]. La phosphorylation augmente la demi-vie de la Barttin jusqu'à 24h et, par conséquent, stabilise la protéine à la membrane. [Figure 35]

Ces données montrent que la phosphorylation, en augmentant son temps de demi-vie, permet de stabiliser la Barttin à la membrane.

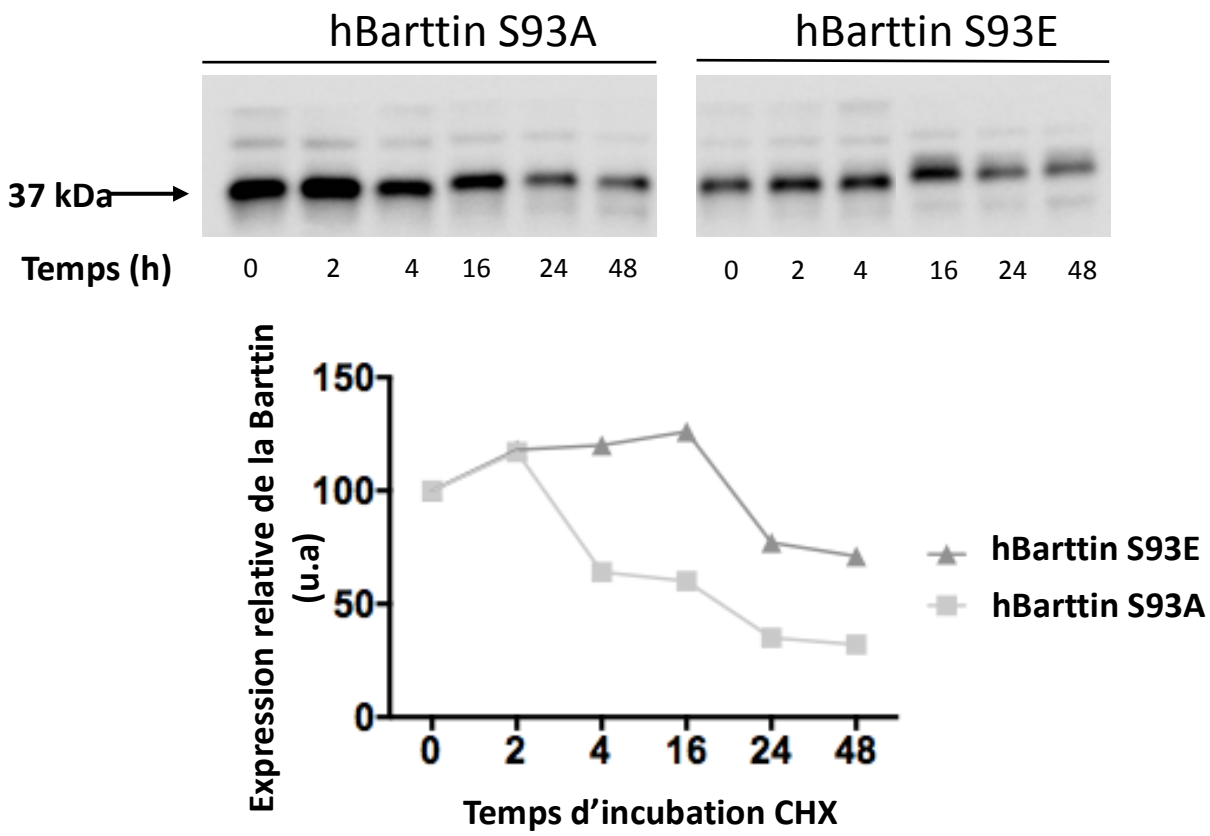


Figure 35: La phosphorylation de la Barttin stabilise la Barttin à la membrane
A. Mesure du temps de demi-vie de la Barttin après incubation des cellules HEK 293T avec de la CHX. 15µg de protéines par échantillon a été déposé par puits. Cette quantité a été vérifié au préalable sur un gel d'acrylamide coloré au bleu de Coomassie. L'expression de la Barttin est analysée par western blot.

V. Génération du modèle murin porteur de la mutation bloquant la phosphorylation de la Barttin.

Nous avons généré un modèle de souris transgéniques portant une mutation ponctuelle de la Barttin, qui bloque la phosphorylation sur le résidu sérine en position S90. Les souris *Bsnd S90A* devaient permettre de déterminer *in vivo* l'impact de cette phosphorylation sur le transport de chlore dans le rein. On pouvait donc s'attendre à ce que les souris *Bsnd S90A* présentent une forme modérée du syndrome de Bartter.

Pour étudier l'effet de la Barttin S90A *in vivo*, nous avons introduit la mutation dans des cellules souches embryonnaires murines par recombinaison homologue [Figure 36A]. La mutation S90A est localisée sur la queue C-terminale cytosolique. La recombinaison homologue a été vérifiée par Southern Blot et par séquençage de la région contenant le codon mutant. [Figure 36B]. Les cellules sélectionnées ont été injectées dans des blatocystes qui ont ensuite été transférés dans des souris femelles afin d'obtenir une descendance chimérique. Les souris chimères ont ensuite été croisées avec des souris Cre-deleter (Sinning et al., 2011) pour éliminer la casette de sélection Neomycine [Figure 36A]. Le séquençage de l'ADNg des souris des différents génotypes confirme les mutations attendues [Figure 36C].

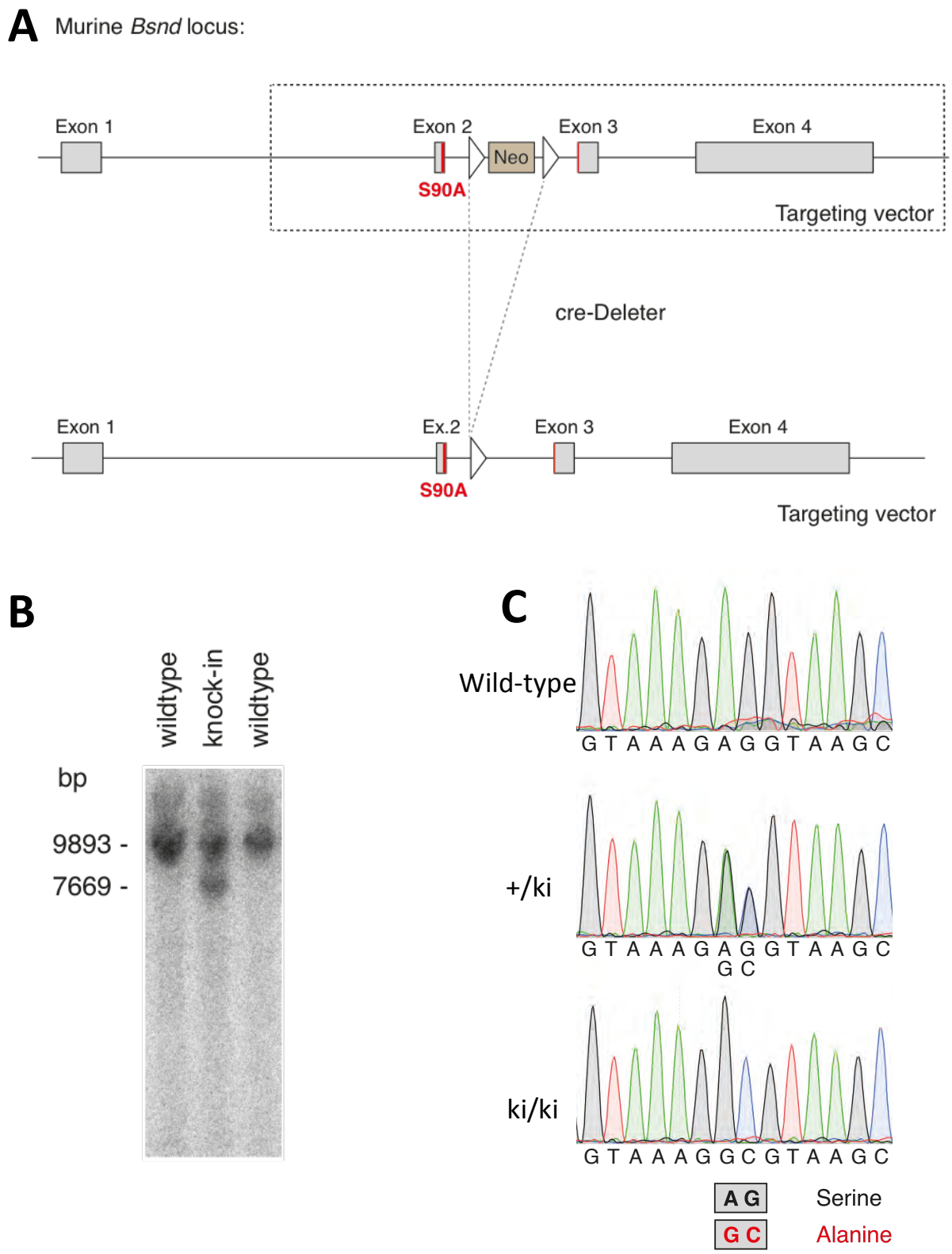


Figure 36: Stratégie de production de l'allèle Bsnd S90A.
A. Les exons sont représentés par des rectangles gris. L'allèle Exon2-3^{neo}, produit par recombinaison homologue, contient deux sites loxP (triangle blanc), de part et d'autre d'une casette Neo. Les lignes pointillées indiquent la séquence cible. ***B****. Southern blot sur cellules ES.* ***C.*** *Séquençage de l'ADNc des souris de souris sauvages (WT), hétérozygotes (+/ki) et homozygotes (ki/ki)*

Cependant, le séquençage de l'ADNc des souris sauvages (WT), hétérozygotes (+/ki) et homozygotes (ki/ki) pour la mutation S90A, a révélé que cette mutation conduit à la délétion de 8pb et à un décalage du cadre de lecture. Notre modèle de souris Bsnd S90 résulte donc en un modèle similaire au modèle d'invalidation constitutif du gène Bsnd, qui code pour la Barttin [Figure 37].

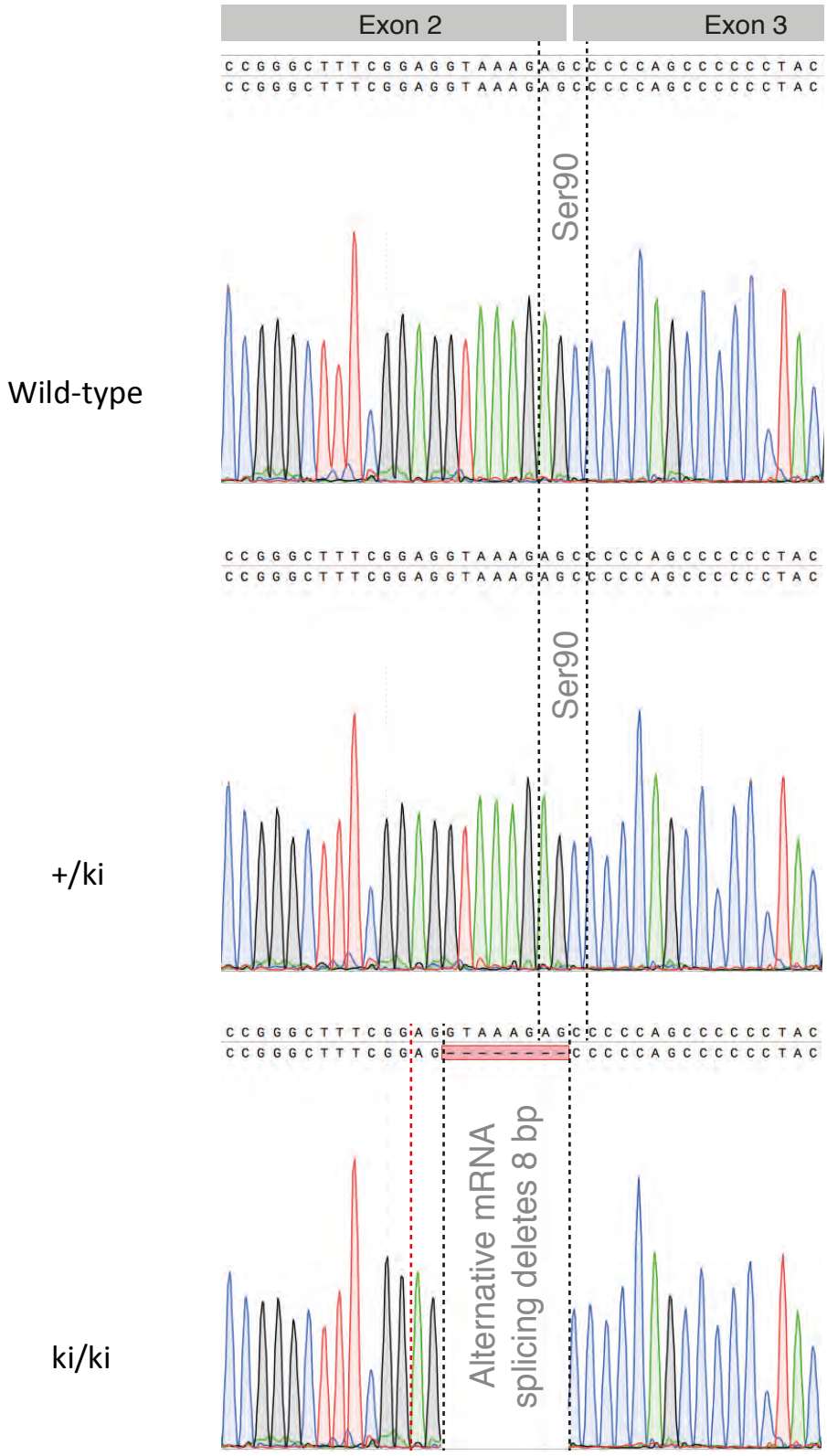


Figure 37: Séquençage de l'ADNc des souris de souris sauvages (WT), hétérozygotes (+/ki) et homozygotes (ki/ki)

DISCUSSION

La phosphorylation des protéines est l'une des modifications post-traductionnelles principales chez les eucaryotes. Dans le rein, un grand nombre de transporteurs de sel et de protéines régulatrices sont modulés par phosphorylation ; ce qui en fait l'un des principaux mécanismes moléculaires de régulation du transport de NaCl. Cette constatation a poussé notre équipe à mener une étude du phosphoprotéome du canal collecteur afin d'identifier de nouveaux facteurs régulés par le régime en sel.

Dans cette étude, nous avons démontré que la Barttin, qui est la sous-unité accessoire des canaux ClC-K était phosphorylée *in vivo.* Il existe cinq sites de phosphorylation localisés sur la queue C-terminal de la protéine mais seule la sérine en position 90 chez la souris (S93 chez l'homme) semble importante pour la régulation de canal ClC-Kb/Barttin. En effet, la phosphorylation sur cette sérine, qui est la seule à être conservé parmi les espèces [Figure 30], est modifiée en réponse à un changement de l'apport en NaCl [Figure 30].

La phosphorylation de la Barttin entraîne une augmentation des intensités des courants macroscopiques générés par ClC-Kb, ce qui témoigne d'une activité accrue du canal [Figure 31]. Cette augmentation d'activité de ClC-Kb est due à la présence d'un plus grand nombre de canaux actifs à la membrane, en présence de la Barttin phosphorylée.

En conclusion, nos résultats suggèrent que les changements dynamiques de phosphorylation de la Barttin pourraient contribuer à l'adaptation rapide et à la régulation fine du transport rénal de chlore, en réponse à un changement de l'apport en sel.

1. La phosphorylation de la Barttin augmente le transport de chlore par ClC-Kb

Tout d'abord, nous avons choisi de travailler avec les isoformes ClC-Kb et Barttin humaine (hBarttin), car ce complexe est responsable de l'efflux basolatéral de chlore dans les cellules intercalaires du canal collecteur, le segment du néphron dans lequel la phosphorylation de la Barttin a été détectée.

Afin de tester, *in vitro*, l'effet fonctionnel de la phosphorylation de la Barttin sur le transport de chlore par ClC-Kb, nous avons généré deux mutants de la Barttin : un mutant non phosphorylable en remplaçant la sérine par une alanine (S→A), et un mutant phosphomimétique en remplaçant la sérine par un glutamate (S→E), l'acide aminé dont la structure se rapproche le plus de celle d'une sérine phosphorylée.

L'utilisation de ces mutants était indispensable à notre étude car nous ne disposons pas de moyens techniques pour vérifier le statut de phosphorylation des protéines *in vitro*, comme il est possible de le faire pour d'autres modifications post-traductionnelles telles que la palmitoylation (Steinke et al., 2015). De plus, ne pouvant pas contrôler le statut de phosphorylation de la Barttin *in vitro*, les résultats de la mesure de l'activité ou de l'expression cellulaire de ClC-Kb en présence de la Barttin sauvage n'ont pas été intégrés dans l'analyse des résultats, même s'ils ont servi de contrôles positifs aux expériences.

Nous avons ensuite mesuré l'activité des canaux ClC-Kb en présence des mutants de la Barttin, dans l'oocyte de Xénope par Two-Electrode-Voltage-Clamp. Dans l'oocyte, le gating des canaux ClC-Kb peut être modulé par le pH et la concentration en [Ca^{2+}] du milieu extérieur (Gradogna et al., 2010). En conditions de pH alcalin et de concentration élevée en [Ca^{2+}], l'ensemble des canaux ClC-Kb présents à la membrane est complétement actif, et le seul paramètre pouvant faire varier l'amplitude des courants générés par ces canaux est le nombre de canaux exprimés à la membrane. Nos résultats ont montré que, dans ces conditions, l'activité de ClC-Kb est augmenté d'environ 45% en présence de la Barttin phosphomimétique comparée à la Barttin non phosphorylée [Figure 31].

On fait alors l'hypothèse que la phosphorylation de la Barttin agit sur le transport de chlore en modulant la densité des canaux ClC-Kb à la membrane, plutôt qu'en modifiant les propriétés unitaires de ces canaux.
Cependant, nous ne pouvons que supposer l'effet mineur que pourrait avoir la phosphorylation de la Barttin sur les propriétés unitaires du canal car il ne nous a pas été possible de le vérifier pour cette étude. En effet, comparé par exemple au canal ClC- Ka, il est très difficile d'enregistrer ClC-Kb en patch-clamp en cellule entière et il a été impossible jusqu'à maintenant de l'enregistrer en canal unitaire (Gradogna et al., 2010).

Par ailleurs, nos résultats ont indiqué que dans des systèmes d'expression hétérologue, ce mécanisme de régulation par phosphorylation de la Barttin était commun aux deux isoformes des ClC-K. En effet, la phosphorylation de la Barttin augmente d'environ 50% l'activité de ClC-Ka (données non montrées). Dans le rein, le complexe ClC-Ka/Barttin est surtout localisé dans la branche fine ascendante de l'Anse de Henlé (tAL), où il joue un rôle important dans le système de concentration de l'urine. (Estevez et al., 2001; Nomura et al., 2011). *In vivo*, l'orthologue murin de ClC-Ka, ClC-K1 est plutôt régulé par l'apport en eau que par le régime en sel ; d'autres expériences complémentaires seront donc nécessaires pour déterminer la pertinence physiologique de ce mécanisme de régulation pour ClC-Ka.

2. La phosphorylation de la Barttin augmente la densité des canaux ClC-Kb à la membrane.

La Barttin, outre sa fonction d'activation des canaux ClC-Kb, joue également le rôle de chaperonne et favorise l'insertion des canaux à la membrane plasmique (Estevez et al., 2001).
Les résultats obtenus ont démontré que la phosphoBarttin augmente d'environ 45% la densité membranaire des canaux ClC-Kb comparée à la Barttin non phosphorylée [Figure 33]. Il est intéressant de noter que cette augmentation d'expression est superposable à l'augmentation d'activité du canal en présence de la Barttin phosphorylée, ce qui appuie fortement notre hypothèse selon laquelle la phosphorylation régulerait le transport de chlore par ClC-Kb en modulant le nombre de ces canaux à la membrane. De plus, nous avons observé que, dans des cellules MDCK II en culture, la Barttin modifiait également la distribution intracellulaire de ClC-Kb en favorisant son trafic des compartiments intracellulaires vers la membrane plasmique [Figure 34].

Toutefois, la fonction de chaperonne de la Barttin est médiée par sa partie transmembranaire qui comprend les acides aminés 9 à 54 (Scholl et al., 2006). Le phospho-site S93 étant en aval de ces domaines, et la Barttin non phosphorylée ayant toujours la capacité de promouvoir l'insertion membranaire de ClC-Kb, on peut alors supposer que la phosphorylation sur ce site ne joue pas uniquement un rôle sur le trafic intracellulaire de ClC-Kb, mais aussi sur la stabilité du complexe. En effet, la Barttin favorise la glycosylation des ClC-K, qui est un indicateur de la sortie effective du réticulum endoplasmique (Janssen et al., 2009). La glycosylation étant un mécanisme de protection contre la dégradation des protéines (Hayama et al., 2003), la phosphorylation de la Barttin pourrait alors stimuler les mécanismes de glycosylation des canaux ClC-Kb, ce qui entraînerait une plus grande stabilité des complexes. L'analyse biochimique du statut de glycosylation de ClC-Kb en présence de la pBarttin sera réalisée pour répondre à cette question.

Par ailleurs, les résultats de l'étude de Scholl et al. sur la fonction des domaines de la Barttin, suggèrent que la queue C-terminale, où est localisé le phosphosite S93, n'établit pas de liaison stable avec ClC-kb (Scholl et al., 2006). On pourrait supposer que la phosphorylation sur ce site provoquerait un changement de conformation transitoire de la Barttin, et stabiliserait l'interaction entre la Barttin et ClC-Kb.

3. La phosphorylation de la Barttin augmente sa stabilité à la membrane

L'analyse de la demi-vie de la Barttin, qui n'a jusqu'alors jamais été publiée dans la littérature, montre que la phosphorylation de la Barttin stabilise la protéine en allongeant sa demi-vie de la protéine de ~ 4h à ~ 24h [Figure 35]. Ce processus est sans doute à l'origine de l'augmentation du nombre de complexes ClC-Kb/Barttin présents simultanément à la membrane [Figure 34]. Les mécanismes à l'origine de cette stabilité accrue de la Barttin sont encore à déterminer. Ils pourraient être une conséquence de l'inhibition des mécanismes de dégradation de la protéine par un protéasome. En effet, le phosphosite S93 est situé à quelques acides aminés en amont d'un « motif PY ». Ces motifs sont les structures cibles de l'ubiquitine ligase Nedd4-2 qui médie le recyclage de canaux et de protéines de la membrane plasmique, à l'exemple du canal épithélial sodique ENaC (Staub et al., 1996).

On pourrait faire l'hypothèse que la phosphorylation de la Barttin induirait un changement de conformation de la Barttin laquelle empêcherait l'interaction avec Nedd4-2, et diminuerait ainsi la dégradation de la Barttin. En effet, conformément à plusieurs études, nos résultats (non présentés dans ce manuscrit) ont démontré que la destruction du motif PY par mutation (Y98A), empêchant son interaction avec Nedd4-2, entraînait une augmentation de l'activité de ClC-Kb de plus de 100%, et que ce mécanisme passait par l'augmentation du nombre de complexes ClC-Kb/Barttin à la surface membranaire (Estevez et al., 2001). Nous avons essayé de démontrer *in vitro* la présence d'une ubiquitination altérée chez la Barttin phosphorylée, mais nous n'avons pas obtenu de résultats concluants.

Toutefois,, les résultats suggérant que les canaux ClC-Ka/Barttin sont régulés par la voie de l'ubiquitine ligase Nedd4-2 et la kinase SGK1 (Embark et al., 2004), n'ont pas pu être reproduits (Jentsch, 2008). Ainsi, considérant le faible consensus entre le motif PY de la Barttin et le domaine de liaison WW de Nedd4-2, la pertinence de l'effet de Nedd4-2 sur les complexes ClC-K/Barttin reste incertaine.

En conclusion, les résultats obtenus dans le cadre de cette étude ont permis de mettre en évidence un nouveau mécanisme de régulation du canal ClC-Kb/Barttin. En réponse à une variation de l'apport en sel, le changement dynamique de phosphorylation de la Barttin pourrait représenter un mécanisme d'adaptation du transport de chlore dans le néphron distal.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Les deux travaux présentés dans ce manuscrit de thèse traitent de la physiologie et de la physiopathologie du transport de chlore dans le néphron distal. Le transport de chlore dans le néphron distal, et en particulier dans le canal collecteur, est important pour plusieurs fonctions rénales, notamment pour le maintien de la balance sodée et la régulation de la pression artérielle ou encore le maintien de la concentration plasmatique en bicarbonates et l'équilibre acide-base. Cependant, le rôle du chlore dans ces processus a longtemps été considéré comme secondaire, accompagnant seulement la réabsorption de sodium ou de bicarbonate. Or, un nombre croissant d'études tend à montrer que l'ion chlore pourrait être en réalité un élément déterminant.

Comme l'illustrent plusieurs études chez l'homme et l'animal, le sodium doit être sous forme de NaCl pour exercer son effet sur la pression artérielle, et une anomalie primitive de la réabsorption du chlore dans le canal collecteur pourrait entrainer une hypertension artérielle. Par ailleurs, le chlore semble également jouer un rôle essentiel dans le maintien de l'équilibre acide-base. En effet, un défaut du recyclage du chlore à la membrane basolatérale des α-cellules intercalaires, par invalidation du cotransporteur K^+-Cl^-, KCC4, entraine une acidose tubulaire rénale. Cependant, les mécanismes de transport de chlore sont encore mal connus dans cette partie du néphron.

Le premier travail a consisté à décoder les mécanismes responsables de l'acidose tubulaire rénale distale (dRTA) par mutation de l'échangeur Cl^--HCO_3^-, AE1. Pour cela, nous avons généré le premier modèle murin porteur de la mutation d'AE1, R589H (R607H), qui est communément retrouvée chez les patients. Ces souris présentent un défaut des mécanismes d'excrétion d'acide et une acidose distale consécutive. Les résultats originaux issus de cette étude ont permis de remettre en question les mécanismes jusqu'alors suggérés par d'autres études *in vitro* pour expliquer la pathogénicité du variant AE1 R589H. Nous avons donc été en mesure de proposer un nouveau mécanisme moléculaire plus complexe, impliquant plutôt un défaut d'adressage de la pompe à protons dans les α-cellules intercalaires.

Le second travail a porté sur un décryptage des mécanismes de régulation du transport de chlore dans le canal collecteur. Dans cette partie du néphron, les mécanismes de transport de chlore sont mal connus, mais semblent impliquer le canal chlore basolatéral ClC-Kb. Il n'existe que peu de données sur la régulation de ClC-Kb mais, grâce à une approche protéomique d'une préparation hautement purifiée de tubules collecteurs isolés, nous avons identifié un site de phosphorylation sur la Barttin, la sous unité régulatrice de ClC-Kb, spécifiquement régulé par le régime en sel. Dans plusieurs modèles d'expression hétérologue, notre étude permis de mettre en évidence que les changements dynamiques de phosphorylation de la Barttin régulent le transport de chlore par ClC-Kb en modulant le nombre de canaux à la membrane, et pourraient ainsi représenter un mécanisme d'adaptation du transport de chlore du néphron distal en réponse à un changement de l'apport en sel.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Accardi, A., & Miller, C. (2004). Secondary active transport mediated by a prokaryotic homologue of ClC Cl- channels. *Nature, 427*(6977), 803-807. doi:10.1038/nature02314

Adachi, S., Uchida, S., Ito, H., Hata, M., Hiroe, M., Marumo, F., & 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*(26), 17677-17683.

Ait-Mohamed, A. K., Marsy, S., Barlet, C., Khadouri, C., & Doucet, A. (1986). Characterization of N-ethylmaleimide-sensitive proton pump in the rat kidney. Localization along the nephron. *J Biol Chem, 261*(27), 12526-12533.

Akel, A., Wagner, C. A., Kovacikova, J., Kasinathan, R. S., Kiedaisch, V., Koka, S., . . . Lang, F. (2007). Enhanced suicidal death of erythrocytes from gene-targeted mice lacking the Cl-/HCO(3)(-) exchanger AE1. *Am J Physiol Cell Physiol, 292*(5), C1759-1767. doi:10.1152/ajpcell.00158.2006

Alper, S. L. (2010). Familial renal tubular acidosis. *J Nephrol, 23 Suppl 16*, S57-76.

Alzamora, R., Thali, R. F., Gong, F., Smolak, C., Li, H., Baty, C. J., . . . Pastor-Soler, N. M. (2010). PKA regulates vacuolar H+-ATPase localization and activity via direct phosphorylation of the a subunit in kidney cells. *J Biol Chem, 285*(32), 24676-24685. doi:10.1074/jbc.M110.106278

Amemiya, M., Loffing, J., Lotscher, M., Kaissling, B., Alpern, R. J., & Moe, O. W. (1995). Expression of NHE-3 in the apical membrane of rat renal proximal tubule and thick ascending limb. *Kidney Int, 48*(4), 1206-1215.

Andrini, O., Keck, M., Briones, R., Lourdel, S., Vargas-Poussou, R., & Teulon, J. (2015). ClC-K chloride channels: emerging pathophysiology of Bartter syndrome type 3. *Am J Physiol Renal Physiol, 308*(12), F1324-1334. doi:10.1152/ajprenal.00004.2015

Arakawa, T., Kobayashi-Yurugi, T., Alguel, Y., Iwanari, H., Hatae, H., Iwata, M., . . . Iwata, S. (2015). Crystal structure of the anion exchanger domain of human erythrocyte band 3. *Science, 350*(6261), 680-684. doi:10.1126/science.aaa4335

Arreola, J., Begenisich, T., Nehrke, K., Nguyen, H. V., Park, K., Richardson, L., . . . Melvin, J. E. (2002). Secretion and cell volume regulation by salivary acinar cells from mice lacking expression of the Clcn3 Cl- channel gene. *J Physiol, 545*(Pt 1), 207-216.

Atkins, J. L., & Burg, M. B. (1987). Control of steady-state pH in rabbit proximal straight tubules. *Am J Physiol, 253*(2 Pt 2), F282-289.

Attmane-Elakeb, A., Chambrey, R., Tsimaratos, M., Leviel, F., Blanchard, A., Warnock, D. G., . . . Podevin, R. A. (1996). Isolation and characterization of luminal and basolateral plasma membrane vesicles from the medullary thick ascending loop of Henle. *Kidney Int, 50*(3), 1051-1057.

Bagga, A., & Sinha, A. (2007). Evaluation of renal tubular acidosis. *Indian J Pediatr, 74*(7), 679-686.

Barlassina, C., Dal Fiume, C., Lanzani, C., Manunta, P., Guffanti, G., Ruello, A., . . . Cusi, D. (2007). Common genetic variants and haplotypes in renal CLCNKA gene are associated to salt-sensitive hypertension. *Hum Mol Genet, 16*(13), 1630-1638. doi:10.1093/hmg/ddm112

Barneaud-Rocca, D., Etchebest, C., & Guizouarn, H. (2013). Structural model of the anion exchanger 1 (SLC4A1) and identification of transmembrane segments forming the transport site. *J Biol Chem, 288*(37), 26372-26384. doi:10.1074/jbc.M113.465989

Barrallo-Gimeno, A., Gradogna, A., Zanardi, I., Pusch, M., & Estevez, R. (2015). Regulatory-auxiliary subunits of CLC chloride channel-transport proteins. *J Physiol, 593*(18), 4111-4127. doi:10.1113/JP270057

Bartter, F. C., Pronove, P., Gill, J. R., Jr., & Maccardle, R. C. (1962). Hyperplasia of the juxtaglomerular complex with hyperaldosteronism and hypokalemic alkalosis. A new syndrome. *Am J Med, 33*, 811-828.

Batlle, D., Ghanekar, H., Jain, S., & Mitra, A. (2001). Hereditary distal renal tubular acidosis: new understandings. *Annu Rev Med, 52*, 471-484. doi:10.1146/annurev.med.52.1.471

Batlle, D., & Haque, S. K. (2012). Genetic causes and mechanisms of distal renal tubular acidosis. *Nephrol Dial Transplant, 27*(10), 3691-3704. doi:10.1093/ndt/gfs442

Batlle, D., & Kurtzman, N. A. (1982). Distal renal tubular acidosis: pathogenesis and classification. *Am J Kidney Dis, 1*(6), 328-344.

Baum, M., Twombley, K., Gattineni, J., Joseph, C., Wang, L., Zhang, Q., . . . Moe, O. W. (2012). Proximal tubule Na+/H+ exchanger activity in adult NHE8-/-, NHE3-/-, and NHE3-/-/NHE8-/- mice. *Am J Physiol Renal Physiol, 303*(11), F1495-1502. doi:10.1152/ajprenal.00415.2012

Bennetts, B., Rychkov, G. Y., Ng, H. L., Morton, C. J., Stapleton, D., Parker, M. W., & Cromer, B. A. (2005). Cytoplasmic ATP-sensing domains regulate gating of skeletal muscle ClC-1 chloride channels. *J Biol Chem, 280*(37), 32452-32458. doi:10.1074/jbc.M502890200

Bernstein, B. W., Painter, W. B., Chen, H., Minamide, L. S., Abe, H., & Bamburg, J. R. (2000). Intracellular pH modulation of ADF/cofilin proteins. *Cell Motil Cytoskeleton, 47*(4), 319-336. doi:10.1002/1097-0169(200012)47:4<319::AID-CM6>3.0.CO;2-I

Biemesderfer, D., Pizzonia, J., Abu-Alfa, A., Exner, M., Reilly, R., Igarashi, P., & Aronson, P. S. (1993). NHE3: a Na+/H+ exchanger isoform of renal brush border. *Am J Physiol, 265*(5 Pt 2), F736-742.

Birkenhager, R., Otto, E., Schurmann, M. J., Vollmer, M., Ruf, E. M., Maier-Lutz, I., . . . Hildebrandt, F. (2001). Mutation of BSND causes Bartter syndrome with sensorineural deafness and kidney failure. *Nat Genet, 29*(3), 310-314. doi:10.1038/ng752

Blanchard, A., Eladari, D., Leviel, F., Tsimaratos, M., Paillard, M., & Podevin, R. A. (1998). NH4+ as a substrate for apical and basolateral Na(+)-H+ exchangers of thick ascending limbs of rat kidney: evidence from isolated membranes. *J Physiol, 506 (Pt 3)*, 689-698.

Blanz, J., Schweizer, M., Auberson, M., Maier, H., Muenscher, A., Hubner, C. A., & Jentsch, T. J. (2007). Leukoencephalopathy upon disruption of the chloride channel ClC-2. *J Neurosci, 27*(24), 6581-6589. doi:10.1523/jneurosci.0338-07.2007

Boettger, T., Hubner, C. A., Maier, H., Rust, M. B., Beck, F. X., & Jentsch, T. J. (2002). Deafness and renal tubular acidosis in mice lacking the K-Cl co-transporter Kcc4. *Nature, 416*(6883), 874-878. doi:10.1038/416874a

Bosl, M. R., Stein, V., Hubner, C., Zdebik, A. A., Jordt, S. E., Mukhopadhyay, A. K., . . . Jentsch, T. J. (2001). Male germ cells and photoreceptors, both dependent on close cell-cell interactions, degenerate upon ClC-2 Cl(-) channel disruption. *Embo j, 20*(6), 1289-1299. doi:10.1093/emboj/20.6.1289

Bourgeois, S., Meer, L. V., Wootla, B., Bloch-Faure, M., Chambrey, R., Shull, G. E., . . . Houillier, P. (2010). NHE4 is critical for the renal handling of ammonia in rodents. *J Clin Invest, 120*(6), 1895-1904. doi:10.1172/jci36581

Brandt, S., & Jentsch, T. J. (1995). ClC-6 and ClC-7 are two novel broadly expressed members of the CLC chloride channel family. *FEBS Lett, 377*(1), 15-20.

Brant, S. R., Yun, C. H., Donowitz, M., & Tse, C. M. (1995). Cloning, tissue distribution, and functional analysis of the human Na+/N+ exchanger isoform, NHE3. *Am J Physiol, 269*(1 Pt 1), C198-206.

Breton, S., Alper, S. L., Gluck, S. L., Sly, W. S., Barker, J. E., & Brown, D. (1995). Depletion of intercalated cells from collecting ducts of carbonic anhydrase II-deficient (CAR2 null) mice. *Am J Physiol, 269*(6 Pt 2), F761-774.

Breton, S., & Brown, D. (2013). Regulation of luminal acidification by the V-ATPase. *Physiology (Bethesda), 28*(5), 318-329. doi:10.1152/physiol.00007.2013

Breton, S., Wiederhold, T., Marshansky, V., Nsumu, N. N., Ramesh, V., & Brown, D. (2000). The B1 subunit of the H+ATPase is a PDZ domain-binding protein. Colocalization with NHE-RF in renal B-intercalated cells. *J Biol Chem, 275*(24), 18219-18224. doi:10.1074/jbc.M909857199

Briet, M., Vargas-Poussou, R., Lourdel, S., Houillier, P., & Blanchard, A. (2006). How Bartter's and Gitelman's syndromes, and Dent's disease have provided important insights into the function of three renal chloride channels: ClC-Ka/b and ClC-5. *Nephron Physiol, 103*(1), p7-13. doi:10.1159/000090218

Brochard, K., Boyer, O., Blanchard, A., Loirat, C., Niaudet, P., Macher, M. A., . . . Vargas-Poussou, R. (2009). Phenotype-genotype correlation in antenatal and neonatal variants of Bartter syndrome. *Nephrol Dial Transplant, 24*(5), 1455-1464. doi:10.1093/ndt/gfn689

Brown, D., Hirsch, S., & Gluck, S. (1988a). An H+-ATPase in opposite plasma membrane domains in kidney epithelial cell subpopulations. *Nature, 331*(6157), 622-624. doi:10.1038/331622a0

Brown, D., Hirsch, S., & Gluck, S. (1988b). Localization of a proton-pumping ATPase in rat kidney. *J Clin Invest, 82*(6), 2114-2126.

Brown, D., Sabolic, I., & Gluck, S. (1991). Colchicine-induced redistribution of proton pumps in kidney epithelial cells. *Kidney Int Suppl, 33*, S79-83.

Bruce, L. J., Cope, D. L., Jones, G. K., Schofield, A. E., Burley, M., Povey, S., . . . Tanner, M. J. (1997). Familial distal renal tubular acidosis is associated with mutations in the red cell anion exchanger (Band 3, AE1) gene. *J Clin Invest, 100*(7), 1693-1707. doi:10.1172/jci119694

Bruce, L. J., Wrong, O., Toye, A. M., Young, M. T., Ogle, G., Ismail, Z., . . . Tanner, M. J. (2000). Band 3 mutations, renal tubular acidosis and South-East Asian ovalocytosis in Malaysia and Papua New Guinea: loss of up to 95% band 3 transport in red cells. *Biochem J, 350 Pt 1*, 41-51.

Buerkert, J., Martin, D., & Trigg, D. (1982). Ammonium handling by superficial and juxtamedullary nephrons in the rat. Evidence for an ammonia shunt between the loop of Henle and the collecting duct. *J Clin Invest, 70*(1), 1-12.

Buerkert, J., Martin, D., & Trigg, D. (1983). Segmental analysis of the renal tubule in buffer production and net acid formation. *Am J Physiol, 244*(4), F442-454.

Burnham, C. E., Flagella, M., Wang, Z., Amlal, H., Shull, G. E., & Soleimani, M. (1998). Cloning, renal distribution, and regulation of the rat Na+-HCO3- cotransporter. *Am J Physiol, 274*(6 Pt 2), F1119-1126.

Capasso, G., Unwin, R., Ciani, F., De Santo, N. G., De Tommaso, G., Russo, F., & Giebisch, G. (1994). Bicarbonate transport along the loop of Henle. II. Effects of acid-base, dietary, and neurohumoral determinants. *J Clin Invest, 94*(2), 830-838.

Chalhoub, N., Benachenhou, N., Rajapurohitam, V., Pata, M., Ferron, M., Frattini, A., . . . Vacher, J. (2003). Grey-lethal mutation induces severe malignant autosomal recessive osteopetrosis in mouse and human. *Nat Med, 9*(4), 399-406. doi:10.1038/nm842

Chambrey, R., Kurth, I., Peti-Peterdi, J., Houillier, P., Purkerson, J. M., Leviel, F., . . . Eladari, D. (2013). Renal intercalated cells are rather energized by a proton than a sodium pump. *Proc Natl Acad Sci U S A, 110*(19), 7928-7933. doi:10.1073/pnas.1221496110

Chambrey, R., Paillard, M., & Podevin, R. A. (1994). Enzymatic and functional evidence for adaptation of the vacuolar H(+)-ATPase in proximal tubule apical membranes from rats with chronic metabolic acidosis. *J Biol Chem, 269*(5), 3243-3250.

Chambrey, R., St John, P. L., Eladari, D., Quentin, F., Warnock, D. G., Abrahamson, D. R., . . . Paillard, M. (2001). Localization and functional characterization of Na+/H+ exchanger isoform NHE4 in rat thick ascending limbs. *Am J Physiol Renal Physiol, 281*(4), F707-717.

Chambrey, R., & Trepiccione, F. (2015). Relative roles of principal and intercalated cells in the regulation of sodium balance and blood pressure. *Curr Hypertens Rep, 17*(4), 538. doi:10.1007/s11906-015-0538-0

Chambrey, R., Warnock, D. G., Podevin, R. A., Bruneval, P., Mandet, C., Belair, M. F., . . . Paillard, M. (1998). Immunolocalization of the Na+/H+ exchanger isoform NHE2 in rat kidney. *Am J Physiol, 275*(3 Pt 2), F379-386.

Chu, C. Y., King, J. C., Berrini, M., Alexander, R. T., & Cordat, E. (2013). Functional rescue of a kidney anion exchanger 1 trafficking mutant in renal epithelial cells. *PLoS One, 8*(2), e57062. doi:10.1371/journal.pone.0057062

Cogan, M. G., Maddox, D. A., Lucci, M. S., & Rector, F. C., Jr. (1979). Control of proximal bicarbonate reabsorption in normal and acidotic rats. *J Clin Invest, 64*(5), 1168-1180.

Cordat, E., Kittanakom, S., Yenchitsomanus, P. T., Li, J., Du, K., Lukacs, G. L., & Reithmeier, R. A. (2006). Dominant and recessive distal renal tubular acidosis mutations of kidney anion exchanger 1 induce distinct trafficking defects in MDCK cells. *Traffic, 7*(2), 117-128. doi:10.1111/j.1600-0854.2005.00366.x

Cordat, E., & Reithmeier, R. A. (2014). Structure, function, and trafficking of SLC4 and SLC26 anion transporters. *Curr Top Membr, 73*, 1-67. doi:10.1016/b978-0-12-800223-0.00001-3

Coury, F., Zenger, S., Stewart, A. K., Stephens, S., Neff, L., Tsang, K., . . . Aliprantis, A. O. (2013). SLC4A2-mediated Cl-/HCO3- exchange activity is essential for calpain-dependent regulation of the actin cytoskeleton in osteoclasts. *Proc Natl Acad Sci U S A, 110*(6), 2163-2168. doi:10.1073/pnas.1206392110

Curthoys, N. P., & Moe, O. W. (2014). Proximal tubule function and response to acidosis. *Clin J Am Soc Nephrol, 9*(9), 1627-1638. doi:10.2215/cjn.10391012

Depienne, C., Bugiani, M., Dupuits, C., Galanaud, D., Touitou, V., Postma, N., . . . van der Knaap, M. S. (2013). Brain white matter oedema due to ClC-2 chloride channel deficiency: an observational analytical study. *Lancet Neurol, 12*(7), 659-668. doi:10.1016/s1474-4422(13)70053-x

Devonald, M. A., Smith, A. N., Poon, J. P., Ihrke, G., & Karet, F. E. (2003). Non-polarized targeting of AE1 causes autosomal dominant distal renal tubular acidosis. *Nat Genet, 33*(2), 125-127. doi:10.1038/ng1082

Di Bella, D., Pareyson, D., Savoiardo, M., Farina, L., Ciano, C., Caldarazzo, S., . . . Salsano, E. (2014). Subclinical leukodystrophy and infertility in a man with a novel homozygous CLCN2 mutation. *Neurology, 83*(13), 1217-1218. doi:10.1212/wnl.0000000000000812

Dickerson, L. W., Bonthius, D. J., Schutte, B. C., Yang, B., Barna, T. J., Bailey, M. C., . . . Lamb, F. S. (2002). Altered GABAergic function accompanies hippocampal degeneration in mice lacking ClC-3 voltage-gated chloride channels. *Brain Res, 958*(2), 227-250.

Dou, H., Finberg, K., Cardell, E. L., Lifton, R., & Choo, D. (2003). Mice lacking the B1 subunit of H+ -ATPase have normal hearing. *Hear Res, 180*(1-2), 76-84.

DuBose, T. D., Jr., & Good, D. W. (1991). Role of the thick ascending limb and inner medullary collecting duct in the regulation of urinary acidification. *Semin Nephrol, 11*(2), 120-128.

DuBose, T. D., Jr., Good, D. W., Hamm, L. L., & Wall, S. M. (1991). Ammonium transport in the kidney: new physiological concepts and their clinical implications. *J Am Soc Nephrol, 1*(11), 1193-1203.

DuBose, T. D., Jr., Lucci, M. S., Hogg, R. J., Pucacco, L. R., Kokko, J. P., & Carter, N. W. (1983). Comparison of acidification parameters in superficial and deep nephrons of the rat. *Am J Physiol, 244*(5), F497-503.

DuBose, T. D., Jr., Pucacco, L. R., Lucci, M. S., & Carter, N. W. (1979). Micropuncture determination of pH, PCO2, and total CO2 concentration in accessible structures of the rat renal cortex. *J Clin Invest, 64*(2), 476-482. doi:10.1172/jci109485

Dutzler, R., Campbell, E. B., Cadene, M., Chait, B. T., & MacKinnon, R. (2002). X-ray structure of a ClC chloride channel at 3.0 A reveals the molecular basis of anion selectivity. *Nature, 415*(6869), 287-294. doi:10.1038/415287a

Dutzler, R., Campbell, E. B., & MacKinnon, R. (2003). Gating the selectivity filter in ClC chloride channels. *Science, 300*(5616), 108-112. doi:10.1126/science.1082708

Ecelbarger, C. A., Terris, J., Frindt, G., Echevarria, M., Marples, D., Nielsen, S., & Knepper, M. A. (1995). Aquaporin-3 water channel localization and regulation in rat kidney. *Am J Physiol, 269*(5 Pt 2), F663-672.

Eladari, D., Blanchard, A., Leviel, F., Paillard, M., Stuart-Tilley, A. K., Alper, S. L., & Podevin, R. A. (1998). Functional and molecular characterization of luminal and basolateral Cl-/HCO-3 exchangers of rat thick limbs. *Am J Physiol, 275*(3 Pt 2), F334-342.

Eladari, D., Chambrey, R., Picard, N., & Hadchouel, J. (2014). Electroneutral absorption of NaCl by the aldosterone-sensitive distal nephron: implication for normal electrolytes homeostasis and blood pressure regulation. *Cell Mol Life Sci, 71*(15), 2879-2895. doi:10.1007/s00018-014-1585-4

Eladari, D., Leviel, F., Pezy, F., Paillard, M., & Chambrey, R. (2002). Rat proximal NHE3 adapts to chronic acid-base disorders but not to chronic changes in dietary NaCl intake. *Am J Physiol Renal Physiol, 282*(5), F835-843. doi:10.1152/ajprenal.00188.2001

Embark, H. M., Bohmer, C., Palmada, M., Rajamanickam, J., Wyatt, A. W., Wallisch, S., . . . Lang, F. (2004). Regulation of CLC-Ka/barttin by the ubiquitin ligase Nedd4-2 and the serum- and glucocorticoid-dependent kinases. *Kidney Int, 66*(5), 1918-1925. doi:10.1111/j.1523-1755.2004.00966.x

Estevez, R., Boettger, T., Stein, V., Birkenhager, R., Otto, E., Hildebrandt, F., & Jentsch, T. J. (2001). Barttin is a Cl- channel beta-subunit crucial for renal Cl- reabsorption and inner ear K+ secretion. *Nature, 414*(6863), 558-561. doi:10.1038/35107099

Estevez, R., Pusch, M., Ferrer-Costa, C., Orozco, M., & Jentsch, T. J. (2004). Functional and structural conservation of CBS domains from CLC chloride channels. *J Physiol, 557*(Pt 2), 363-378. doi:10.1113/jphysiol.2003.058453

Fahlke, C., & Fischer, M. (2010). Physiology and pathophysiology of ClC-K/barttin channels. *Front Physiol, 1*, 155. doi:10.3389/fphys.2010.00155

Finberg, K. E., Wagner, C. A., Bailey, M. A., Paunescu, T. G., Breton, S., Brown, D., . . . Lifton, R. P. (2005). The B1-subunit of the H(+) ATPase is required for maximal urinary acidification. *Proc Natl Acad Sci U S A, 102*(38), 13616-13621. doi:10.1073/pnas.0506769102

Fischer, M., Janssen, A. G., & Fahlke, C. (2010). Barttin activates ClC-K channel function by modulating gating. *J Am Soc Nephrol, 21*(8), 1281-1289. doi:10.1681/asn.2009121274

Fisher, S. E., Black, G. C., Lloyd, S. E., Hatchwell, E., Wrong, O., Thakker, R. V., & 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*(11), 2053-2059.

Fong, P., Rehfeldt, A., & Jentsch, T. J. (1998). Determinants of slow gating in ClC-0, the voltage-gated chloride channel of Torpedo marmorata. *Am J Physiol, 274*(4 Pt 1), C966-973.

Frattini, A., Pangrazio, A., Susani, L., Sobacchi, C., Mirolo, M., Abinun, M., . . . Villa, A. (2003). Chloride channel ClCN7 mutations are responsible for severe recessive, dominant, and intermediate osteopetrosis. *J Bone Miner Res, 18*(10), 1740-1747. doi:10.1359/jbmr.2003.18.10.1740

Friedrich, T., Breiderhoff, T., & Jentsch, T. J. (1999). Mutational analysis demonstrates that ClC-4 and ClC-5 directly mediate plasma membrane currents. *J Biol Chem, 274*(2), 896-902.

Froissart, M., Borensztein, P., Houillier, P., Leviel, F., Poggioli, J., Marty, E., . . . Paillard, M. (1992). Plasma membrane Na(+)-H+ antiporter and H(+)-ATPase in the medullary thick ascending limb of rat kidney. *Am J Physiol, 262*(4 Pt 1), C963-970.

Frumence, E., Genetet, S., Ripoche, P., Iolascon, A., Andolfo, I., Le Van Kim, C., . . . Lopez, C. (2013). Rapid Cl(-)/HCO(-)(3)exchange kinetics of AE1 in HEK293 cells and hereditary stomatocytosis red blood cells. *Am J Physiol Cell Physiol, 305*(6), C654-662. doi:10.1152/ajpcell.00142.2013

Garcia-Nieto, V., Flores, C., Luis-Yanes, M. I., Gallego, E., Villar, J., & Claverie-Martin, F. (2006). Mutation G47R in the BSND gene causes Bartter syndrome with deafness in two Spanish families. *Pediatr Nephrol, 21*(5), 643-648. doi:10.1007/s00467-006-0062-1

Garvin, J. L., Burg, M. B., & Knepper, M. A. (1988). Active NH4+ absorption by the thick ascending limb. *Am J Physiol, 255*(1 Pt 2), F57-65.

Gawenis, L. R., Bradford, E. M., Prasad, V., Lorenz, J. N., Simpson, J. E., Clarke, L. L., . . . Shull, G. E. (2007). Colonic anion secretory defects and metabolic acidosis in mice lacking the NBC1 Na+/HCO3- cotransporter. *J Biol Chem, 282*(12), 9042-9052. doi:10.1074/jbc.M607041200

Gawenis, L. R., Ledoussal, C., Judd, L. M., Prasad, V., Alper, S. L., Stuart-Tilley, A., . . . Shull, G. E. (2004). Mice with a targeted disruption of the AE2 Cl-/HCO3- exchanger are achlorhydric. *J Biol Chem, 279*(29), 30531-30539. doi:10.1074/jbc.M403779200

Geyer, R. R., Parker, M. D., Toye, A. M., Boron, W. F., & Musa-Aziz, R. (2013). Relative CO(2)/NH(3) permeabilities of human RhAG, RhBG and RhCG. *J Membr Biol, 246*(12), 915-926. doi:10.1007/s00232-013-9593-0

Gong, F., Alzamora, R., Smolak, C., Li, H., Naveed, S., Neumann, D., . . . Pastor-Soler, N. M. (2010). Vacuolar H+-ATPase apical accumulation in kidney intercalated cells is regulated by PKA and AMP-activated protein kinase. *Am J Physiol Renal Physiol, 298*(5), F1162-1169. doi:10.1152/ajprenal.00645.2009

Gong, W., Xu, H., Shimizu, T., Morishima, S., Tanabe, S., Tachibe, T., . . . Okada, Y. (2004). ClC-3-independent, PKC-dependent activity of volume-sensitive Cl channel in mouse ventricular cardiomyocytes. *Cell Physiol Biochem, 14*(4-6), 213-224. doi:10.1159/000080330

Good, D. W. (1988a). Active absorption of NH4+ by rat medullary thick ascending limb: inhibition by potassium. *Am J Physiol, 255*(1 Pt 2), F78-87.

Good, D. W. (1988b). Active absorption of NH4+ by thick ascending limb. *Contrib Nephrol, 63*, 12-15.

Good, D. W. (1989). Regulation of acid-base transport in the rat thick ascending limb. *Am J Kidney Dis, 14*(4), 262-266.

Good, D. W. (1990a). Adaptation of HCO-3 and NH+4 transport in rat MTAL: effects of chronic metabolic acidosis and Na+ intake. *Am J Physiol, 258*(5 Pt 2), F1345-1353.

Good, D. W. (1990b). Bicarbonate absorption by the thick ascending limb of Henle's loop. *Semin Nephrol, 10*(2), 132-138.

Good, D. W. (1993). The thick ascending limb as a site of renal bicarbonate reabsorption. *Semin Nephrol, 13*(2), 225-235.

Good, D. W., & Knepper, M. A. (1990). Mechanisms of ammonium excretion: role of the renal medulla. *Semin Nephrol, 10*(2), 166-173.

Gradogna, A., Babini, E., Picollo, A., & Pusch, M. (2010). A regulatory calcium-binding site at the subunit interface of CLC-K kidney chloride channels. *J Gen Physiol, 136*(3), 311-323. doi:10.1085/jgp.201010455

Greenlee, M. M., Lynch, I. J., Gumz, M. L., Cain, B. D., & Wingo, C. S. (2010). The renal H,K-ATPases. *Curr Opin Nephrol Hypertens, 19*(5), 478-482. doi:10.1097/MNH.0b013e32833ce65f

Grichtchenko, II, Choi, I., Zhong, X., Bray-Ward, P., Russell, J. M., & Boron, W. F. (2001). Cloning, characterization, and chromosomal mapping of a human electroneutral Na(+)-driven Cl-HCO3 exchanger. *J Biol Chem, 276*(11), 8358-8363. doi:10.1074/jbc.C000716200

Grunder, S., Thiemann, A., Pusch, M., & Jentsch, T. J. (1992). Regions involved in the opening of CIC-2 chloride channel by voltage and cell volume. *Nature, 360*(6406), 759-762. doi:10.1038/360759a0

Gunther, W., Luchow, A., Cluzeaud, F., Vandewalle, A., & 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 U S A, 95*(14), 8075-8080.

Guyton, A. C., Manning, R. D., Jr., Norman, R. A., Jr., Montani, J. P., Lohmeier, T. E., & Hall, J. E. (1986). Current concepts and perspectives of renal volume regulation in relationship to hypertension. *J Hypertens Suppl, 4*(4), S49-56.

Guzman, R. E., Grieschat, M., Fahlke, C., & Alekov, A. K. (2013). ClC-3 is an intracellular chloride/proton exchanger with large voltage-dependent nonlinear capacitance. *ACS Chem Neurosci, 4*(6), 994-1003. doi:10.1021/cn400032z

Hall, J. E., Guyton, A. C., Coleman, T. G., Mizelle, H. L., & Woods, L. L. (1986). Regulation of arterial pressure: role of pressure natriuresis and diuresis. *Fed Proc, 45*(13), 2897-2903.

Hamm, L. L., Nakhoul, N., & Hering-Smith, K. S. (2015). Acid-Base Homeostasis. *Clin J Am Soc Nephrol, 10*(12), 2232-2242. doi:10.2215/cjn.07400715

Hamm, L. L., & Simon, E. E. (1990). Ammonia transport in the proximal tubule. *Miner Electrolyte Metab, 16*(5), 283-290.

Hanke, W., & Miller, C. (1983). Single chloride channels from Torpedo electroplax. Activation by protons. *J Gen Physiol, 82*(1), 25-45.

Hara-Chikuma, M., Yang, B., Sonawane, N. D., Sasaki, S., Uchida, S., & Verkman, A. S. (2005). ClC-3 chloride channels facilitate endosomal acidification and chloride accumulation. *J Biol Chem, 280*(2), 1241-1247. doi:10.1074/jbc.M407030200

Hawkins, M., Pope, B., Maciver, S. K., & Weeds, A. G. (1993). Human actin depolymerizing factor mediates a pH-sensitive destruction of actin filaments. *Biochemistry, 32*(38), 9985-9993.

Hayama, A., Rai, T., Sasaki, S., & Uchida, S. (2003). Molecular mechanisms of Bartter syndrome caused by mutations in the BSND gene. *Histochem Cell Biol, 119*(6), 485-493. doi:10.1007/s00418-003-0535-2

Hebert, S. C. (2003). Bartter syndrome. *Curr Opin Nephrol Hypertens, 12*(5), 527-532. doi:10.1097/01.mnh.0000088732.87142.43

Hennings, J. C., Picard, N., Huebner, A. K., Stauber, T., Maier, H., Brown, D., . . . Hubner, C. A. (2012). A mouse model for distal renal tubular acidosis reveals a previously unrecognized role of the V-ATPase a4 subunit in the proximal tubule. *EMBO Mol Med, 4*(10), 1057-1071. doi:10.1002/emmm.201201527

Hoegg-Beiler, M. B., Sirisi, S., Orozco, I. J., Ferrer, I., Hohensee, S., Auberson, M., . . . Jentsch, T. J. (2014). Disrupting MLC1 and GlialCAM and ClC-2 interactions in leukodystrophy entails glial chloride channel dysfunction. *Nat Commun, 5*, 3475. doi:10.1038/ncomms4475

Hood, V. L., & Tannen, R. L. (1998). Protection of acid-base balance by pH regulation of acid production. *N Engl J Med, 339*(12), 819-826. doi:10.1056/nejm199809173391207

Hu, H., Haas, S. A., Chelly, J., Van Esch, H., Raynaud, M., de Brouwer, A. P., . . . Kalscheuer, V. M. (2016). X-exome sequencing of 405 unresolved families identifies seven novel intellectual disability genes. *Mol Psychiatry, 21*(1), 133-148. doi:10.1038/mp.2014.193

Igarashi, T., Inatomi, J., Sekine, T., Cha, S. H., Kanai, Y., Kunimi, M., . . . Endou, H. (1999). Mutations in SLC4A4 cause permanent isolated proximal renal tubular acidosis with ocular abnormalities. *Nat Genet, 23*(3), 264-266. doi:10.1038/15440

Imbrici, P., Liantonio, A., Gradogna, A., Pusch, M., & Camerino, D. C. (2014). Targeting kidney CLC-K channels: pharmacological profile in a human cell line versus Xenopus oocytes. *Biochim Biophys Acta, 1838*(10), 2484-2491. doi:10.1016/j.bbamem.2014.05.017

Jacques, T., Picard, N., Miller, R. L., Riemondy, K. A., Houillier, P., Sohet, F., . . . Eladari, D. (2013). Overexpression of pendrin in intercalated cells produces chloride-sensitive hypertension. *J Am Soc Nephrol, 24*(7), 1104-1113. doi:10.1681/ASN.2012080787

Janssen, A. G., Scholl, U., Domeyer, C., Nothmann, D., Leinenweber, A., & Fahlke, C. (2009). Disease-causing dysfunctions of barttin in Bartter syndrome type IV. *J Am Soc Nephrol, 20*(1), 145-153. doi:10.1681/asn.2008010102

Jarolim, P., Shayakul, C., Prabakaran, D., Jiang, L., Stuart-Tilley, A., Rubin, H. L., . . . Alper, S. L. (1998). Autosomal dominant distal renal tubular acidosis is associated in three families with heterozygosity for the R589H mutation in the AE1 (band 3) Cl-/HCO3- exchanger. *J Biol Chem, 273*(11), 6380-6388.

Jeck, N., Waldegger, P., Doroszewicz, J., Seyberth, H., & Waldegger, S. (2004). A common sequence variation of the CLCNKB gene strongly activates ClC-Kb chloride channel activity. *Kidney Int, 65*(1), 190-197. doi:10.1111/j.1523-1755.2004.00363.x

Jeck, N., Waldegger, S., Lampert, A., Boehmer, C., Waldegger, P., Lang, P. A., . . . Lang, F. (2004). Activating mutation of the renal epithelial chloride channel ClC-Kb predisposing to hypertension. *Hypertension, 43*(6), 1175-1181. doi:10.1161/01.HYP.0000129824.12959.f0

Jentsch, T. J. (2008). CLC chloride channels and transporters: from genes to protein structure, pathology and physiology. *Crit Rev Biochem Mol Biol, 43*(1), 3-36. doi:10.1080/10409230701829110

Jentsch, T. J., Gunther, W., Pusch, M., & Schwappach, B. (1995). Properties of voltage-gated chloride channels of the ClC gene family. *J Physiol, 482*, 19s-25s.

Jentsch, T. J., Maritzen, T., & Zdebik, A. A. (2005). Chloride channel diseases resulting from impaired transepithelial transport or vesicular function. *J Clin Invest, 115*(8), 2039-2046. doi:10.1172/jci25470

Jentsch TJ, S. K., Schwarz G. (1990). Primary structure of Torpedo marmorata chloride channel isolated by expression cloning in Xenopus oocytes. *Nature*.

Jeworutzki, E., Lopez-Hernandez, T., Capdevila-Nortes, X., Sirisi, S., Bengtsson, L., Montolio, M., . . . Estevez, R. (2012). GlialCAM, a protein defective in a leukodystrophy, serves as a ClC-2 Cl(-) channel auxiliary subunit. *Neuron, 73*(5), 951-961. doi:10.1016/j.neuron.2011.12.039

Jordt, S. E., & Jentsch, T. J. (1997). Molecular dissection of gating in the ClC-2 chloride channel. *Embo j, 16*(7), 1582-1592. doi:10.1093/emboj/16.7.1582

Karet, F. E. (2009). Mechanisms in hyperkalemic renal tubular acidosis. *J Am Soc Nephrol, 20*(2), 251-254. doi:10.1681/asn.2008020166

Karet, F. E., Gainza, F. J., Gyory, A. Z., Unwin, R. J., Wrong, O., Tanner, M. J., . . . Lifton, R. P. (1998). Mutations in the chloride-bicarbonate exchanger gene AE1 cause autosomal dominant but not autosomal recessive distal renal tubular acidosis. *Proc Natl Acad Sci U S A, 95*(11), 6337-6342.

Kasper, D., Planells-Cases, R., Fuhrmann, J. C., Scheel, O., Zeitz, O., Ruether, K., . . . Jentsch, T. J. (2005). Loss of the chloride channel ClC-7 leads to lysosomal storage disease and neurodegeneration. *Embo j, 24*(5), 1079-1091. doi:10.1038/sj.emboj.7600576

Kieferle, S., Fong, P., Bens, M., Vandewalle, A., & Jentsch, T. J. (1994). Two highly homologous members of the ClC chloride channel family in both rat and human kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A, 91*(15), 6943-6947.

Kitanaka, S., Sato, U., Maruyama, K., & Igarashi, T. (2006). A compound heterozygous mutation in the BSND gene detected in Bartter syndrome type IV. *Pediatr Nephrol, 21*(2), 190-193. doi:10.1007/s00467-005-2091-6

Knauf, F., Yang, C. L., Thomson, R. B., Mentone, S. A., Giebisch, G., & Aronson, P. S. (2001). Identification of a chloride-formate exchanger expressed on the brush border membrane of renal proximal tubule cells. *Proc Natl Acad Sci U S A, 98*(16), 9425-9430. doi:10.1073/pnas.141241098

Kobayashi, K., Uchida, S., Mizutani, S., Sasaki, S., & Marumo, F. (2001). Intrarenal and cellular localization of CLC-K2 protein in the mouse kidney. *J Am Soc Nephrol, 12*(7), 1327-1334.

Kobayashi, K., Uchida, S., Okamura, H. O., Marumo, F., & Sasaki, S. (2002). Human CLC-KB gene promoter drives the EGFP expression in the specific distal nephron segments and inner ear. *J Am Soc Nephrol, 13*(8), 1992-1998.

Koch, M. C., Steinmeyer, K., Lorenz, C., Ricker, K., Wolf, F., Otto, M., . . . Jentsch, T. J. (1992). The skeletal muscle chloride channel in dominant and recessive human myotonia. *Science, 257*(5071), 797-800.

Komatsu, M., Kurokawa, H., Waguri, S., Taguchi, K., Kobayashi, A., Ichimura, Y., . . . Yamamoto, M. (2010). The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nat Cell Biol, 12*(3), 213-223. doi:10.1038/ncb2021

Kornak, U., Kasper, D., Bosl, M. R., Kaiser, E., Schweizer, M., Schulz, A., . . . Jentsch, T. J. (2001). Loss of the ClC-7 chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man. *Cell, 104*(2), 205-215.

Kriz, W., & Bankir, L. (1988). A standard nomenclature for structures of the kidney. The Renal Commission of the International Union of Physiological Sciences (IUPS). *Kidney Int, 33*(1), 1-7.

Kurtz, T. W., Al-Bander, H. A., & Morris, R. C., Jr. (1987). "Salt-sensitive" essential hypertension in men. Is the sodium ion alone important? *N Engl J Med, 317*(17), 1043-1048. doi:10.1056/nejm198710223171702

Kwon, T. H., Nielsen, J., Moller, H. B., Fenton, R. A., Nielsen, S., & Frokiaer, J. (2009). Aquaporins in the kidney. *Handb Exp Pharmacol*(190), 95-132. doi:10.1007/978-3-540-79885-9_5

Lange, P. F., Wartosch, L., Jentsch, T. J., & Fuhrmann, J. C. (2006). ClC-7 requires Ostm1 as a beta-subunit to support bone resorption and lysosomal function. *Nature, 440*(7081), 220-223. doi:10.1038/nature04535

Leegwater, P. A., Yuan, B. Q., van der Steen, J., Mulders, J., Konst, A. A., Boor, P. K., . . . van der Knaap, M. S. (2001). Mutations of MLC1 (KIAA0027), encoding a putative membrane protein, cause megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Am J Hum Genet, 68*(4), 831-838. doi:10.1086/319519

Leisle, L., Ludwig, C. F., Wagner, F. A., Jentsch, T. J., & Stauber, T. (2011). ClC-7 is a slowly voltage-gated 2Cl(-)/1H(+)-exchanger and requires Ostm1 for transport activity. *Embo j, 30*(11), 2140-2152. doi:10.1038/emboj.2011.137

Lemann, J., Jr., Bushinsky, D. A., & Hamm, L. L. (2003). Bone buffering of acid and base in humans. *Am J Physiol Renal Physiol, 285*(5), F811-832. doi:10.1152/ajprenal.00115.2003

Leviel, F., Eladari, D., Blanchard, A., Poumarat, J. S., Paillard, M., & Podevin, R. A. (1999). Pathways for HCO-3 exit across the basolateral membrane in rat thick limbs. *Am J Physiol, 276*(6 Pt 2), F847-856.

Leviel, F., Hubner, C. A., Houillier, P., Morla, L., El Moghrabi, S., Brideau, G., . . . Eladari, D. (2010). The Na+-dependent chloride-bicarbonate exchanger SLC4A8 mediates an electroneutral Na+ reabsorption process in the renal cortical collecting ducts of mice. *J Clin Invest, 120*(5), 1627-1635. doi:10.1172/jci40145

Lewis, S. E., Erickson, R. P., Barnett, L. B., Venta, P. J., & Tashian, R. E. (1988). N-ethyl-N-nitrosourea-induced null mutation at the mouse Car-2 locus: an animal model for human carbonic anhydrase II deficiency syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A, 85*(6), 1962-1966.

Li, H. C., Du, Z., Barone, S., Rubera, I., McDonough, A. A., Tauc, M., . . . Soleimani, M. (2013). Proximal tubule specific knockout of the Na(+)/H(+) exchanger NHE3: effects on bicarbonate absorption and ammonium excretion. *J Mol Med (Berl), 91*(8), 951-963. doi:10.1007/s00109-013-1015-3

Lo, Y. F., Yang, S. S., Seki, G., Yamada, H., Horita, S., Yamazaki, O., . . . Lin, S. H. (2011). Severe metabolic acidosis causes early lethality in NBC1 W516X knock-in mice as a model of human isolated proximal renal tubular acidosis. *Kidney Int, 79*(7), 730-741. doi:10.1038/ki.2010.523

Lobet, S., & Dutzler, R. (2006). Ion-binding properties of the ClC chloride selectivity filter. *Embo j, 25*(1), 24-33. doi:10.1038/sj.emboj.7600909

Lopez-Hernandez, T., Ridder, M. C., Montolio, M., Capdevila-Nortes, X., Polder, E., Sirisi, S., . . . van der Knaap, M. S. (2011). Mutant GlialCAM causes megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts, benign familial macrocephaly, and macrocephaly with retardation and autism. *Am J Hum Genet, 88*(4), 422-432. doi:10.1016/j.ajhg.2011.02.009

Lourdel, S., Grand, T., Burgos, J., Gonzalez, W., Sepulveda, F. V., & Teulon, J. (2012). ClC-5 mutations associated with Dent's disease: a major role of the dimer interface. *Pflugers Arch, 463*(2), 247-256. doi:10.1007/s00424-011-1052-0

Lourdel, S., Paulais, M., Marvao, P., Nissant, A., & Teulon, J. (2003). A chloride channel at the basolateral membrane of the distal-convoluted tubule: a candidate ClC-K channel. *J Gen Physiol, 121*(4), 287-300. doi:10.1085/jgp.200208737

Madsen, K. M., Verlander, J. W., & Tisher, C. C. (1988). Relationship between structure and function in distal tubule and collecting duct. *J Electron Microsc Tech, 9*(2), 187-208. doi:10.1002/jemt.1060090206

Magen, D., Adler, L., Mandel, H., Efrati, E., & Zelikovic, I. (2004). Autosomal recessive renal proximal tubulopathy and hypercalciuria: a new syndrome. *Am J Kidney Dis, 43*(4), 600-606.

Martinez, G. Q., & Maduke, M. (2008). A cytoplasmic domain mutation in ClC-Kb affects long-distance communication across the membrane. *PLoS One, 3*(7), e2746. doi:10.1371/journal.pone.0002746

Masilamani, S., Kim, G. H., Mitchell, C., Wade, J. B., & Knepper, M. A. (1999). Aldosterone-mediated regulation of ENaC alpha, beta, and gamma subunit proteins in rat kidney. *J Clin Invest, 104*(7), R19-23. doi:10.1172/jci7840

Matsumura, Y., Uchida, S., Kondo, Y., Miyazaki, H., Ko, S. B., Hayama, A., . . . Marumo, F. (1999). Overt nephrogenic diabetes insipidus in mice lacking the CLC-K1 chloride channel. *Nat Genet, 21*(1), 95-98. doi:10.1038/5036

Maunsbach, A. B., Vorum, H., Kwon, T. H., Nielsen, S., Simonsen, B., Choi, I., . . . Aalkjaer, C. (2000). Immunoelectron microscopic localization of the electrogenic Na/HCO(3) cotransporter in rat and ambystoma kidney. *J Am Soc Nephrol, 11*(12), 2179-2189.

Maurel, S., Stankovic Stojanovic, K., Avellino, V., Girshovich, A., Letavernier, E., Grateau, G., . . . Haymann, J. P. (2014). Prevalence and correlates of metabolic acidosis among patients with homozygous sickle cell disease. *Clin J Am Soc Nephrol, 9*(4), 648-653. doi:10.2215/CJN.09790913

McSherry, E., Sebastian, A., & Morris, R. C., Jr. (1972). Renal tubular acidosis in infants: the several kinds, including bicarbonate-wasting, classic renal tubular acidosis. *J Clin Invest, 51*(3), 499-514.

Miller, C., & White, M. M. (1984). Dimeric structure of single chloride channels from Torpedo electroplax. *Proc Natl Acad Sci U S A, 81*(9), 2772-2775.

Mohammad-Panah, R., Harrison, R., Dhani, S., Ackerley, C., Huan, L. J., Wang, Y., & Bear, C. E. (2003). The chloride channel ClC-4 contributes to endosomal acidification and trafficking. *J Biol Chem, 278*(31), 29267-29277. doi:10.1074/jbc.M304357200

Musa-Aziz, R., Chen, L. M., Pelletier, M. F., & Boron, W. F. (2009). Relative CO2/NH3 selectivities of AQP1, AQP4, AQP5, AmtB, and RhAG. *Proc Natl Acad Sci U S A, 106*(13), 5406-5411. doi:10.1073/pnas.0813231106

Nagami, G. T. (1990). Ammonia production and secretion by isolated perfused proximal tubule segments. *Miner Electrolyte Metab, 16*(5), 259-263.

Neagoe, I., Stauber, T., Fidzinski, P., Bergsdorf, E. Y., & Jentsch, T. J. (2010). The late endosomal ClC-6 mediates proton/chloride countertransport in heterologous plasma membrane expression. *J Biol Chem, 285*(28), 21689-21697. doi:10.1074/jbc.M110.125971

Nissant, A., Lourdel, S., Baillet, S., Paulais, M., Marvao, P., Teulon, J., & Imbert-Teboul, M. (2004). Heterogeneous distribution of chloride channels along the distal convoluted tubule probed by single-cell RT-PCR and patch clamp. *Am J Physiol Renal Physiol, 287*(6), F1233-1243. doi:10.1152/ajprenal.00155.2004

Nissant, A., Paulais, M., Lachheb, S., Lourdel, S., & Teulon, J. (2006). Similar chloride channels in the connecting tubule and cortical collecting duct of the mouse kidney. *Am J Physiol Renal Physiol, 290*(6), F1421-1429. doi:10.1152/ajprenal.00274.2005

Nomura, N., Tajima, M., Sugawara, N., Morimoto, T., Kondo, Y., Ohno, M., . . . Uchida, S. (2011). Generation and analyses of R8L barttin knockin mouse. *Am J Physiol Renal Physiol, 301*(2), F297-307. doi:10.1152/ajprenal.00604.2010

Nozu, K., Inagaki, T., Fu, X. J., Nozu, Y., Kaito, H., Kanda, K., . . . Matsuo, M. (2008). Molecular analysis of digenic inheritance in Bartter syndrome with sensorineural deafness. *J Med Genet, 45*(3), 182-186. doi:10.1136/jmg.2007.052944

Nykjaer, A., Dragun, D., Walther, D., Vorum, H., Jacobsen, C., Herz, J., . . . Willnow, T. E. (1999). An endocytic pathway essential for renal uptake and activation of the steroid 25-(OH) vitamin D3. *Cell, 96*(4), 507-515.

Ozlu, F., Yapicioglu, H., Satar, M., Narli, N., Ozcan, K., Buyukcelik, M., . . . Demirhan, O. (2006). Barttin mutations in antenatal Bartter syndrome with sensorineural deafness. *Pediatr Nephrol, 21*(7), 1056-1057. doi:10.1007/s00467-006-0108-4

Paunescu, T. G., Ljubojevic, M., Russo, L. M., Winter, C., McLaughlin, M. M., Wagner, C. A., . . . Brown, D. (2010). cAMP stimulates apical V-ATPase accumulation, microvillar elongation, and proton extrusion in kidney collecting duct A-intercalated cells. *Am J Physiol Renal Physiol, 298*(3), F643-654. doi:10.1152/ajprenal.00584.2009

Pearce, S. H. (1998). Straightening out the renal tubule: advances in the molecular basis of the inherited tubulopathies. *Qjm, 91*(1), 5-12.

Picollo, A., & Pusch, M. (2005). Chloride/proton antiporter activity of mammalian CLC proteins ClC-4 and ClC-5. *Nature, 436*(7049), 420-423. doi:10.1038/nature03720

Piwon, N., Gunther, W., Schwake, M., Bosl, M. R., & Jentsch, T. J. (2000). ClC-5 Cl- -channel disruption impairs endocytosis in a mouse model for Dent's disease. *Nature, 408*(6810), 369-373. doi:10.1038/35042597

Poet, M., Kornak, U., Schweizer, M., Zdebik, A. A., Scheel, O., Hoelter, S., . . . Jentsch, T. J. (2006). Lysosomal storage disease upon disruption of the neuronal chloride transport protein ClC-6. *Proc Natl Acad Sci U S A, 103*(37), 13854-13859. doi:10.1073/pnas.0606137103

Pressey, S. N., O'Donnell, K. J., Stauber, T., Fuhrmann, J. C., Tyynela, J., Jentsch, T. J., & Cooper, J. D. (2010). Distinct neuropathologic phenotypes after disrupting the chloride transport proteins ClC-6 or ClC-7/Ostm1. *J Neuropathol Exp Neurol, 69*(12), 1228-1246. doi:10.1097/NEN.0b013e3181ffe742

Pusch, M. (1996). Knocking on channel's door. The permeating chloride ion acts as the gating charge in ClC-0. *J Gen Physiol, 108*(4), 233-236.

Pusch, M. (2004). Structural insights into chloride and proton-mediated gating of CLC chloride channels. *Biochemistry, 43*(5), 1135-1144. doi:10.1021/bi0359776

Pusch, M., Steinmeyer, K., Koch, M. C., & Jentsch, T. J. (1995). Mutations in dominant human myotonia congenita drastically alter the voltage dependence of the CIC-1 chloride channel. *Neuron, 15*(6), 1455-1463.

Quamme, G. A. (1997). Renal magnesium handling: new insights in understanding old problems. *Kidney Int, 52*(5), 1180-1195.

Quilty, J. A., Li, J., & Reithmeier, R. A. (2002). Impaired trafficking of distal renal tubular acidosis mutants of the human kidney anion exchanger kAE1. *Am J Physiol Renal Physiol, 282*(5), F810-820. doi:10.1152/ajprenal.00216.2001

Regula, C. S., Pfeiffer, J. R., & Berlin, R. D. (1981). Microtubule assembly and disassembly at alkaline pH. *J Cell Biol, 89*(1), 45-53.

Riazuddin, S., Anwar, S., Fischer, M., Ahmed, Z. M., Khan, S. Y., Janssen, A. G., . . . Fahlke, C. (2009). Molecular basis of DFNB73: mutations of BSND can cause nonsyndromic deafness or Bartter syndrome. *Am J Hum Genet, 85*(2), 273-280. doi:10.1016/j.ajhg.2009.07.003

Rickheit, G., Maier, H., Strenzke, N., Andreescu, C. E., De Zeeuw, C. I., Muenscher, A., . . . Jentsch, T. J. (2008). Endocochlear potential depends on Cl- channels: mechanism underlying deafness in Bartter syndrome IV. *Embo j, 27*(21), 2907-2917. doi:10.1038/emboj.2008.203

Rickheit, G., Wartosch, L., Schaffer, S., Stobrawa, S. M., Novarino, G., Weinert, S., & Jentsch, T. J. (2010). Role of ClC-5 in renal endocytosis is unique among ClC exchangers and does not require PY-motif-dependent ubiquitylation. *J Biol Chem, 285*(23), 17595-17603. doi:10.1074/jbc.M110.115600

Rodriguez Soriano, J. (2002). Renal tubular acidosis: the clinical entity. *J Am Soc Nephrol, 13*(8), 2160-2170.

Romero, M. F., Fong, P., Berger, U. V., Hediger, M. A., & Boron, W. F. (1998). Cloning and functional expression of rNBC, an electrogenic Na(+)-HCO3- cotransporter from rat kidney. *Am J Physiol, 274*(2 Pt 2), F425-432.

Rossier, B. C., & Schild, L. (2008). Epithelial sodium channel: mendelian versus essential hypertension. *Hypertension, 52*(4), 595-600. doi:10.1161/hypertensionaha.107.097147

Royaux, I. E., Wall, S. M., Karniski, L. P., Everett, L. A., Suzuki, K., Knepper, M. A., & Green, E. D. (2001). Pendrin, encoded by the Pendred syndrome gene, resides in the apical region of renal intercalated cells and mediates bicarbonate secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A, 98*(7), 4221-4226. doi:10.1073/pnas.071516798

Rugarli, E. I., Adler, D. A., Borsani, G., Tsuchiya, K., Franco, B., Hauge, X., . . . Ballabio, A. (1995). Different chromosomal localization of the Clcn4 gene in Mus spretus and C57BL/6J mice. *Nat Genet, 10*(4), 466-471. doi:10.1038/ng0895-466

Rust, M. B., Faulhaber, J., Budack, M. K., Pfeffer, C., Maritzen, T., Didie, M., . . . Hubner, C. A. (2006). Neurogenic mechanisms contribute to hypertension in mice with disruption of the K-Cl cotransporter KCC3. *Circ Res, 98*(4), 549-556. doi:10.1161/01.RES.0000204449.83861.22

Rychkov, G. Y., Pusch, M., Astill, D. S., Roberts, M. L., Jentsch, T. J., & Bretag, A. H. (1996). Concentration and pH dependence of skeletal muscle chloride channel ClC-1. *J Physiol, 497 (Pt 2)*, 423-435.

Sakamoto, H., Sado, Y., Naito, I., Kwon, T. H., Inoue, S., Endo, K., . . . Marumo, F. (1999). Cellular and subcellular immunolocalization of ClC-5 channel in mouse kidney: colocalization with H+-ATPase. *Am J Physiol, 277*(6 Pt 2), F957-965.

Scheel, O., Zdebik, A. A., Lourdel, S., & Jentsch, T. J. (2005). Voltage-dependent electrogenic chloride/proton exchange by endosomal CLC proteins. *Nature, 436*(7049), 424-427. doi:10.1038/nature03860

Scheinman, S. J. (1998). X-linked hypercalciuric nephrolithiasis: clinical syndromes and chloride channel mutations. *Kidney Int, 53*(1), 3-17. doi:10.1046/j.1523-1755.1998.00718.x

Schlingmann, K. P., Konrad, M., Jeck, N., Waldegger, P., Reinalter, S. C., Holder, M., . . . Waldegger, S. (2004). Salt wasting and deafness resulting from mutations in two chloride channels. *N Engl J Med, 350*(13), 1314-1319. doi:10.1056/NEJMoa032843

Schmitt, B. M., Biemesderfer, D., Romero, M. F., Boulpaep, E. L., & Boron, W. F. (1999). Immunolocalization of the electrogenic Na+-HCO-3 cotransporter in mammalian and amphibian kidney. *Am J Physiol, 276*(1 Pt 2), F27-38.

Scholl, U., Hebeisen, S., Janssen, A. G., Muller-Newen, G., Alekov, A., & Fahlke, C. (2006). Barttin modulates trafficking and function of ClC-K channels. *Proc Natl Acad Sci U S A, 103*(30), 11411-11416. doi:10.1073/pnas.0601631103

Schultheis, P. J., Clarke, L. L., Meneton, P., Miller, M. L., Soleimani, M., Gawenis, L. R., . . . Shull, G. E. (1998). Renal and intestinal absorptive defects in mice lacking the NHE3 Na+/H+ exchanger. *Nat Genet, 19*(3), 282-285. doi:10.1038/969

Schwenk, F., Baron, U., & Rajewsky, K. (1995). A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells. *Nucleic Acids Res, 23*(24), 5080-5081.

Seki, G., Coppola, S., Yoshitomi, K., Burckhardt, B. C., Samarzija, I., Muller-Berger, S., & Fromter, E. (1996). On the mechanism of bicarbonate exit from renal proximal tubular cells. *Kidney Int, 49*(6), 1671-1677.

Shalev, H., Ohali, M., Kachko, L., & Landau, D. (2003). The neonatal variant of Bartter syndrome and deafness: preservation of renal function. *Pediatrics, 112*(3 Pt 1), 628-633.

Shayakul, C., Breton, S., Brown, D., & Alper, S. L. (1999). Gene therapy of inherited renal tubular disease. *Am J Kidney Dis, 34*(2), 374-379. doi:10.1053/ajkd03400374

Shayakul, C., Jarolim, P., Zachlederova, M., Prabakaran, D., Cortez-Campeao, D., Kalabova, D., . . . Alper, S. L. (2004). Characterization of a highly polymorphic marker adjacent to the SLC4A1 gene and of kidney immunostaining in a family with distal renal tubular acidosis. *Nephrol Dial Transplant, 19*(2), 371-379.

Sile, S., Velez, D. R., Gillani, N. B., Narsia, T., Moore, J. H., George, A. L., Jr., . . . Williams, S. M. (2009). CLCNKB-T481S and essential hypertension in a Ghanaian population. *J Hypertens, 27*(2), 298-304.

Simon, D. B., Bindra, R. S., Mansfield, T. A., Nelson-Williams, C., Mendonca, E., Stone, R., . . . Lifton, R. P. (1997). Mutations in the chloride channel gene, CLCNKB, cause Bartter's syndrome type III. *Nat Genet, 17*(2), 171-178. doi:10.1038/ng1097-171

Simon, D. B., Karet, F. E., Hamdan, J. M., DiPietro, A., Sanjad, S. A., & Lifton, R. P. (1996). Bartter's syndrome, hypokalaemic alkalosis with hypercalciuria, is caused by mutations in the Na-K-2Cl cotransporter NKCC2. *Nat Genet, 13*(2), 183-188. doi:10.1038/ng0696-183

Sinning, A., Liebmann, L., Kougioumtzes, A., Westermann, M., Bruehl, C., & Hubner, C. A. (2011). Synaptic glutamate release is modulated by the Na+ -driven Cl-/HCO(3)(-) exchanger Slc4a8. *J Neurosci, 31*(20), 7300-7311. doi:10.1523/jneurosci.0269-11.2011

Sly, W. S., Hewett-Emmett, D., Whyte, M. P., Yu, Y. S., & Tashian, R. E. (1983). Carbonic anhydrase II deficiency identified as the primary defect in the autosomal recessive syndrome of osteopetrosis with renal tubular acidosis and cerebral calcification. *Proc Natl Acad Sci U S A, 80*(9), 2752-2756.

Southgate, C. D., Chishti, A. H., Mitchell, B., Yi, S. J., & Palek, J. (1996). Targeted disruption of the murine erythroid band 3 gene results in spherocytosis and severe haemolytic anaemia despite a normal membrane skeleton. *Nat Genet, 14*(2), 227-230. doi:10.1038/ng1096-227

Sowah, D., & Casey, J. R. (2011). An intramolecular transport metabolon: fusion of carbonic anhydrase II to the COOH terminus of the Cl(-)/HCO(3)(-)exchanger, AE1. *Am J Physiol Cell Physiol, 301*(2), C336-346. doi:10.1152/ajpcell.00005.2011

Spicer, S. S., Stoward, P. J., & Tashian, R. E. (1979). The immunohistolocalization of carbonic anhydrase in rodent tissues. *J Histochem Cytochem, 27*(4), 820-831.

Staub, O., Dho, S., Henry, P., Correa, J., Ishikawa, T., McGlade, J., & Rotin, D. (1996). WW domains of Nedd4 bind to the proline-rich PY motifs in the epithelial Na+ channel deleted in Liddle's syndrome. *Embo j, 15*(10), 2371-2380.

Stehberger, P. A., Shmukler, B. E., Stuart-Tilley, A. K., Peters, L. L., Alper, S. L., & Wagner, C. A. (2007). Distal renal tubular acidosis in mice lacking the AE1 (band3) Cl-/HCO3- exchanger (slc4a1). *J Am Soc Nephrol, 18*(5), 1408-1418. doi:10.1681/ASN.2006101072

Steinke, K. V., Gorinski, N., Wojciechowski, D., Todorov, V., Guseva, D., Ponimaskin, E., . . . Fischer, M. (2015). Human CLC-K Channels Require Palmitoylation of Their Accessory Subunit Barttin to Be Functional. *J Biol Chem, 290*(28), 17390-17400. doi:10.1074/jbc.M114.631705

Steinmeyer, K., Klocke, R., Ortland, C., Gronemeier, M., Jockusch, H., Grunder, S., & Jentsch, T. J. (1991). Inactivation of muscle chloride channel by transposon insertion in myotonic mice. *Nature, 354*(6351), 304-308. doi:10.1038/354304a0

Steinmeyer, K., Ortland, C., & Jentsch, T. J. (1991). Primary structure and functional expression of a developmentally regulated skeletal muscle chloride channel. *Nature, 354*(6351), 301-304. doi:10.1038/354301a0

Steinmeyer, K., Schwappach, B., Bens, M., Vandewalle, A., & Jentsch, T. J. (1995). Cloning and functional expression of rat CLC-5, a chloride channel related to kidney disease. *J Biol Chem, 270*(52), 31172-31177.

Sterling, D., & Casey, J. R. (1999). Transport activity of AE3 chloride/bicarbonate anion-exchange proteins and their regulation by intracellular pH. *Biochem J, 344 Pt 1*, 221-229.

Stobrawa, S. M., Breiderhoff, T., Takamori, S., Engel, D., Schweizer, M., Zdebik, A. A., . . . Jentsch, T. J. (2001). Disruption of ClC-3, a chloride channel expressed on synaptic vesicles, leads to a loss of the hippocampus. *Neuron, 29*(1), 185-196.

Su, Y., Al-Lamki, R. S., Blake-Palmer, K. G., Best, A., Golder, Z. J., Zhou, A., & Karet Frankl, F. E. (2015). Physical and functional links between anion exchanger-1 and sodium pump. *J Am Soc Nephrol, 26*(2), 400-409. doi:10.1681/asn.2013101063

Sun, A. M., Liu, Y., Dworkin, L. D., Tse, C. M., Donowitz, M., & Yip, K. P. (1997). Na+/H+ exchanger isoform 2 (NHE2) is expressed in the apical membrane of the medullary thick ascending limb. *J Membr Biol, 160*(1), 85-90.

Sun, X., & Petrovic, S. (2008). Increased acid load and deletion of AE1 increase Slc26a7 expression. *Nephron Physiol, 109*(3), p29-35. doi:10.1159/000145465

Suzuki, T., Rai, T., Hayama, A., Sohara, E., Suda, S., Itoh, T., . . . Uchida, S. (2006). Intracellular localization of ClC chloride channels and their ability to form hetero-oligomers. *J Cell Physiol, 206*(3), 792-798. doi:10.1002/jcp.20516

Tajima, M., Hayama, A., Rai, T., Sasaki, S., & Uchida, S. (2007). Barttin binds to the outer lateral surface of the ClC-K2 chloride channel. *Biochem Biophys Res Commun, 362*(4), 858-864. doi:10.1016/j.bbrc.2007.08.097

Terris, J., Ecelbarger, C. A., Marples, D., Knepper, M. A., & Nielsen, S. (1995). Distribution of aquaporin-4 water channel expression within rat kidney. *Am J Physiol, 269*(6 Pt 2), F775-785.

Teulon, J., Lourdel, S., Nissant, A., Paulais, M., Guinamard, R., Marvao, P., & Imbert-Teboul, M. (2005). Exploration of the basolateral chloride channels in the renal tubule using. *Nephron Physiol, 99*(2), p64-68. doi:10.1159/000082972

Thiemann, A., Grunder, S., Pusch, M., & Jentsch, T. J. (1992). A chloride channel widely expressed in epithelial and non-epithelial cells. *Nature, 356*(6364), 57-60. doi:10.1038/356057a0

Toye, A. M., Banting, G., & Tanner, M. J. (2004). Regions of human kidney anion exchanger 1 (kAE1) required for basolateral targeting of kAE1 in polarised kidney cells: mis-targeting explains dominant renal tubular acidosis (dRTA). *J Cell Sci, 117*(Pt 8), 1399-1410. doi:10.1242/jcs.00974

Tsuruoka, S., Swenson, E. R., Petrovic, S., Fujimura, A., & Schwartz, G. J. (2001). Role of basolateral carbonic anhydrase in proximal tubular fluid and bicarbonate absorption. *Am J Physiol Renal Physiol, 280*(1), F146-154.

Uchida, S., Sasaki, S., Furukawa, T., Hiraoka, M., Imai, T., Hirata, Y., & Marumo, F. (1993). Molecular cloning of a chloride channel that is regulated by dehydration and expressed predominantly in kidney medulla. *J Biol Chem, 268*(6), 3821-3824.

Uchida, S., Sasaki, S., Nitta, K., Uchida, K., Horita, S., Nihei, H., & Marumo, F. (1995). Localization and functional characterization of rat kidney-specific chloride channel, ClC-K1. *J Clin Invest, 95*(1), 104-113. doi:10.1172/jci117626

Vallet, M., Picard, N., Loffing-Cueni, D., Fysekidis, M., Bloch-Faure, M., Deschenes, G., . . . Eladari, D. (2006). Pendrin regulation in mouse kidney primarily is chloride-dependent. *J Am Soc Nephrol, 17*(8), 2153-2163. doi:10.1681/ASN.2005101054

Vandewalle, A., Cluzeaud, F., Bens, M., Kieferle, S., Steinmeyer, K., & Jentsch, T. J. (1997). Localization and induction by dehydration of ClC-K chloride channels in the rat kidney. *Am J Physiol, 272*(5 Pt 2), F678-688.

Vandewalle, A., Cluzeaud, F., Peng, K. C., Bens, M., Luchow, A., Gunther, W., & Jentsch, T. J. (2001). Tissue distribution and subcellular localization of the ClC-5 chloride channel in rat intestinal cells. *Am J Physiol Cell Physiol, 280*(2), C373-381.

Veeramah, K. R., Johnstone, L., Karafet, T. M., Wolf, D., Sprissler, R., Salogiannis, J., . . . Hammer, M. F. (2013). Exome sequencing reveals new causal mutations in children with epileptic encephalopathies. *Epilepsia, 54*(7), 1270-1281. doi:10.1111/epi.12201

Verlander, J. W., Hassell, K. A., Royaux, I. E., Glapion, D. M., Wang, M. E., Everett, L. A., . . . Wall, S. M. (2003). Deoxycorticosterone upregulates PDS (Slc26a4) in mouse kidney: role of pendrin in mineralocorticoid-induced hypertension. *Hypertension, 42*(3), 356-362. doi:10.1161/01.hyp.0000088321.67254.b7

Vince, J. W., Carlsson, U., & Reithmeier, R. A. (2000). Localization of the Cl-/HCO3- anion exchanger binding site to the amino-terminal region of carbonic anhydrase II. *Biochemistry, 39*(44), 13344-13349.

Vince, J. W., & Reithmeier, R. A. (2000). Identification of the carbonic anhydrase II binding site in the Cl(-)/HCO(3)(-) anion exchanger AE1. *Biochemistry, 39*(18), 5527-5533.

Wagner, C. A., Finberg, K. E., Breton, S., Marshansky, V., Brown, D., & Geibel, J. P. (2004). Renal vacuolar H+-ATPase. *Physiol Rev, 84*(4), 1263-1314. doi:10.1152/physrev.00045.2003

Waldegger, S., Jeck, N., Barth, P., Peters, M., Vitzthum, H., Wolf, K., . . . Seyberth, H. W. (2002). Barttin increases surface expression and changes current properties of ClC-K channels. *Pflugers Arch, 444*(3), 411-418. doi:10.1007/s00424-002-0819-8

Waldegger, S., & Jentsch, T. J. (2000). Functional and structural analysis of ClC-K chloride channels involved in renal disease. *J Biol Chem, 275*(32), 24527-24533. doi:10.1074/jbc.M001987200

Wang, F., Sampogna, R. V., & Ware, B. R. (1989). pH dependence of actin self-assembly. *Biophys J, 55*(2), 293-298. doi:10.1016/S0006-3495(89)82804-8

Wang, S. S., Devuyst, O., Courtoy, P. J., Wang, X. T., Wang, H., Wang, Y., . . . Guggino, W. B. (2000). Mice lacking renal chloride channel, CLC-5, are a model for Dent's disease, a nephrolithiasis disorder associated with defective receptor-mediated endocytosis. *Hum Mol Genet, 9*(20), 2937-2945.

Wang, W. H., White, S., Geibel, J., & Giebisch, G. (1990). A potassium channel in the apical membrane of rabbit thick ascending limb of Henle's loop. *Am J Physiol, 258*(2 Pt 2), F244-253.

Wartosch, L., Fuhrmann, J. C., Schweizer, M., Stauber, T., & Jentsch, T. J. (2009). Lysosomal degradation of endocytosed proteins depends on the chloride transport protein ClC-7. *Faseb j, 23*(12), 4056-4068. doi:10.1096/fj.09-130880

Weinreich, F., & Jentsch, T. J. (2001). Pores formed by single subunits in mixed dimers of different CLC chloride channels. *J Biol Chem, 276*(4), 2347-2353. doi:10.1074/jbc.M005733200

Welling, P. A., Caplan, M., Sutters, M., & Giebisch, G. (1993). Aldosterone-mediated Na/K-ATPase expression is alpha 1 isoform specific in the renal cortical collecting duct. *J Biol Chem, 268*(31), 23469-23476.

Whitescarver, S. A., Ott, C. E., Jackson, B. A., Guthrie, G. P., Jr., & Kotchen, T. A. (1984). Salt-sensitive hypertension: contribution of chloride. *Science, 223*(4643), 1430-1432.

Wrong, O. M., Norden, A. G., & 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. *Qjm, 87*(8), 473-493.

Yonezawa, N., Nishida, E., & Sakai, H. (1985). pH control of actin polymerization by cofilin. *J Biol Chem, 260*(27), 14410-14412.

Yoshikawa, M., Uchida, S., Ezaki, J., Rai, T., Hayama, A., Kobayashi, K., . . . Sasaki, S. (2002). CLC-3 deficiency leads to phenotypes similar to human neuronal ceroid lipofuscinosis. *Genes Cells, 7*(6), 597-605.

Zifarelli, G., & Pusch, M. (2009). Intracellular regulation of human ClC-5 by adenine nucleotides. *EMBO Rep, 10*(10), 1111-1116. doi:10.1038/embor.2009.159

RÉSUMÉ

Le rein joue un rôle crucial dans de multiples processus biologiques, tels que le maintien de l'homéostasie acide-base et de la balance sodée. Le transport de chlore dans le néphron distal est un élément majeur de ces deux fonctions physiologiques. Au cours de ma thèse, j'ai travaillé sur deux projets relatifs à la physiologie et la physiopathologie du transport de chlore dans le néphron distal. Le premier travail concerne la caractérisation fonctionnelle et moléculaire d'un modèle murin dont le gène Slc4a1 codant pour l'échangeur d'anion de type 1 (AE1) a été modifié, pour introduire une mutation ponctuelle (R589H) dans la séquence protéique. Cette mutation est la plus fréquente des mutations de cette protéine responsable d'acidose tubulaire rénale distale chez l'Homme. Comme les patients, ces souris présentent une acidose tubulaire distale. Nos résultats ont montré que la diminution de l'activité d'échange Cl^-/HCO_3^-, due à la baisse drastique de l'expression d'AE1 dans les cellules α-intercalaires du canal collecteur, affecte l'expression et la distribution apicale de la pompe à protons, ce qui altère de ce fait la fonction d'acidification de l'urine. Le second travail porte sur l'étude de la régulation du transport de chlore par le complexe protéique ClC-Kb/Barttin, par phosphorylation de la Barttin. Ce travail démontre que la phosphorylation de la Barttin stimule le transport de chlore du canal ClC-Kb, en augmentant la distribution et la stabilité du complexe ClC-Kb/Barttin à la membrane. Ainsi, la phosphorylation de la Barttin pourrait représenter un mécanisme d'adaptation du transport de chlore en réponse à des variations des apports alimentaires en NaCl.

Mots clés : Transport de chlore ; Acide-base, AE1, ClC-Kb/Barttin, Phosphorylation, Régulation.

Kidney plays a major role in several biological fonctions as sodium balance or acid-base homeostasis. Chloride transport in the distal nephron is a key element of these two processes. During my thesis, i have worked on two projects related to physiology and pathophysiology of chloride transport in distal nephron. The first study is the functionnal and molecular characterization of a mouse model bearing the most common dominant dRTA mutation in human AE1, R589H, which corresponds to R607H in the mouse. R607H knock-in mice display incomplete dRTA. Our results showed that reduced basolateral anion exchange activity in type A intercalated cells inhibits trafficking and regulation of V-type ATPase, compromising luminal H+ secretion. In the second study, we investigated the role of a phosphorylation site in the regulation of chloride transport by the ClC-Kb/Barttin channels complex. Our results indicates that Barttin phosphorylation stimulates chloride transport by ClC-Kb channels by increasing the number of active channels in the membrane and hence are involved in the mechanisms of adaptation of renal chloride absorption in response to changes in dietary NaCl intake.