



Physiologie et physiopathologie des transports transépithéliaux du tubule proximal : mise en évidence du rôle de la sous-unité Kir4.2 et analyse d'un mutant de ClC-5 impliqué dans la maladie de Dent

Yohan Bignon

► To cite this version:

Yohan Bignon. Physiologie et physiopathologie des transports transépithéliaux du tubule proximal : mise en évidence du rôle de la sous-unité Kir4.2 et analyse d'un mutant de ClC-5 impliqué dans la maladie de Dent. Physiologie [q-bio.TO]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2017. Français. NNT : 2017PA066244 . tel-01689812

HAL Id: tel-01689812

<https://theses.hal.science/tel-01689812>

Submitted on 22 Jan 2018

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 DE L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

École Doctorale "*Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique*" (ED394)

Réalisée au Centre de Recherche des Cordeliers (INSERM UMRS_1138)

dans l'équipe "*Métabolisme et Physiologie Rénale*" (CNRS ERL_8228)

**Physiologie et Physiopathologie des transports
transépithéliaux du tubule proximal :**

*Mise en évidence du rôle de la sous-unité Kir4.2 et
analyse d'un mutant de ClC-5 impliqué dans la Maladie de Dent*

Présentée par

M. Yohan Bignon

Dirigée par

Dr Stéphane Lourdel

Soutenue publiquement le 28.09.2017 devant un jury composé de :

Pr Jean-Claude DUSSAULE

Pr Dominique PRIÉ

Dr Nicolas PALLET

Dr Rosa VARGAS-POUSSOU

Dr Christos CHADJICHRISTOS

Dr Stéphane LOURDEL

Dr Marc PAULAIS

Président du Jury

Rapporteur

Rapporteur

Examinatrice

Examineur

Directeur de Thèse

Membre Invité

REMERCIEMENTS

Je remercie les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ces 3 années de travail passionné.

Je tiens également à remercier mon directeur de thèse, Stéphane Lourdel, pour sa délicatesse, sa patience, sa disponibilité et son sens de l'écoute.

Je souhaite remercier spécialement Marc Paulais, avec qui j'ai eu le plaisir de travailler et de rire. Je remercie aussi Jacques Teulon, pour son accueil chaleureux et ses conseils avisés.

Bien évidemment, je remercie particulièrement Nadia Frachon, pour son travail salubre et de qualité, sa confiance, sa patience, les qualités qu'elle ignore avoir, ainsi que nos échanges.

Je remercie sincèrement et sans exception les membres du laboratoire de Métabolisme et Physiologie Rénale du Centre de Recherche des Cordeliers: j'ai beaucoup appris de chacun de vous, qui m'avez accueilli chaleureusement. Je souhaite avoir encore l'occasion de courir dans les mêmes couloirs et les mêmes escaliers que vous, à l'avenir.

Je tiens à remercier spécialement Kamel Laghmani, Nicolas Picard, mais aussi Pascal Houillier, Alain Doucet et Gilles Crambert pour leurs nombreux et précieux conseils.

Je remercie également Mathilde Keck et Teddy Grand, souvent pris en modèle, dont l'expérience et la disponibilité m'ont aidé bien des fois.

Immanquablement, je remercie mes compagnons de fortune ou d'infortune, sans distinction : Adeline Beuriot, A'dem Bokhari, Clément Braesch, David Granjon, Elie Seeayfan, Guilhem Lignon, Imène Sakhi, Lucile Figueres, Malorie Greene, Natsuko Tokonami et Sami Ayari. Je vous souhaite à tous un épanouissement personnel et professionnel, où qu'il soit.

Plus personnellement, je souhaite remercier mes parents, mon frère, ma sœur, tous les membres de ma famille et mes amis pour leur soutien inconditionnel.

Enfin, je remercie ma compagne Noémie, à mes côtés pour partager les bons et les mauvais moments de la vie.

TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS	1
A. INTRODUCTION GÉNÉRALE	2
I. Généralités de physiologie rénale	3
1. Anatomie rénale	3
a. Organisation du parenchyme rénal	3
b. Le néphron et l'interstitium	3
2. Fonction rénale	5
II. Le tubule proximal	6
1. Ultrastructure du tubule proximal et de ses cellules épithéliales	6
2. Les transports transépithéliaux du tubule proximal	7
a. Revue des principaux transports impliqués dans la réabsorption proximale	7
b. Régulation des activités de réabsorption du tubule proximal	9
3. L'endocytose des protéines filtrées par le tubule proximal	10
4. Rôles du tubule proximal dans le maintien de l'équilibre acido-basique	13
a. Rôles du tubule proximal dans la réabsorption des tampons plasmatiques	14
b. Rôle de l'ammoniogénèse proximale dans l'excrétion urinaire nette d'acide	16
c. Régulation des transports proximaux et de l'ammoniogénèse par l'acidose	18
5. Aperçu de physiopathologie et de pharmacologie du tubule proximal	20
a. Les différentes formes d'atteinte des fonctions du tubule proximal	20
b. L'acidose tubulaire rénale proximale au sein des acidoses métaboliques	21
c. Le tubule proximal est une cible et un effecteur pharmacologique	22
III. Les segments distaux du néphron	23
1. Aperçu des principaux transports transépithéliaux du néphron distal	23
2. Régulations physiologiques des activités de transport du néphron distal	25
B. PREMIÈRE ÉTUDE: IMPLICATION DE LA PROTÉINE	
Kir4.2 DANS LA PHYSIOLOGIE RÉNALE	27
INTRODUCTION DE LA 1^{ÈRE} ÉTUDE	28
I. Les canaux potassiques Kir	28
1. Structure et phylogénie des canaux Kir	28
2. Propriétés électrophysiologiques et régulations des canaux Kir	30
a. Propriétés et régulations générales des canaux Kir	30
b. Règles particulières d'assemblage en tétramère des sous-unités Kir	32
c. Régulation de l'expression membranaire des canaux Kir	33
d. Régulations des propriétés électrophysiologiques des canaux Kir	35
II. Rôles physiologiques et physiopathologiques des canaux Kir	36
1. Principales fonctions extra-rénales des canaux Kir	36

a. Rôles des canaux Kir dans la modulation du potentiel de repos	36
b. Rôles des canaux Kir dans le maintien de l'excitabilité cellulaire	37
c. Rôles des canaux Kir dans les cellules sensibles au pH	38
d. Expression et fonctions hypothétiques de Kir4.2 et Kir5.1	39
2. Rôles des canaux Kir dans la physiologie rénale	41
a. Revue des sous-unités Kir exprimées dans le tissu rénal	41
b. Rôle de Kir1.1 dans la physiologie et la physiopathologie rénale	42
c. Rôle de Kir4.1/Kir5.1 dans la physiologie et la physiopathologie rénale	44
3. Revue des pathologies monogéniques associées aux canaux Kir	47
III. Rôles et revue des canaux potassiques du tubule proximal	48
1. Rôles des canaux potassiques du tubule proximal	48
2. Revue des canaux potassiques du tubule proximal	49
a. Identité des canaux potassiques apicaux du tubule proximal	49
b. Identité des canaux potassiques basolatéraux du tubule proximal	49
MATÉRIEL ET MÉTHODES N°1	52
I. Modèles d'étude	52
1. Modèle murin génétiquement invalidé pour Kcnj15	52
2. Modèles cellulaires d'expression transitoire de Kir4.2 et Kir5.1	53
II. Analyses métaboliques	54
1. Phénotypage et analyse de la fonction rénale en cage à métabolisme	54
2. Analyses des recueils urinaires et des prélèvements sanguins	55
III. Analyses biochimiques et moléculaires	56
1. Extractions d'ARNm et RT-qPCR	56
2. Extraction et déglycosylation des protéines	57
3. Immunomarquage des protéines par Western blot	58
4. Co-immunoprécipitation des sous-unités Kir depuis le tissu rénal	58
5. Marquages fluorescents et histochimiques de coupes de rein	59
IV. Présentation et analyse statistique des résultats	59
RÉSULTATS DE LA 1^{ÈRE} ÉTUDE	60
I. Article n°1	60
II. Résumé de l'article n°1	101
1. Kir4.2 et Kir5.1 s'associent du coté basolatéral du tubule proximal	101
2. Kir5.1 permet la maturation N-glycosidique de Kir4.2	102
3. L'absence de Kir4.2 provoque une acidose tubulaire proximale isolée	102
4. L'absence de Kir4.2 réduit l'ammoniogénèse proximale	104
DISCUSSION DE LA 1^{ÈRE} ÉTUDE	105
I. Invalider Kir4.2 ou Kir5.1 affecte l'ammoniurie et la calciurie	105
II. KCNJ15 est un gène candidat pour l'acidose proximale isolée	106
III. Mécanisme physiopathologique et rôle hypothétique de Kir4.2	106

C. SECONDE ÉTUDE: ANALYSE D'UN MUTANT DE ClC-5 IMPLIQUÉ DANS LA MALADIE DE DENT..... 110

INTRODUCTION DE LA 2^{NDE} ÉTUDE 111

I. La Maladie de Dent..... 111

1. Aspects cliniques de la Maladie de Dent 111
2. Déterminants génétiques de la Maladie de Dent 112

II. L'échangeur ClC-5 et la famille des ClC 113

1. Découverte et phylogénie des transporteurs de la famille ClC 113
2. Structure des transporteurs de la famille ClC..... 114
3. Propriétés électrophysiologiques et régulations des ClC 115
 - a. Le slow gating et le fast gating de ClC 115
 - b. Le couplage du transport des ions Cl^- et H^+ chez les échangeurs ClC 116
 - c. Principales régulations électrophysiologiques des transporteurs ClC 119
 - d. La régulation des ClC par des sous-unités β et les domaines CBS 121
4. Revue des rôles physiologiques et physiopathologiques des ClC..... 122
 - a. Profil d'expression et rôles connus des transporteurs ClC..... 122
 - b. Récapitulatif des rôle physiologiques et physiopathologiques des ClC 128

III. Physiopathologie de la Maladie de Dent de type I 129

1. Profil d'expression physiologique et pathologique de ClC-5..... 129
 - a. Profil d'expression tissulaire de l'échangeur ClC-5..... 129
 - b. Classification des mutants de ClC-5 par leur adressage et leur activité in vitro 130
2. Physiopathologie de la Maladie de Dent de Type I 132
 - a. Phénotype des modèles murins invalidés pour *Clcn5* 132
 - b. Modifications structurales et moléculaires en l'absence de ClC-5 134
 - c. Mécanismes physiopathologiques impliqués dans la Maladie de Dent 135
3. Fonctions intracellulaires attribuées à ClC-5 dans le tubule proximal..... 140
 - a. Rôles des transports de ClC-5 dans l'acidification des endosomes précoces..... 140
 - b. Rôles des interactions protéine-protéine de ClC-5 dans le tubule proximal..... 143

MATÉRIEL ET MÉTHODES N°2 145

I. Biologie moléculaire..... 145

1. Plasmides..... 145
2. Mutagénèse dirigée et amplification bactérienne des plasmides 146
3. Transcription in vitro du plasmide pTLN 146

II. Modèles et méthodes d'expression hétérologue 147

1. Expression hétérologue par injection d'ARNm dans l'ovocyte de Xénope 147
2. Culture et transfection transitoire des cellules HEK293T 147

III. Analyses biochimiques de l'expression de ClC-5 148

1. Mesures de luminescence de surface dans l'ovocyte de Xénope..... 148
2. Biotinylation de surface des cellules HEK293T 149
3. Extraction et dosage des protéines totales et biotinylées 150

4. Analyse des échantillons protéiques par Western blot	151
5. Immunofluorescence indirecte sur les cellules HEK293T	151
IV. Analyses des propriétés de transport de ClC-5	152
1. Voltage-clamp en double microélectrodes dans l'ovocyte de Xénope	152
2. Mesures du transport de H ⁺ de ClC-5 dans les cellules HEK293T	153
3. Détermination du pH endosomal dans les cellules HEK293T	154
V. Présentation et analyse statistique des données	154
RÉSULTATS DE LA 2^{NDE} ÉTUDE.....	155
I. Article n°2	155
II. Résumé de l'article n°2	190
1. Description d'un patient Dent porteur d'une mutation E211G de ClC-5.....	190
2. La mutation E211G n'altère ni l'expression ni l'adressage de ClC-5	191
3. La mutation E211G convertit l'échangeur ClC-5 en canal chlorure	192
4. Le mutant E211G de ClC-5 permet l'acidification endosomale.....	193
DISCUSSION DE LA 2^{NDE} ÉTUDE	194
I. Conséquences de la substitution du gating glutamate de ClC-5.....	194
II. Importance du chlorure dans la fonction endosomale.....	195
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	197
ANNEXES.....	223
I. Nouveaux aspects physiopathologiques de la Maladie de Dent.....	223
1. La Maladie de Dent et la dédifférenciation des cellules proximales.....	223
2. Existence et origine d'un stress oxydatif dans la Maladie de Dent	224
3. Rôle d'un stress du réticulum endoplasmique dans la Maladie de Dent ?	225
II. Projet scientifique de la Fondation du Rein	226
III. Physiopathologie du Syndrome de Bartter de type III.....	234
IV. Curriculum vitae	235

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Schéma d'une coupe longitudinale de rein (modifié depuis M. Keck, 2012).....	3
Figure 2: Schéma d'un néphron dans les zones du parenchyme rénal (à gauche) et schéma d'une coupe de corpuscule rénal (à droite, modifié depuis l'illustration d'Holly Fischer).....	4
Figure 3: Cellule du tubule proximal (S1) observée en microscopie électronique (gauche) et représentée schématiquement (droite) (modifié depuis Kriz & Kaissling, 2008).....	6
Figure 4: Schéma des principales voies de réabsorption du tubule proximal et des principaux transporteurs impliqués (d'après Zhuo & Li, 2013; Blaine et al., 2015).....	7
Figure 5: Schéma des voies d'endocytose des protéines de bas poids moléculaire par le tubule proximal (d'après Nielsen et al., 2016; Dickson et al., 2014; Eshbach & Weisz, 2017).....	12
Figure 6: Schéma des voies de sécrétion des protons et de réabsorption du bicarbonate par le tubule proximal (d'après Guo et al., 2017; Curthoys & Moe, 2014 ; Hamm et al., 2015).....	15
Figure 7: Schéma de l'ammoniogenèse et de la sécrétion d'ammonium par le tubule proximal (d'après Hamm et al., 2015; Moret et al., 2007; Curthoys & Moe, 2014).....	17
Figure 8: Principaux mécanismes de réabsorption de la branche ascendante large de l'anse de Henle et le tubule contourné distal (d'après Mount, 2014; Subramanya & Ellison, 2014).....	24
Figure 9: Principaux mécanismes de réabsorption des différents types cellulaires du tubule connecteur et du canal collecteur (d'après Roy et al., 2015; Pearce et al., 2015).....	25
Figure 10: Schéma de la structure secondaire type (à gauche, d'après Hibino et al., 2010) et arbre phylogénétique (à droite, modifié depuis Hibino et al., 2010) des sous-unités Kir.....	28
Figure 11: Schéma d'un hétérotétramère Kir vu de l'extérieur (à gauche, d'après Nishida et al., 2007) et structure des sous-unités Kir (à droite, modifié d'après Hibino et al., 2010).....	30
Figure 12: Schéma de l'allure des courants rectifiants entrants des canaux Kir en fonction du potentiel membranaire et leurs régulateurs principaux (d'après Hibino et al., 2010).....	32
Figure 13: Courbes d'inhibition par le pH _i (gauche, depuis Pessia et al., 2001) et propriétés des canaux Kir4.x et Kir4.x/Kir5.1 (droite, d'après Pessia et al., 2001; Paulais et al., 2011).....	35
Figure 14: Schéma du profil d'expression des isoformes de Kir1.1 dans le néphron distal et du couplage des transports de la branche ascendante large (d'après Hibino et al., 2010).....	42
Figure 15: Schéma de l'altération des transports du tubule contourné distal dans le syndrome SeSAME (d'après Scholl et al., 2009; Welling et al., 2016; Su & Wang, 2016).....	46

Figure 16: Schéma des canaux potassiques exprimés dans les membranes apicales et basolatérales du tubule proximal (d'après Hebert et al., 2005; Hamilton & Devor, 2012).....	50
Figure 17: Cartes simplifiées des plasmides d'expression pCDNA3-mKir4.2 (à gauche) et pCDNA3-rKir5.1 (à droite) contenant les séquences codantes de Kir4.2 ou Kir5.1.....	53
Figure 18: Photographie légendée d'une cage à métabolisme utilisée afin d'évaluer la fonction rénale des souris Kcnj15 ^{-/-} par des recueils urinaires fréquents en régime contrôlé.....	54
Figure 19: Sites de clivage des endoglycosidases EndoH et PNGaseF sur les formes de N-glycosylation des protéines spécifiques de leur degré de maturation (d'après Nettleship, 2012).....	57
Figure 20: Mécanisme physiologique impliquant un canal Kir4.2/Kir5.1 basolatéral dans l'ammoniogénèse proximale (à gauche) et mécanisme physiopathologique hypothétique expliquant la pRTA des souris Kcnj15 ^{-/-} par une inactivité de NBCe-1A (à droite).....	107
Figure 21: Arbre phylogénétique des transporteurs ClC (d'après Jentsch et al., 2015).....	113
Figure 22: Structure secondaire (à gauche, d'après Wang et al., 2003) et structure tridimensionnelle d'un ClC (à droite, d'après le cristal de cmClC par Feng et al., 2010).....	114
Figure 23: Courants illustrant le Slow et le Fast gating des ClC (à gauche, d'après Miller & White, 1984) et localisation des pores d'un échangeur ClC (à droite, d'après Feng et al., 2010).....	115
Figure 24: Modèle explicatif du couplage des transports d'ions Cl ⁻ et H ⁺ dans le pore de ClC-5 et effet des mutations de ses G _{Glu} et P _{Glu} (modifié depuis Basilio et al., 2010).....	117
Figure 25: Schéma de la dépendance au voltage des courants de l'échangeur 2Cl ⁻ /H ⁺ ClC-5 sauvage et du canal chlorure ClC-5 dont le G _{Glu} est muté (d'après Scheel et al., 2005).....	120
Figure 26: Schéma des mécanismes moléculaires impliqués dans la perte de fonctionnalité des classes de mutants pathogènes de ClC-5 (d'après Lourdel et al., 2012).....	130
Figure 27: Répartition sur la structure secondaire de ClC-5 et classification des mutations ponctuelles pathogènes de CLCN5 analysées in vitro (d'après Mansour-Hendili et al., 2015).....	131
Figure 28: Mécanisme physiopathologique expliquant l'hyperphosphaturie présent dans la Maladie de Dent par le défaut d'endocytose proximale de la PTH (d'après Plans et al., 2009).....	137
Figure 29: Mécanisme expliquant la concentration sérique en Vitamine D et l'hypercalciurie dans la Maladie de Dent par le défaut d'endocytose proximale (d'après Plans et al., 2009).....	139
Figure 30: Mécanismes hypothétiques des transports de protons de d'ions chlorure le long de la voie endo-lysosomale proximale (d'après Stauber & Weinert, 2012; Lippiat & Smith, 2012).....	142

Figure 31: Cartes des plasmides pTLN (à gauche) et pEGFP (à droite) contenant la séquence encodant le ClC-5 humain muni d'un tag HA extracellulaire.....145

Figure 32: Représentation schématique de la méthode de détection de ClC-5 à la surface des ovocytes de Xénope par immunomarquage luminescent de son tag HA extracellulaire.....148

Figure 33: Représentation schématique des méthodes de biotinylation irréversible (à gauche) et réversible (à droite) des protéines de surface à l'aide de la Sulfo-NHS-Biotine.....149

Figure 34: Représentation schématique du dispositif de voltage-clamp en double microélectrodes utilisé pour mesurer les courants dans l'ovocyte de Xénope.....152

Figure 35: Spectre d'excitation/émission idéalisé du BCECF (à gauche) et schéma du principe de la mesure du transport des protons par ClC-5 dans les cellules (à droite).....153

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Résumé des pathologies humaines et murines associées aux altérations génétiques des canaux Kir.....47

Tableau 2: Résumé des rôles physiologiques et physiopathologiques attribués aux ClC via l'étude de leurs profils d'expression, du phénotype de modèle animaux génétiquement invalidés et la découverte de pathologies humaines (voir Section Introduction C.II.4.a).....128

LISTE DES ABRÉVIATIONS

1,25-OH vitD : 1,25-dihydroxy-Vitamine D₃
1 α -25-OH vitD Hydroxylase : 25-hydroxy-Vitamine D₃ 1- α -hydroxylase
24-OH vitD Hydroxylase : 25-hydroxy-Vitamine D₃ 24-hydroxylase
25-OH vitD : 25-hydroxy-Vitamine D₃
AngII : angiotensine II
ARNm : acide ribonucléique messenger
AT : acidité titrable urinaire
BAL : branche ascendante large de l'anse de Henle
BCECF : 2',7'-Bis-(2-Carboxyethyl)-5-(and-6)-Carboxyfluorescein
BSA : Bovine Serum Albumin
CBS1/2 : Cystathionine- β -synthase 1/2
CC : canal collecteur
CI- α/β : Cellule Intercalaire alpha ou bêta
CI- α : Cellule Intercalaire α
CI- β : Cellule Intercalaire β
ClC : Protéine de la famille des *Chloride Channel*
CMV : cytomégalovirus
C_{Tyr} : Tyrosine Centrale du pore des ClC
DBP : *vitamin-D binding protein*
ddp : différence de potentielle
DFG : débit de filtration glomérulaire
dRTA : *distal renal tubular acidosis*
E_{ClC-5} : Potentiel d'inversion de l'échangeur ClC-5
E_K : potentiel d'inversion des courants de l'ion K⁺ à travers un canal
ENA : Excrétion nette d'acide urinaire
GDH : *glutamate déshydrogénase*
G_{Glu} : *gating glutamate*
H⁺-ATPase/ V-ATPase : pompe à protons vacuolaire
HA : étiquette hémagglutinine
HEK293T : *Human Embryonic Kidney 293T*
HRP : *Horseradish peroxidase*
Kcnj15^{-/-} : Souris génétiquement invalidées pour *Kcnj15*
Kir : K⁺ *Inwardly Rectifying*
MD : maladie de Dent

OK : *Opossum Kidney*
PCO₂ : pression partielle en CO₂ dans le sang
PO₂ : pression partielle en O₂ dans le sang
PBPM : protéine de bas poids moléculaire
PBS : *phosphate-buffered saline*
PCR : *polymerase chain reaction*
PDG : *phosphate-dependant glutaminase*
PEPCK : *phosphoenolpyruvate carboxykinase*
P_{Glu} : *proton glutamate*
pHi : pH intracellulaire
PiBPM : protéinurie de bas poids moléculaire
PIP₂ : phosphatidyl-inositol 4,5, bisphosphate
pRTA : *proximal renal tubular acidosis*
PTH : Parathormone
RAA : rénine-angiotensine-aldostérone
RBP : *Rétinol binding protein*
RE : réticulum endoplasmique
RT-qPCR : *reverse transcription quantitative polymerase chain reaction*
S1/S2/S3 : Parties 1, 2 ou 3 du tubule proximal
SB : syndrome de Bartter
SDS : sodium dodecyl sulfate
SMC : site de multi-clonage
Syndrome SeSAME : *seizures, sensorineural deafness, ataxia, mental retardation and electrolyte imbalance*
TBS : *Tris-buffered saline*
TCD1/2 : tubule contourné distal (partie initiale/terminale)
TCN : tubule connecteur
TCP : tubule contourné proximal
TM1/TM2 : domaine transmembranaire 1/2 des sous-unités Kir
TP : tubule proximal
TPD : tubule proximal droit
V_i : potentiel imposé
V_m : potentiel membranaire
 α -CG : α -cétoglutarate

AVANT-PROPOS

Le tubule proximal est un segment du néphron constituant la majorité du parenchyme rénal. Ses fonctions physiologiques très variées et indispensables au fonctionnement des reins sont discutées en Introduction Générale. Elles sont supportées par de nombreux transports transépithéliaux, impliqués dans le maintien de la balance hydro-sodée, de l'équilibre acido-basique ou encore dans le métabolisme phospho-calcique.

Au cours de ma thèse, j'ai eu l'occasion de m'intéresser aux fonctions physiologiques et physiopathologiques du tubule proximal à travers la conduite de deux études.

La première étude a eu pour objectif de déterminer l'implication d'une protéine appelée Kir4.2 dans la physiologie rénale, *via* l'analyse du phénotype d'une lignée de souris ne l'exprimant pas. Ce travail, mettant à jour le rôle de Kir4.2 associée à une partenaire appelée Kir5.1 dans le maintien de l'équilibre acido-basique, a permis l'écriture d'un article intitulé "*Kir4.2(Kcnj15) deletion in mice mimics autosomal dominant isolated proximal renal tubular acidosis.*" actuellement soumis à une évaluation par des pairs en vue d'une publication.

La seconde étude a eu pour objectif d'analyser les conséquences d'une nouvelle mutation pathogène (E211G) impliquée dans la Maladie de Dent, sur la fonctionnalité de l'échangeur $2\text{Cl}^-/\text{H}^+$ appelé ClC-5 qui la porte. Ce travail a été réalisé par collaboration avec le service de génétique humaine de l'Hôpital Européen Georges Pompidou, à Paris. La mutation analysée affecte un résidu crucial de ClC-5 lui permettant d'assurer l'échange Cl^-/H^+ . Les résultats obtenus ont abouti à l'écriture d'un article intitulé "*A novel ClC-5 mutation involved in Dent's disease leads to normal endosomal acidification despite abolished proton transport.*" actuellement soumis à une évaluation par des pairs en vue d'une publication.

A. INTRODUCTION GÉNÉRALE

I. Généralités de physiologie rénale

1. Anatomie rénale

a. Organisation du parenchyme rénal

Chacun des deux reins est relié à la circulation sanguine par une artère rénale et une veine rénale. Le parenchyme rénal, entouré d'une "*capsule*" fibreuse en périphérie du rein, est subdivisé en une zone extérieure dite "*corticale*" (ou "*Cortex*") et en une zone interne dite "*médullaire*" (ou "*Médulla*"). Chez l'Homme, ce parenchyme est organisé en lobes séparés par des veines et des artères interlobaires définissant des "*colonnes de Bertin*". Entre les zones corticales et médullaires, ces vaisseaux se subdivisent en artérioles et veines interlobulaires. La zone médullaire d'un lobe forme une "*pyramide de Malpighi*", se terminant par une "*papille*" qui aboute dans un "*calice*", point de départ des voies urinaires. Au centre du rein, les calices fusionnent en un "*bassinnet*" recueillant l'urine, lui-même relié à l'"*uretère*" [Voir Figure 1] (Nielsen *et al.*, 2012).

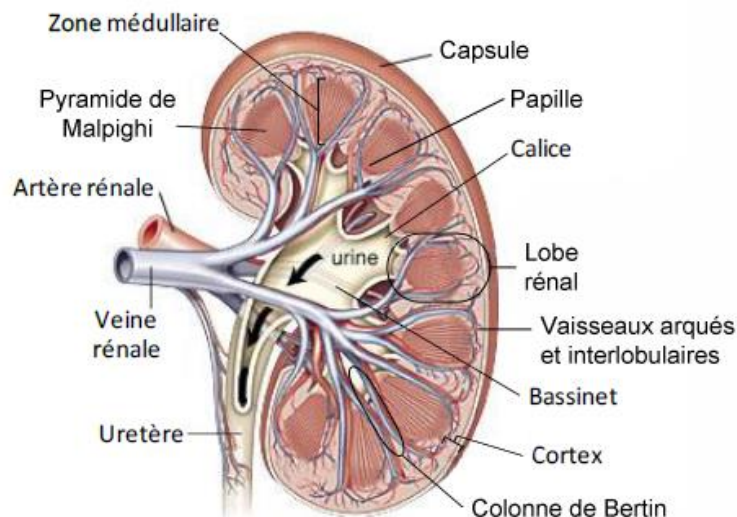


Figure 1: Schéma d'une coupe longitudinale de rein (modifié depuis M. Keck, 2012)

b. Le néphron et l'interstitium

Chez l'Homme, dans le parenchyme de chaque rein se trouve environ 1 million de "*néphrons*", les unités structurales et fonctionnelles du rein. Chaque néphron, long de 20 à 45 mm, est composé d'un corpuscule rénal suivi d'un épithélium tubulaire unistratifié, entouré d'une lame basale et composé de segments d'aspects hétérogènes qui vont et viennent du cortex à la médulla [Voir Figure 2] (Nielsen *et al.*, 2012).

Le corpuscule rénal est un corps globulaire cortical composé d'un capillaire appelé le "*glomérule*" et entouré d'une enveloppe épithéliale appelée la "*capsule de Bowman*". Cette dernière délimite un espace appelé la "*chambre urinaire*", dans lequel se trouvent, sur les capillaires glomérulaires, des cellules appelées des "*podocytes*" [voir Figure 2]. Le glomérule est situé à l'interface entre une "*artériole afférente*" (AA) et une "*artériole efférente*" (AE). À proximité de ces artérioles et des anses capillaires du glomérule se trouve un ensemble hétérogène de cellules (la "*Macula Densa*", les "*cellules mésangiales*" et les "*cellules à rénine*") formant l'"*appareil juxtaglomérulaire*" [Voir Figure 2] (voir Section Introduction A.III.2).

Dans la continuité du corpuscule rénal se trouve le 1^{er} segment du néphron: le *tubule proximal* (TP). Les suivants font partie du "*néphron distal*": se suivent l'"*anse de Henle*", (subdivisée en une "*branche descendante fine*", une "*branche ascendante fine*" et une "*branche ascendante large*" ou BAL), puis le "*tubule contourné distal*" (TCD), le "*tubule connecteur*" (TCN) et enfin le "*canal collecteur*" (CC) qui aboutit dans une papille rénale [Voir Figure 2].

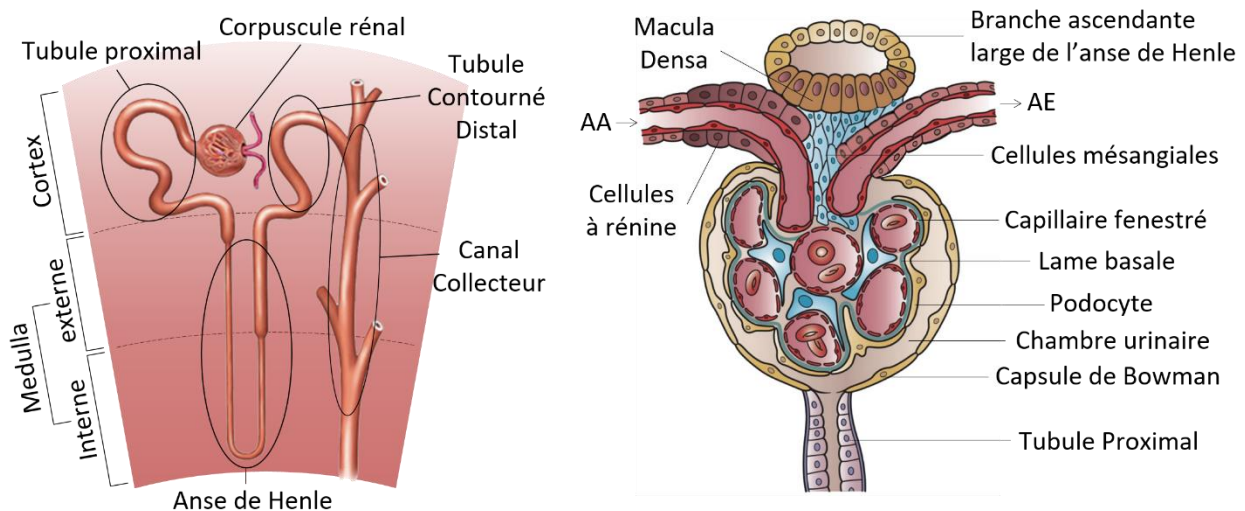


Figure 2: Schéma d'un néphron dans les zones du parenchyme rénal (à gauche) et schéma d'une coupe de corpuscule rénal (à droite, modifié depuis l'illustration d'Holly Fischer)

L'AA du glomérule est issue d'une branche d'artère interlobulaire, venue du cortex qui est très vascularisée, tandis qu'en aval de l'AE se constitue un réseau artério-veineux péritubulaires de densité décroissante dans l'axe cortico-médullaire. Les zones médullaires, peu vascularisées, sont hypoxiques et l'osmolalité du milieu interstitiel (ou "*interstitium*") croît de 300 mOsm/kg (dans le cortex) à 600 (médulla externe), jusqu'à 1200 mOsm/kg (médulla interne). Cette singularité définit le "*gradient cortico-papillaire*" (Nielsen et al., 2012).

2. Fonction rénale

Les reins sont impliqués dans l'homéostasie. En effet, directement ou indirectement, ils influent sur des paramètres physiologiques tels que le volume extracellulaire (et *a fortiori* la pression artérielle), l'osmolarité, la composition ionique (calcémie, natrémie, kaliémie, *etc.*) ou encore le pH sanguin. Ces paramètres sont affectés de façon physiologique ou pathologique par le métabolisme, l'alimentation, l'activité physique et le vieillissement. Afin de les maintenir à leurs valeurs initiales d'équilibre, nos reins produisent quotidiennement 1.5L d'urine, contenant de l'eau, des ions et des métabolites que l'organisme doit excréter (Taal *et al.*, 2012b).

La formation de l'urine, ou "*diurèse*", débute au sein du néphron par ultrafiltration glomérulaire du sang. Le sang arrive au glomérule par l'AA et ses composants doivent traverser 3 barrières afin d'être filtrés: la première est le capillaire glomérule fenestré, qui empêche le passage des éléments figurés du sang, la deuxième et la troisième sont respectivement la lame basale glomérulaire et le "*diaphragme de fente*", qui limitent le passage des macromolécules circulantes (protéines, lipides). Le diaphragme de fente est formé par les extensions cytoplasmiques ou "*pédicelles*" des podocytes [Voir Figure 2]. Cette étape passive de filtration est contrôlée par les cellules de l'appareil juxtaglomérulaire (voir Section Introduction A.III.2).

Le "*débit de filtration glomérulaire*" (DFG) étant de ~125 ml par minute chez l'Homme, nos reins produisent chaque jour ~180 litres d'ultrafiltrat. Ce filtrat, très volumineux, contient un certain nombre d'électrolytes, de métabolites et de solutés plasmatiques nécessaires à l'organisme. Afin d'éviter leur "*fuite*" dans l'urine, l'épithélium tubulaire réabsorbe vers l'interstitium différents constituants filtrés. Inversement, il sécrète des composés à excréter vers la lumière tubulaire. Ces phénomènes, régulés, sont passifs ou actifs et effectués par la voie paracellulaire ou transcellulaire. Grâce à l'existence du gradient cortico-papillaire, que les réabsorptions tubulaires contribuent à former, l'urine définitive possède généralement à la sortie du néphron une osmolarité supérieure à celle du plasma. Cette urine contient *in fine* moins de 1 % de l'eau et une fraction faible des ions filtrés au niveau du glomérule (Taal *et al.*, 2012b).

La baisse du DFG définit l'insuffisance rénale. Bien qu'initialement asymptomatique, sa forme terminale s'exprime par des œdèmes et une asthénie, accompagnés d'une anémie, une hypertension, une hyperkaliémie et une acidose métabolique. Elle augmente les risques cardiovasculaires et d'empoisonnement médicamenteux. L'hémodialyse ou la greffe rénale ne sont que des solutions de moyen-terme aux conséquences cliniques lourdes (Taal *et al.*, 2012a).

II. Le tubule proximal

1. Ultrastructure du tubule proximal et de ses cellules épithéliales

Le TP, qui débute dans la continuité de la capsule de Bowman, représente environ 40 % de la longueur totale du néphron et possède un diamètre d'environ 30 μm . Il est subdivisé en 3 parties appelées S1, S2 et S3. Structuellement très semblables, les deux premières parties S1 et S2 forment le tubule contourné proximal (TCP) ou "*pars convoluta*". Le TCP circule dans le cortex selon un cheminement tortueux d'où lui vient son nom. La partie S3 définit le tubule proximal droit (TPD) ou "*pars recta*" qui débute dans la continuité de S2 et traverse la zone externe de la médullaire externe (Nielsen *et al.*, 2012).

Les cellules épithéliales du TP sont polarisées: elles sont dotées à leur pôle apical de microvillosités d'environ 2.5 μm de haut qui forment dans la lumière du tubule une "*bordure en brosse*" et de jonctions serrées de densité faible. Sous leur membrane apicale se trouve un réseau dense de vésicules appelé "*l'appareil vacuolaire*". Leur pôle basolatéral est muni d'une membrane basale. Celle-ci repose sur une lame basale et forme des interdigitations profondes avec les membranes basales des cellules voisines. L'ensemble de ces invaginations modèle des membranes latérales, entre lesquelles se positionnent de nombreuses mitochondries allongées. Toutes ces caractéristiques sont plus marquées en S1 et s'amenuisent progressivement dans les parties S2 puis S3 du TP [voir Figure 3] (Kriz & Kaissling, 2008; Nielsen *et al.*, 2012).

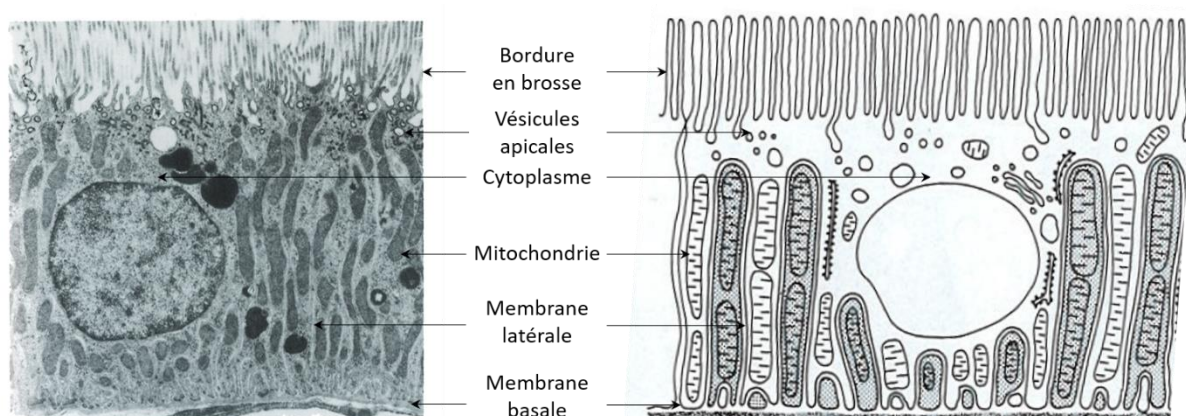


Figure 3: Cellule du tubule proximal (S1) observée en microscopie électronique (gauche) et représentée schématiquement (droite) (modifié depuis Kriz & Kaissling, 2008)

2. Les transports transépithéliaux du tubule proximal

a. Revue des principaux transports impliqués dans la réabsorption proximale

L'urine primitive néo-formée contient une grande quantité d'eau, d'ions sodium, potassium, chlorure, calcium, magnésium, bicarbonates et phosphates ainsi que le glucose, des acides-aminés et des protéines de bas poids moléculaire filtrés.

Quantitativement, le TP est le segment du néphron dont l'activité de transport transépithélial est la plus importante. On considère ainsi qu'il réabsorbe la totalité du glucose, des acides aminés et des protéines filtrée, 80 % des ions phosphates et bicarbonates filtrés, les deux tiers des ions Na^+ , Cl^- , K^+ , Ca^{2+} filtrés, les trois quarts de l'eau filtrée et un tiers des ions Mg^{2+} filtrés (Giebisch *et al.*, 2007; Zhuo & Li, 2013; Blaine *et al.*, 2015).

Pour cela, les membranes du TP, dont les architectures particulières permettent une grande surface d'échange lumière/interstitium, sont dotées de nombreux transporteurs apicaux et basolatéraux. Considéré comme un épithélium lâche (aux jonctions serrées clairsemées), le TP réabsorbe également une importante quantité d'ions et d'eau par la voie paracellulaire [voir Figure 4] (Zhuo & Li, 2013; Palmer & Schnermann, 2015).

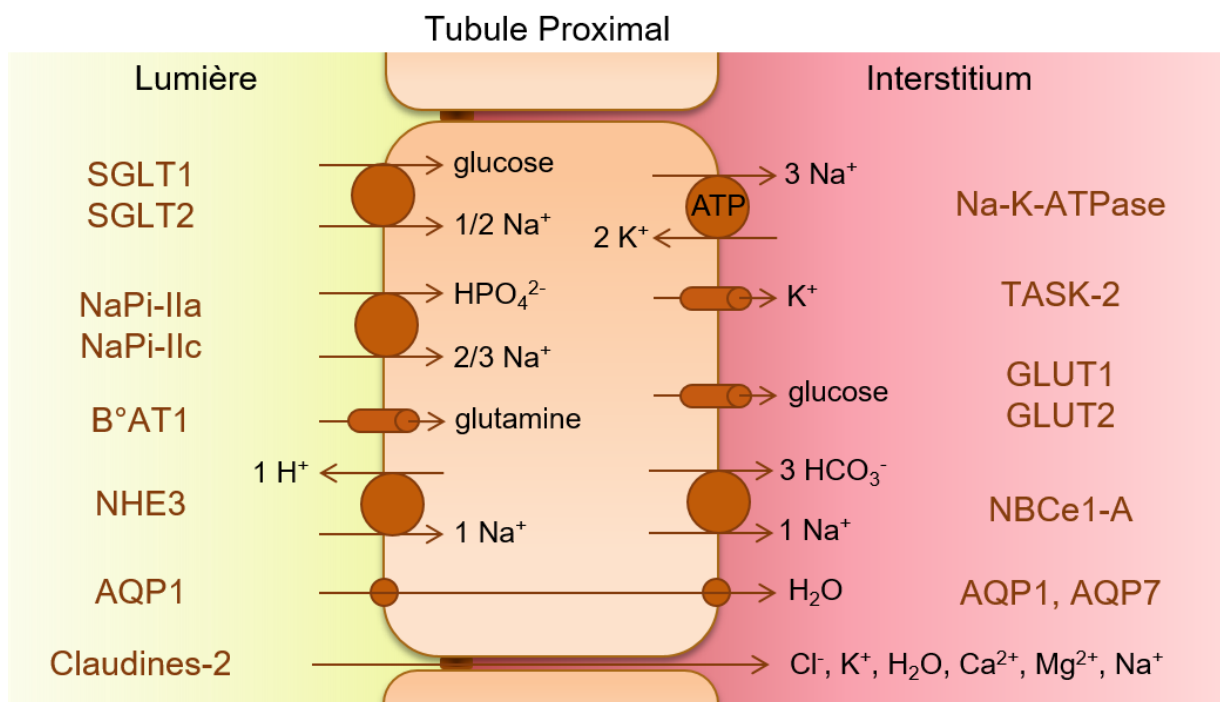


Figure 4: Schéma des principales voies de réabsorption du tubule proximal et des principaux transporteurs impliqués (d'après Zhuo & Li, 2013; Blaine et al., 2015)

Du côté apical des cellules, le glucose, les ions phosphates et les acides aminés sont co-transportés vers le cytoplasme avec des ions Na^+ , *via* notamment les cotransports SGLT-1, SGLT-2, NaPi-IIa, NaPi-IIc et $\text{B}^0\text{AT1}$ (Verrey *et al.*, 2009; Hummel *et al.*, 2011; Vallon, 2011; Blaine *et al.*, 2015). Ainsi, 80-90 % du glucose filtré est réabsorbé dans le TCP dont les cellules expriment les transporteurs SGLT-2 tandis que les 10-20 % restants sont captés par le TPD qui exprime SGLT-1 (Hummel *et al.*, 2011; Vallon, 2011). Cependant, l'impact de ces transporteurs sur la réabsorption nette du sodium reste limité (Palmer & Schnermann, 2015). Au contraire, l'échangeur NHE3 est seul responsable d'environ 60 % de la réabsorption apicale du sodium et secrète, en échange, des protons vers la lumière tubulaire (Schultheis *et al.*, 1998; Laghmani *et al.*, 2002). Le gradient de concentration transmembranaire de sodium (~ 140 mM dans la lumière et ~ 15 -20 mM en intracellulaire) est le moteur de ces transports et son maintien est permis par la réabsorption basolatérale du sodium par la Na^+/K^+ -ATPase (Zhuo & Li, 2013).

Du côté basolatéral, l'activité de la Na^+/K^+ -ATPase qui permet la réabsorption du sodium est maintenue par la présence de canaux potassiques (voir Section Introduction B.III.1). Une fraction significative du sodium est également réabsorbée, en même temps que du bicarbonate, par le cotransporteur NBCe1-A (Kurtz & Zhu, 2013). Enfin, la réabsorption du glucose y est assurée par les transporteurs GLUT-2 dans le TCP et GLUT-1 dans le TPD [voir Figure 4] (Hummel *et al.*, 2011; Vallon, 2011).

Les transports transcellulaires du TP tendent à accumuler, entre les digitations basolatérales, des ions et des solutés, ce qui est le moteur d'une réabsorption transépithéliale passive d'eau (Giebisch *et al.*, 2007; Zhuo & Li, 2013). Environ 75 % de l'eau réabsorbée dans le TP l'est par diffusion facilitée au travers d'aquaporines apicales et basolatérales (AQP1 majoritairement, AQP7 du côté basolatéral du TPD). Les 25 % restants se déplacent par osmose entre les jonctions serrées du TP constituées majoritairement de claudine-2 [voir Figure 4] (Sohara *et al.*, 2006; Rosenthal & Fromm, 2014; Yu, 2015).

Les gradients ioniques transépithéliaux existants le long du TP, résultants des transports transcellulaires, génèrent une différence de potentiel (ddp) transépithéliale considérée négative dans la partie S1 du TP (-2 mV environ) puis positive dans les deux parties suivantes ($+2$ mV). Cela aboutit d'abord au déplacement vers l'interstitium d'ions Cl^- couplée à une rétrodiffusion de sodium par la voie paracellulaire, en parallèle de la réabsorption transcellulaire des ions Na^+ . Ensuite, dans la dernière partie du TP, cela conduit à une réabsorption significative de sodium par la voie paracellulaire (Planelles, 2004; Mount, 2012; Palmer & Schnermann, 2015).

Enfin, il est notable que la réabsorption massive d'eau conduirait à un "*solvent drag*" que l'on pourrait traduire par "*l'entraînement du soluté par le solvant*". Ce phénomène expliquerait la majeure partie des réabsorptions paracellulaires de calcium, de magnésium, de potassium et d'une fraction du chlorure et du sodium à travers les jonctions serrées, qui leurs sont perméables [voir Figure 4] (Planelles, 2004; Giebisch *et al.*, 2007; Blaine *et al.*, 2015; Palmer & Schnermann, 2015; Yu, 2015).

Dans leur ensemble, les réabsorptions dans le TP sont iso-osmotiques: l'ultrafiltrat y change de volume mais conserve son osmolarité, légèrement inférieure à celle du plasma (Zhuo & Li, 2013). L'eau et les éléments réabsorbés depuis ce segment retournent enfin vers la circulation générale. Pour cela ils sont acheminés vers la lumière des capillaires péri-tubulaires corticaux (perfusés par la fraction non-filtrée du sang venant des AE) puis sont acheminés en direction de la veine rénale (Zhuo & Li, 2013; Palmer & Schnermann, 2015).

b. Régulation des activités de réabsorption du tubule proximal

Le néphron distal régule le DFG et adapte ses activités de transport afin de compenser les variations de volémie, de pression artérielle et d'osmolarité plasmatique (voir Section Introduction A.III.2). Le TP s'adapte également aux faibles variations physiologiques du DFG, via un mécanisme appelé la "*balance glomérulo-tubulaire*". Par ce mécanisme, quel que soit le DFG, les fractions d'eau, de NaCl et de divers solutés réabsorbés par le TP restent inchangées. La balance glomérulo-tubulaire pourrait être impliqué dans le maintien de la pression artérielle (Tucker & Blantz, 1978; Zhuo & Li, 2013). Cette adaptation du TP est mécanique (la modification du DFG module le flux luminal dans le TP ainsi que les pressions oncotiques et hydrostatiques des capillaires péri-tubulaires) mais dépend aussi de médiateurs chimiques. Ainsi, la réabsorption de sodium et de bicarbonates liée à NHE3 et/ou à la pompe $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ peut rapidement être réduite par la dopamine ou augmentée par l'angiotensine-II (AngII), liées à leurs récepteurs respectifs DA_1 et AT_1 . Par ailleurs, la fraction d'ions Ca^{2+} réabsorbée par le TP est proportionnelle à l'activité globale de réabsorption du segment (Zhuo *et al.*, 1986; Jose *et al.*, 2002; Bockenhauer *et al.*, 2009; Mount, 2012; Zhuo & Li, 2013). La réabsorption des ions phosphates et la maturation proximale de la Vitamine D par le TP sont aussi régulées par la Parathormone (PTH), qui se fixe par ses récepteurs apicaux et basolatéraux aux cellules proximales (voir Section Introduction C.III.2.c) (Bacic *et al.*, 2006). Enfin, l'hyperglycémie tend à surexprimer les 2 transporteurs SGLT et pourrait diminuer l'expression de l'AQP1 (Freitas *et al.*, 2008; Vidotti *et al.*, 2008).

3. L'endocytose des protéines filtrées par le tubule proximal

Il existe une relation inversement proportionnelle entre la taille d'une protéine et sa capacité à passer à travers la barrière de filtration glomérulaire. Ainsi, la fraction filtrée des protéines dont le poids moléculaire est inférieur à 20 kDa est forte, tandis que les protéines dont le poids moléculaire est supérieur à celui de l'albumine (69 kDa) ne sont virtuellement pas filtrées (Greger *et al.*, 1996). Toutefois, sur une période de temps donnée, la quantité filtrée d'une protéine dépend aussi beaucoup de sa concentration sérique. Ainsi, même si moins de 0.1 % de l'albumine, très abondante dans le compartiment plasmatique, est filtré, cette dernière représente une fraction importante des protéines qui atteignent la lumière tubulaire (Gekle, 2007). Pour la même raison, une quantité significative de transferrine (77 kDa), théoriquement retenue au niveau glomérulaire, est ultrafiltrée chaque jour (Zhang *et al.*, 2007).

Au final, pour chaque litre d'ultrafiltrat, au moins 40 mg de protéines de bas poids moléculaire (PBPM) sont filtrés (Greger *et al.*, 1996). On y retrouve entre autres des facteurs de croissance (FGF, EGF, IGF), des hormones (insuline, PTH, AngII), des enzymes (Cathepsine B, Lysosyme, Urokinase), des vitamines associées à leurs protéines de transport (D, A, B₁₂, B₉) et les chaînes légères des immunoglobulines (Devuyst & Luciani, 2015; Eshbach & Weisz, 2017). La totalité des protéines filtrées est réabsorbée par le TP. Ainsi, aucune d'entre elles n'atteint la lumière des segments distaux. Ce phénomène est permis par une activité d'endocytose au pôle apical des cellules du TP, médiée par leur appareil vacuolaire. Celui-ci étant plus développé dans le TCP, c'est dans cette partie du TP que la majorité de l'endocytose des PBPM est effectuée (Kriz & Kaissling, 2008; Eshbach & Weisz, 2017).

L'endocytose proximale des PBPM débute par la génération de très nombreuses vésicules d'endocytose aux contours irréguliers à la base des microvillosités apicales [Voir Figure 3]. Quelques-unes de ces vésicules réalisent une pinocytose simple (ou "*endocytose en phase fluide*") tandis que les autres sont recouvertes d'une enveloppe de clathrine et réalisent une "*endocytose dépendante des récepteurs membranaires*". Il est difficile d'évaluer précisément le degré d'importance relatif des deux modes d'endocytoses dans le TP car l'endocytose clathrine-dépendante permet également l'internalisation d'éléments *via* une phase fluide. Malgré tout, l'endocytose dépendante des récepteurs semble être la voie majoritaire d'internalisation des PBPM et de l'albumine par le TP (Nielsen *et al.*, 2016; Eshbach & Weisz, 2017).

Ces vésicules d'endocytose, qui contiennent les protéines filtrées, se détachent rapidement de la membrane plasmique et débutent un cheminement intracellulaire durant lequel leur contenu et leur taille sont modifiés. Ainsi, peu après leur internalisation, elles deviennent des "*endosomes précoces*" dont le contenu s'acidifie, passant d'un pH de 7.4 à un pH de 6.5 (voir Section Introduction C.III.3.a). Ces derniers fusionnent à nouveau avec la membrane plasmique, ou fusionnent entre eux pour former de grandes vacuoles apicales appelées des "*corps multi-vésiculaires*". Ces corps multi-vésiculaires constituent un compartiment de triage depuis lequel se forment soit de nouvelles vésicules tubulaires de recyclage membranaire, soit des vésicules appelées "*endosomes tardifs*". Au sein des endosomes tardifs, le pH diminue progressivement jusqu'à 5.5, puis ceux-ci fusionnent avec les "*lysosomes*" dont le pH interne est inférieur à 5 (Devuyst & Luciani, 2015; Eshbach & Weisz, 2017).

Durant ces processus, de nombreuses protéines interviennent. Les premières sont les récepteurs multi-ligands membranaires Mégaline, Cubiline et Amnionless: elles s'associent pour lier par leurs domaines extracellulaires un grand nombre de protéines filtrées (Dickson *et al.*, 2014). Ces liaisons récepteur/ligand initient la formation, l'internalisation puis le déplacement des vésicules recouvertes de clathrine, sous l'action conjointe de filaments d'actine associés à des myosines, la dynamine et des microtubules. À l'interface entre ces récepteurs et le cytosquelette se trouvent des protéines adaptatrices: la Mégaline interagit avec les myosines IIa ou VI *via* Dab2 (Koral *et al.*, 2014), avec les microfilaments d'actine *via* la Cofiline et avec les microtubules *via* KIF3B. Dans ces deux derniers cas, l'interaction est indirecte: elle nécessite l'échangeur $2\text{Cl}^-/\text{H}^+$ ClC-5 comme intermédiaire (Hryciw *et al.*, 2003; Reed *et al.*, 2010). Cet échangeur et d'autres transporteurs (dont la pompe à proton vacuolaire V-ATPase) participent à l'acidification du contenu endosomal (voir Section Introduction C.III.3.a), étape nécessaire à la dissociation récepteur/ligand ainsi qu'à la fusion et au recyclage des endosomes [Voir Figure 5] (Devuyst & Luciani, 2015; Eshbach & Weisz, 2017).

A chaque étape de l'endocytose, des protéines sont recrutées dans les vésicules depuis l'appareil de Golgi et permettent de les identifier. Dans le TP, les isoformes de la *petite protéine G* Rab5 et leur protéine associée EEA1 interviennent dans la formation et la fusion des endosomes précoces. La protéine Rab4 serait exprimée dans les vésicules de recyclage provenant des endosomes précoces et la protéine Rab11 dans celles recyclées depuis les corps multi-vésiculaires. Enfin, Rab7 pourrait être un marqueur des endosomes tardifs et LAMP-1 marque spécifiquement les lysosomes (Hutagalung & Novick, 2011; Eshbach & Weisz, 2017).

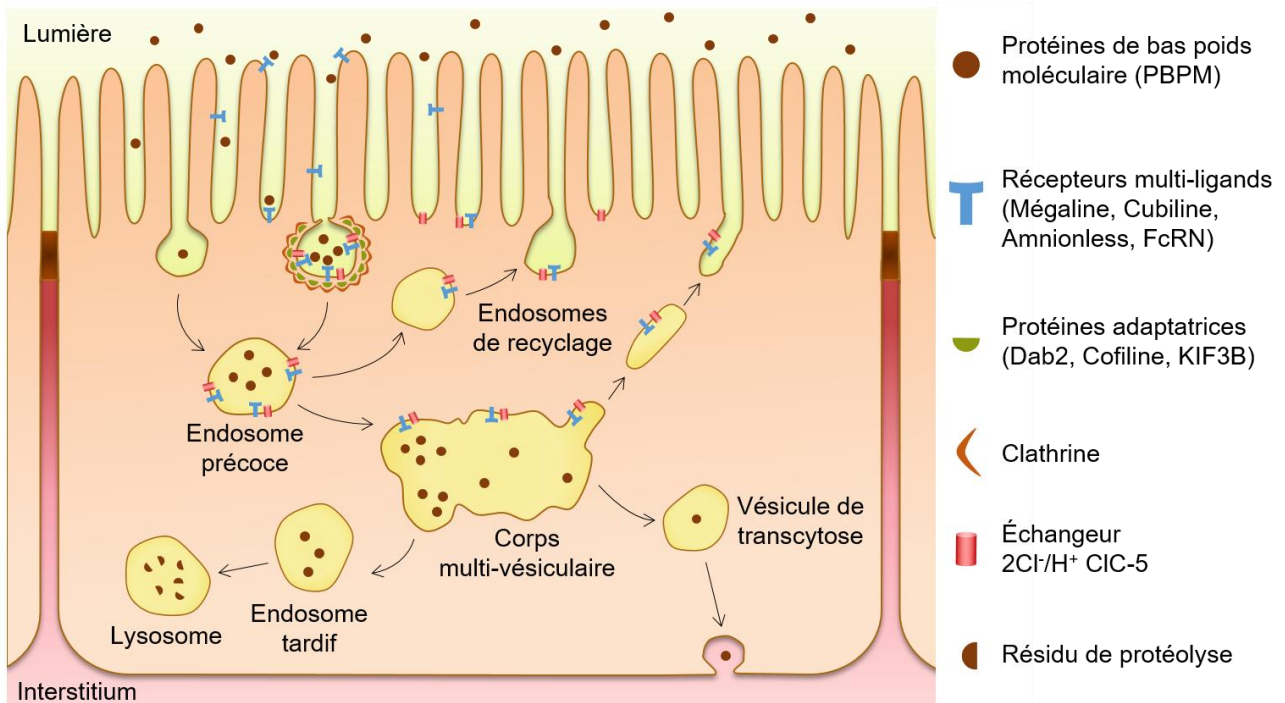


Figure 5: Schéma des voies d'endocytose des protéines de bas poids moléculaire par le tubule proximal (d'après Nielsen et al., 2016; Dickson et al., 2014; Eshbach & Weisz, 2017)

In fine, les récepteurs multi-ligands et transporteurs membranaires sont recyclés vers la membrane plasmique tandis que les protéines endocytées sont acheminées vers les lysosomes. Elles y sont dégradées par des protéases en acides aminés, qui sont transportés *via* la membrane basolatérale vers la circulation générale, ou ré-employés par la cellule proximale (Dickson *et al.*, 2014). Certaines enzymes lysosomales, comme la Cathepsine B pourraient être en partie issues de la voie endosomale elle-même (Nielsen *et al.*, 2016; Eshbach & Weisz, 2017). Récemment, il a été montré qu'une fraction relativement mineure de l'albumine endocytée dans le TP est transportée intacte jusque dans le compartiment plasmatique, ce qui a révélé l'existence d'un mode d'endocytose appelé *transcytose*, dépendant du récepteur FcRN, qui permet de court-circuiter la voie lysosomale. Cette voie est responsable de la réabsorption des chaînes légères d'immunoglobulines (Tenten *et al.*, 2013; Dickson *et al.*, 2014; Eshbach & Weisz, 2017).

Cette endocytose des PBPM par la "*voie endo-lysosomale*" du TP possède un rôle crucial: évitant la protéinurie et ses conséquences néfastes pour la fonction rénale (Dizin *et al.*, 2013), elle est également impliquée dans le métabolisme phospho-calcique (Devuyst & Luciani, 2015) (voir Section Introduction C.III.2.c). En conséquence, cette fonction du TP est stimulée lorsque le DFG est élevé et que le flux luminal de protéines augmente (Eshbach & Weisz, 2017). À DFG physiologique, l'endocytose proximale de l'albumine peut être multipliée par 3 environ avant d'être saturée et d'aboutir à une albuminurie (Wagner *et al.*, 2016).

4. Rôles du tubule proximal dans le maintien de l'équilibre acido-basique

Au niveau cellulaire, et *a fortiori* au niveau systémique, un grand nombre de nos processus métaboliques est dépendant du pH des compartiments intra- et extracellulaires. Le pH est donc un paramètre très finement régulé par l'organisme, compris entre 7.36 et 7.44 dans le sang artériel et proche de 7.2 dans le cytoplasme. Le maintien en toute circonstance d'un pH artériel adéquat définit la notion d'équilibre acido-basique. Il s'effectue par compensation de la charge acide imposée à notre organisme par l'alimentation et l'oxydation des acides aminés neutres, des graisses et des sucres par notre métabolisme. L'ensemble produit quotidiennement une balance positive en acides non-volatils équivalente à 70 mmoles de protons (~1 mmole/Kg poids corporel/jour) (Remer & Manz, 1995). Afin de limiter les variations de pH sanguin liées à cette charge acide, entrent en jeu différents processus impliquant des tampons plasmatiques, les poumons et les reins (Weiner & Verlander, 2012; Hamm *et al.*, 2015).

A court terme, la grande majorité des ions H^+ excédentaires s'associent dans le plasma avec les ions HCO_3^- (principal tampon plasmatique) ou dans une moindre mesure avec les ions HPO_4^{2-} . Tamponnés par le bicarbonate, les protons aboutissent à la formation de CO_2 et diminuent la bicarbonatémie. L'augmentation de la pression partielle du CO_2 dans le sang (PCO_2) et la diminution très légère du pH interstitiel cérébral stimulent des chémorécepteurs dans le *locus caeruleus* et provoquent une augmentation de la fréquence respiratoire: le CO_2 plasmatique excédentaire est alors expiré et la PCO_2 se stabilise vers 45 mmHg. L'équation d'Hendersen-Hasselbach lie la bicarbonatémie (mmole/L), la PCO_2 (mmHg) et le pH plasmatique comme suit (Brennan *et al.*, 1988; Weiner & Verlander, 2012):

$$pH = 6.1 \times \log \frac{[HCO_3^-]}{0.03 \times PCO_2}$$

Dans ces conditions il apparaît que maintenir une bicarbonatémie proche de la valeur physiologique d'environ 26 mmoles/L est nécessaire à la conservation du pouvoir tampon de l'organisme et *a fortiori* de son équilibre acido-basique. Les reins assurent cette fonction de deux façons. Premièrement, ils stabilisent ce pouvoir tampon en assurant la réabsorption des ions HCO_3^- et HPO_4^{2-} plasmatiques filtrés (voir Section Introduction A.II.4.a). Deuxièmement, ils excrètent *via* l'urine la charge acide quotidienne (on parle d'"*excrétion nette d'acide*" ou ENA) et couplent cette excrétion avec la régénération des ions bicarbonates plasmatiques consommés, grâce à un procédé appelé l'"*ammoniogenèse*" (voir Section Introduction A.II.4.b). Le TP joue un rôle prépondérant dans ces deux mécanismes.

a. Rôles du tubule proximal dans la réabsorption des tampons plasmatiques

Les ions bicarbonates plasmatiques sont filtrés librement par les glomérules, pour un total d'environ 4200-4500 mmol par jour. Afin de permettre à ces ions de retourner dans le compartiment plasmatique, le néphron les réabsorbe dans leur quasi-totalité: *in fine*, l'urine contient moins d'une millimole d'ions HCO_3^- par litre (Weiner & Verlander, 2013).

Le TP est le segment le plus fortement impliqué dans ce processus: environ 80 % des ions HCO_3^- filtrés y sont réabsorbés, majoritairement dans la partie S1 (Mount, 2012). Pour cela, des protons sont sécrétés vers la lumière tubulaire et s'y associent avec des ions bicarbonates pour former du CO_2 et de l'eau. Le CO_2 diffuse passivement à travers la membrane puis se réassocie avec de l'eau pour former un ion HCO_3^- et un proton dans la cellule. Le proton est alors une nouvelle fois extrudé du côté apical afin d'entretenir un cycle de réabsorption des ions bicarbonates, tandis que l'ion bicarbonate lui-même est réabsorbé vers l'interstitium du côté basolatéral [Voir Figure 6] (Weiner & Verlander, 2012; Hamm *et al.*, 2015).

Les déterminants moléculaires de cette réabsorption proximale sont bien connus. La sécrétion apicale des ions H^+ est attribuée à plus de 70 % à l'échangeur Na^+/H^+ NHE3, le reste étant assuré par la pompe à proton vacuolaire (V-ATPase) et possiblement l'échangeur Na^+/H^+ NHE8 (Brown & Wagner, 2012; Hamm *et al.*, 2015). Les réactions entre le CO_2 et l'eau sont catalysées par les anhydrases carboniques ACII (soluble) et ACIV (membranaire) tandis que les ions HCO_3^- sont réabsorbés avec des ions Na^+ *via* le cotransporteur NBCe-1A (Kurtz & Zhu, 2013; Hamm *et al.*, 2015). Cependant la sécrétion de protons n'est sans doute pas le seul mode de réabsorption proximale du bicarbonate: très récemment, une réabsorption directe d'ions HCO_3^- et Na^+ par le cotransporteur apical NBCn2 a été décrite et pourrait soutenir près de 15 % de la réabsorption des ions bicarbonates filtrés [Voir Figure 6] (Guo *et al.*, 2017).

Les 20 % d'ions HCO_3^- filtrés restants sont réabsorbés dans le néphron distal. La BAL réabsorbe à elle seule les trois quarts de ces ions par un procédé similaire à celui qu'utilise le TP et qui implique l'échangeur apical Na^+/H^+ NHE3 ainsi que de multiples transporteurs de bicarbonate basolatéraux tel AE2 (Eladari *et al.*, 1998; Mount, 2014). Le reste des ions HCO_3^- atteignant le CC peut être réabsorbé par des cellules appelées "*cellules intercalaires α* " (CI- α): à l'aide de leur ACII cytosolique, celles-ci sécrètent des protons vers la lumière tubulaire *via* des pompes H^+ -ATPases et H^+ - K^+ -ATPases et réabsorbent si nécessaire du bicarbonate grâce à un échangeur $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ basolatéral appelé AE1 (Hamm *et al.*, 2015; Roy *et al.*, 2015).

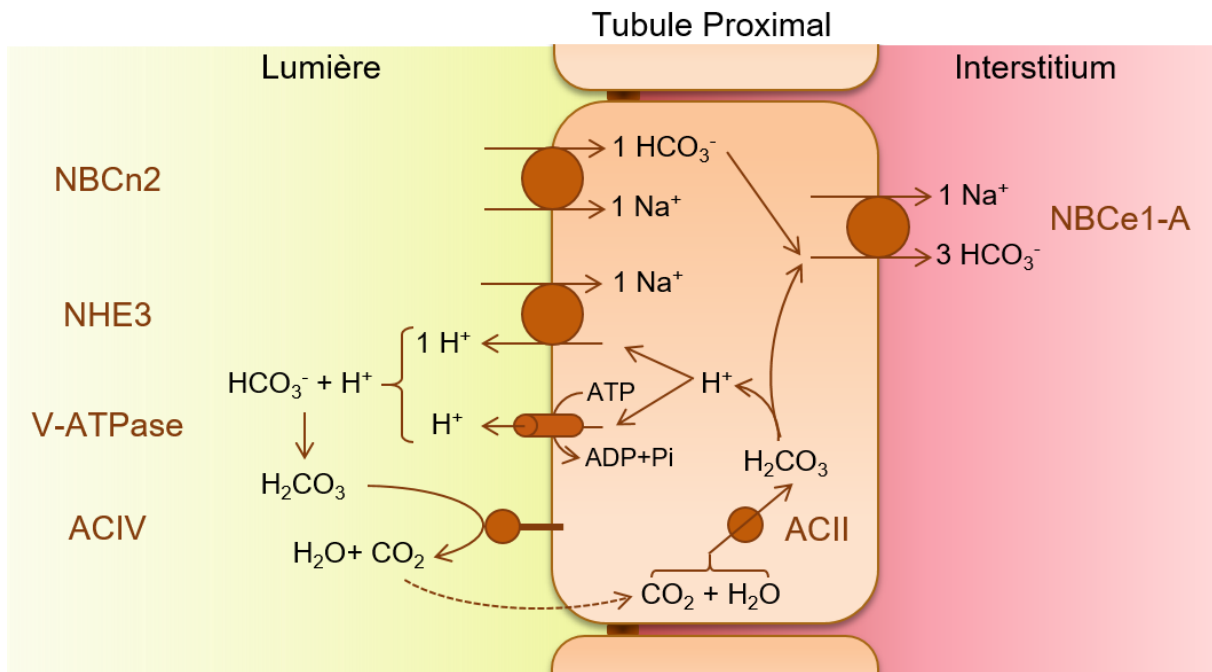


Figure 6: Schéma des voies de sécrétion des protons et de réabsorption du bicarbonate par le tubule proximal (d'après Guo *et al.*, 2017; Curthoys & Moe, 2014 ; Hamm *et al.*, 2015)

Comme indiqué précédemment le TP est également responsable de la réabsorption d'environ 80 % des phosphates filtrés (voir Section Introduction A.II.2.a). Cette réabsorption nécessite à la membrane apicale des cellules proximales l'expression des cotransporteurs $\text{Na}^+/\text{HPO}_4^{2-}$ NaPi-IIa, NaPi-IIc et dans une moindre mesure PiT-2. Le mécanisme responsable de la réabsorption basolatérale du phosphate est encore inconnu (Forster *et al.*, 2006; Prie *et al.*, 2009; Villa-Bellosta *et al.*, 2009). A mesure que les différents segments du néphron sécrètent des protons afin de réabsorber des ions HCO_3^- , les ions HPO_4^{2-} restants dans la lumière tubulaire sont réduits, par titration des ions H^+ , à leur forme monovalente H_2PO_4^- non-réabsorbée par les transporteurs NaPi-II. Ainsi, de l'entrée dans la chambre urinaire à la sortie du CC, le ratio $\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ de l'urine primitive passe de ~ 4 à ~ 0.06 à mesure que le pH urinaire diminue (Weiner & Verlander, 2012; Curthoys & Moe, 2014; Hamm *et al.*, 2015).

Outre la réabsorption des deux principaux tampons plasmatiques, le TP proximal est aussi le seul segment du néphron impliqué dans la réabsorption du citrate filtré. Cet anion organique peut être métabolisé par les cellules s'il est réabsorbé, auquel cas il consommera des ions H^+ . Réabsorber le citrate revient donc pour l'organisme à réabsorber une base. Sur les 25 mmoles de citrate filtrées chaque jour, le TP réabsorbe environ 20 mmoles *via* un cotransporteur $\text{Na}^+/\text{Acide dicarboxylique}$ apical appelé NaDC-1 (Curthoys & Moe, 2014; Kirejczyk *et al.*, 2014).

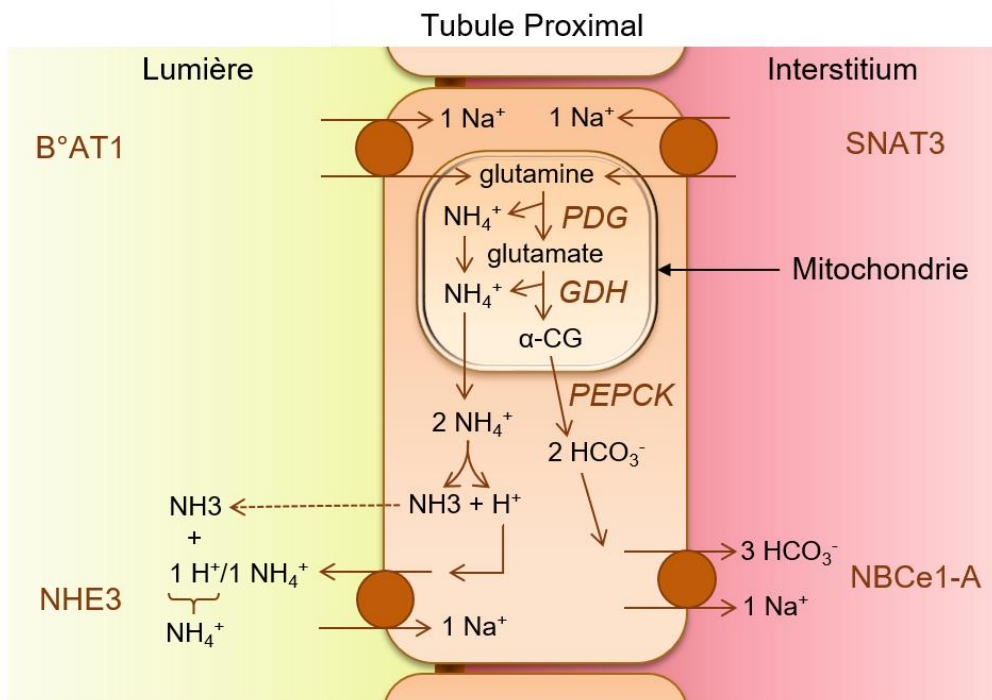
b. Rôle de l'ammoniogénèse proximale dans l'excrétion urinaire nette d'acide

La réabsorption tubulaire du bicarbonate filtré est nécessaire au maintien de l'équilibre acido-basique, mais pas suffisante. Pour cela, la charge acide quotidienne équivalente à 70 mmoles de protons doit également être excrétée dans l'urine (Weiner & Verlander, 2012).

La première forme d'excrétion urinaire d'acide est appelée l'*acidité titrable* (AT) urinaire. Cette acidité provient des ions H^+ sécrétés vers la lumière tubulaire par la plupart des segments du néphron et particulièrement le tubule collecteur, dont les CI- α acidifient l'urine jusqu'à un pH de 5.5. Même si, dans le TP, cette sécrétion permet essentiellement de réabsorber des ions HCO_3^- , dans tous les segments une fraction des protons s'associe avec des ions HPO_4^{2-} dans la lumière tubulaire pour former des ions $H_2PO_4^-$ qui seront excrétés. Les ions HPO_4^{2-} non-réabsorbés par le TP constituent donc le premier tampon de l'AT urinaire et permettent de maintenir un gradient de proton favorable à une acidification distale de l'urine. Une partie faible de l'AT urinaire provient de l'excrétion d'acides organiques variés, comme l'acide urique (dont 90 % de la fraction filtrée est réabsorbée par le TP) et la créatinine. Dans l'ensemble, l'acidité titrable urinaire permet l'excrétion quotidienne de l'équivalent d'environ 25 mmoles de protons conjugués (Curthoys & Moe, 2014; Hamm *et al.*, 2015; Roy *et al.*, 2015; Otani *et al.*, 2017).

Les 45 mmoles de protons restantes sont excrétées dans l'urine sous la forme d'ions NH_4^+ . Ces ions sont dans leur quasi-totalité néoformés dans le néphron (dont 60 % dans le TP) lors du processus d'"ammoniogénèse" (Weiner & Verlander, 2013). L'ammoniogénèse débute dans le TP par l'entrée dans la cellule de glutamine. Cette entrée est permise par la réabsorption de toute la glutamine filtrée, par le cotransporteur Na^+ /Glutamine B^0AT1 apical (et possiblement B^0AT3) mais également, dans la partie S3 du TP, *via* différents transporteurs basolatéraux dont le transporteur Na^+ /Glutamine SNAT3 (Schneider *et al.*, 2007; Weiner & Verlander, 2013). Cette glutamine sert de substrat à une chaîne de réactions métaboliques mitochondriales et cytosoliques impliquant les enzymes PDG, GDH et PEPCK ainsi que les substrats intermédiaires que sont le glutamate et l' α -cétooglutarate (α -CG): elle génère *in fine* 2 ions NH_4^+ . Une partie de ces ions est directement sécrétée vers la lumière tubulaire *via* l'échangeur NHE3. L'autre partie se dissocie en ammoniac et proton: l'ion H^+ est sécrété par NHE3 ou la pompe V-ATPase et le NH_3 diffuse à travers la membrane apicale: les deux se réassocient enfin en ammonium dans la lumière du TP [Voir Figure 7] (Moret *et al.*, 2007; Weiner & Verlander, 2013; Curthoys & Moe, 2014; Hamm *et al.*, 2015).

A ce stade, trois informations sont notables. Premièrement, à l'état basal (lorsque l'organisme subit une charge acide quotidienne normale) la grande majorité de la glutamine réabsorbée par le TP n'y est pas métabolisée mais simplement réabsorbée du côté basolatéral des cellules *via* des transporteurs méconnus. Deuxièmement, les protéines impliquées dans l'entrée de la glutamine et la sortie de l'ammonium de la mitochondrie n'ont pas été identifiées moléculairement. Enfin troisièmement, durant l'ammoniogenèse deux ions HCO_3^- sont également formés. Leur réabsorption par le cotransporteur basolatéral NBCe-1A est à l'origine de la régénération du stock plasmatique de tampon bicarbonate [Voir Figure 7] (Indiveri *et al.*, 1998; Weiner & Verlander, 2013; Curthoys & Moe, 2014; Hamm *et al.*, 2015).



*Figure 7: Schéma de l'ammoniogenèse et de la sécrétion d'ammonium par le tubule proximal (d'après Hamm *et al.*, 2015; Moret *et al.*, 2007; Curthoys & Moe, 2014)*

Avant d'être uriné, le NH_4^+ recircule entre les segments médullaires du néphron distal. Étant neurotoxique, cela évite son retour vers le sang, possible en cas de réabsorption depuis le TCD (Taylor & Curthoys, 2004; Hamm *et al.*, 2015). Dans la BAL, il est réabsorbé à la place des ions K^+ par le cotransporteur NKCC2 (voir Section Introduction A.III.1) et l'échangeur NHE4 basolatéral. Dans l'interstitium de la médullaire externe, il s'accumule et contribue à la formation du gradient cortico-papillaire. Il est enfin sécrété dans la lumière du CC (par les CI- α surtout) par diffusion de NH_3 et transport facilité de $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ *via* différents transporteurs dont les glycoprotéines Rhbg et Rhcg. Le NH_3 se réassocie enfin dans la lumière du tubule collecteur avec les ions H^+ sécrétés en parallèle par les CI- α (voir Section Introduction A.III.1) (Biver *et al.*, 2008; Bishop *et al.*, 2010; Weiner & Verlander, 2013; Hamm *et al.*, 2015).

c. Régulation des transports proximaux et de l'ammoniogenèse par l'acidose

L'ENA équivaut à la somme de l'AT et de l'ammoniurie, à laquelle est soustraite l'excrétion des ions HCO_3^- . Le total doit être en balance avec la charge acide subie par l'organisme: si celle-ci augmente, amorçant une acidose, il devrait être possible de la compenser en augmentant la réabsorption du bicarbonate, le niveau d'AT urinaire ou l'ammoniurie.

À première vue, la proportion d'ions HCO_3^- réabsorbée par le TP est variable. Mais dans leur ensemble, les segments du néphron réabsorbent dès l'état basal la totalité des ions HCO_3^- filtrés. Afin de compenser une augmentation de la charge acide quotidienne, augmenter seulement la capacité de réabsorption rénale du bicarbonate n'est donc pas suffisant. Il faut pour cela augmenter conjointement la quantité d'ions HCO_3^- à réabsorber, ce dont se charge l'ammoniogenèse (Voir détails plus loin).

Par ailleurs, réabsorber le citrate filtré équivaut pour l'organisme à réabsorber une base (voir Section Introduction A.II.4.a). Quelques millimoles de citrate étant urinées chaque jour, une réabsorption plus importante par le TP pourrait compenser partiellement une charge acide élevée. Dans les faits, l'acidification du contenu luminal augmente l'expression proximale et l'activité de transport de citrate du cotransporteur NaDC-1, réduisant la citraturie (Brennan *et al.*, 1988; Aruga *et al.*, 2000). Mais ce phénomène est limité et la citraturie revêt une importance certaine dans la protection contre la lithiase urinaire (Curthoys & Moe, 2014; Kirejczyk *et al.*, 2014). Il semble donc peu efficace et peu intéressant pour l'organisme de compenser une charge acide élevée par modulation de la citraturie.

Le bilan rénal du phosphate est lui majoritairement régulé par le métabolisme phosphocalcique et ses effecteurs (PTH, FGF-23) qui stimulent l'endocytose des transporteurs NaPi-II proximaux et augmentent la phosphaturie (Bacic *et al.*, 2006; Prie *et al.*, 2009). Lors d'une acidose, de multiples facteurs (comme la résorption osseuse qui augmente la quantité de phosphates filtrée) aboutissent également à l'augmentation de la phosphaturie. Ce phénomène, aussi causé par une diminution de l'expression et de l'adressage des transporteurs NaPi-II (Ambuhl *et al.*, 1998; Nowik *et al.*, 2008), est utile car il confère aux segments distaux du néphron la possibilité de sécréter davantage de protons, tamponnés au fur et à mesure par les ions HPO_4^{2-} (Curthoys & Moe, 2014; Roy *et al.*, 2015). Toutefois dans l'ensemble, l'AT urinaire ne varie que peu lors de l'acidose chronique (Bishop *et al.*, 2010; Hamm *et al.*, 2015).

Au contraire, l'ammoniurie peut être multipliée par 6 en quelques jours lors d'une hausse de la charge acide, alors que l'ammoniémie reste inchangée. C'est donc par la stimulation de l'ammoniogenèse rénale que l'ENA augmente en cas de nécessité (Weiner & Verlander, 2013; Hamm *et al.*, 2015). Ce phénomène est expliqué par la modification du métabolisme de la glutamine, principal substrat de l'ammoniogenèse. En phase aigüe d'acidose, le taux plasmatique de glutamine est doublé, car le foie et les muscles en produisent plus (Schrock *et al.*, 1980; Taylor & Curthoys, 2004). En phase chronique, son taux plasmatique se normalise car les reins en consomment ~ 15 fois plus. Le TP, seule partie du néphron dont l'ammoniogenèse est stimulée, est à l'origine du phénomène. À terme, ses cellules synthétisent au moins 80 % des ions NH_4^+ excrétés (Good & Burg, 1984; Weiner & Verlander, 2013).

Cette stimulation de l'ammoniogenèse proximale est expliquée par la modification de l'expression du transporteur basolatéral SNAT3, fortement surexprimé au niveau transcriptionnel et protéique, qui contribue alors à une entrée massive de glutamine dans les cellules des parties S1, S2 et S3 du TP (Moret *et al.*, 2007; Nowik *et al.*, 2008; Busque & Wagner, 2009). Dans le même temps, l'expression et l'activité des enzymes PDG, GDH et PEPCK sont augmentées: d'abord, car la diminution du pH intracellulaire provoque la stabilisation de leurs ARNm et stimule la transcription de la PEPCK (Hwang *et al.*, 1991; Schroeder *et al.*, 2003; Mufti *et al.*, 2011), ensuite, car les diminutions du pH et des concentrations du glutamate et de l' α -cétooglutarate dans les mitochondries activent les enzymes PDG et GDH (Schoolwerth, 1991; Weiner & Verlander, 2013).

Les ions NH_4^+ formés ainsi doivent être sécrétés dans la lumière proximale sous forme d'ammoniac et de protons [Voir Figure 7]. De fait, suite à une forte charge acide, la capacité de sécrétion des protons par le TP augmente: la diminution du pH intracellulaire agit *via* des capteurs (Pyk2, ERK, ERB1/2) comme signal activateur de voies de transduction qui augmentent l'expression transcriptionnelle et protéique puis l'insertion membranaire de NHE3 (Laghmani *et al.*, 2002; Brown & Wagner, 2012; Curthoys & Moe, 2014; Hamm *et al.*, 2015). Des effets similaires, potentialisés par l'acidose, sont obtenus par l'action de l'endothéline 1 et de l'AngII sur leurs récepteurs basolatéraux respectifs ET-B et AT₁ et (Laghmani *et al.*, 2002; Nagami, 2002; Weiner & Verlander, 2013; Curthoys & Moe, 2014). En parallèle, une forte charge acide stimule la réabsorption des ions HCO_3^- formés lors de l'ammoniogenèse par une augmentation de l'expression du cotransporteur NBCe-1A (Preisig & Alpern, 1988; Handlogten *et al.*, 2015).

5. Aperçu de physiopathologie et de pharmacologie du tubule proximal

a. Les différentes formes d'atteinte des fonctions du tubule proximal

Les différentes voies de réabsorption et d'endocytose du TP présentées précédemment (voir Section Introduction A.II.2) sont interdépendantes. Leurs efficacités dépendent beaucoup de l'insertion à la membrane apicale des cellules proximales de quelques transporteurs et récepteurs, dont l'adressage est régulé par des mouvements vésiculaires aussi impliqués dans l'endocytose proximale (Lin *et al.*, 2011; de Seigneux *et al.*, 2015).

Les pathologies rénales impliquant le TP amenuisent donc fréquemment différents mécanismes de réabsorption du segment: cette affection est appelée un *syndrome de Fanconi*. Ce syndrome se caractérise par une diurèse excessive, accompagnée de manière inconstante de fuites urinaires d'ions bicarbonates, calcium, potassium, phosphates mais aussi de glucose, d'acide urique, d'acides aminés et de PBPM. Il peut donc être accompagné d'une "*acidose tubulaire rénale proximale*" ou pRTA (voir Section Introduction A.II.5.b), de troubles du métabolisme phospho-calcique, d'une lithiase urinaire et d'un retard de croissance (Nakhoul & Batuman, 2011; Mansour-Hendili *et al.*, 2015). Le syndrome de Fanconi peut-être acquis (myélome multiple, traitement du VIH par des antirétroviraux, *etc.*) ou être d'origine génétique. Les formes familiales sont régulièrement liées à la cystinose (maladie de surcharge lysosomale en cystine) ou à la maladie de Dent et le syndrome de Lowe (voir Section Introduction C.I) mais ont également été reliées à la perte de fonctionnalité du transporteur Napi-IIa (Nakhoul & Batuman, 2011; Haque *et al.*, 2012). Il existe aussi des atteintes génétiques ciblées du TP comme le syndrome d'Imerslund-Gräsbeck (protéinurie de bas poids moléculaire et déficience en vitamine B₁₂ liée à l'absence de la Cubiline dans le rein et l'intestin), le syndrome de Donnai-Barrow (protéinurie de bas poids moléculaire liée à l'absence de la Mégaline), les pRTA isolées familiales (voir Section Introduction A.II.5.b), les amino-aciduries génétiques (Cystinurie et maladie de Hartnup) ou la glycosurie familiale rénale (causée par des mutations de SGLT-2) (Kantarci *et al.*, 2007; Nakhoul & Batuman, 2011; Haque *et al.*, 2012).

De manière générale, le TP est un segment dont la perte de fonctionnalité est étroitement liée à la perte globale de la fonction rénale: les atteintes rénales aiguës sont souvent le fruit d'un choc ischémique ou toxique du TP; lorsqu'elles se répètent, elles aboutissent à une maladie rénale chronique dont l'évolution vers l'insuffisance rénale terminale est liée aux capacités du TP à s'hypertrophier, se régénérer et à compenser les atteintes glomérulaires (Chevalier, 2016).

b. L'acidose tubulaire rénale proximale au sein des acidoses métaboliques

L'acidose possède des causes très variées. Elle est causée par une production excessive d'acide, un défaut d'excrétion d'acide et/ou une excrétion exagérée de base. Les acidoses sont dites "*respiratoires*" ou "*métaboliques*". L'acidose respiratoire est la conséquence d'une hypoventilation qui conduit à une augmentation de la PCO_2 (hypercapnie). Elle est notamment la résultante de pathologies affectant la fonction pulmonaire ou la réactivité du *locus caeruleus* à un changement de PCO_2 . Lorsqu'elle est chronique, la bicarbonatémie tend à augmenter car les reins produisent plus d'ions HCO_3^- via l'ammoniogenèse (DuBose, 2012).

L'acidose métabolique est causée soit par une charge acide consommant des ions HCO_3^- plasmatiques, soit par une excrétion excessive d'ions HCO_3^- et se caractérise par une bicarbonatémie réduite. Chronique, elle conduit à une hyperventilation qui réduit la PCO_2 et limite la diminution du pH plasmatique. Durant une acidose, l'électroneutralité du plasma est conservée, avec ou sans élévation de la chlorémie. Lorsque que l'acidose est normochlorémique, la charge acide excédentaire est couplée à un anion qui a remplacé les ions HCO_3^- plasmatiques consommés. C'est le cas lors des acidoses lactiques ou lors de l'acidocétose diabétique, dans lesquelles la lactatémie ou la cétonémie augmente. Une acidose hyperchlorémique est la conséquence d'une perte d'ions HCO_3^- d'origine digestive ou rénale ou d'une incapacité du néphron à s'adapter à une charge acide élevée. Causée par des diarrhées, l'acidose digestive s'accompagne d'une hypokaliémie et d'une ammoniurie élevée. Les acidoses tubulaires rénales (RTA) peuvent être acquises ou génétiques et d'origine distale (dRTA, type I), proximale (pRTA, type II) ou mixte (type III et IV). La dRTA se traduit par un défaut d'excrétion des protons par les Cl^- α : les formes familiales sont associées à des mutations inactivatrices d'AE1 ou de sous-unités de la pompe à proton distale (voir Section Introduction A.III.1). La pRTA est souvent accompagnée d'un syndrome de Fanconi (voir Section Introduction A.II.5.a) mais peut être "*isolée*", comme chez les patients porteurs de mutations inactivatrices du gène codant pour NBCe-1A, chez qui la réabsorption proximale des ions HCO_3^- est réduite. Elle se caractérise par un pH urinaire acide, une fuite urinaire d'ions HCO_3^- et une ammoniurie inappropriée (Lemann *et al.*, 2000; Magen *et al.*, 2010; Haque *et al.*, 2012; Elmonem *et al.*, 2016). Enfin, les RTA mixtes (proximales et distales) sont dues à l'invalidation génétique de l'ACII qui réduit la réabsorption des ions HCO_3^- filtrés (type III, composante du syndrome de Guibaud-Vainsel) ou à un hypoaldostérisme hyperkaliémique réduisant l'ammoniogenèse et la sécrétion distale d'ions H^+ (type IV) (Kraut & Madias, 2010; DuBose, 2012; Yaxley & Pirrone, 2016).

c. Le tubule proximal est une cible et un effecteur pharmacologique

Dans le TP, l'intrication des voies de réabsorption et de sécrétion des ions, des solutés ou de l'eau complique la mise au point d'un diurétique proximal capable d'augmenter la natriurèse sans provoquer de syndrome de Fanconi ou d'acidose d'origine proximale. Dans les traitements à long terme des hypertensions et insuffisances cardiaques, ce sont des diurétiques du néphron distal qui sont généralement prescrits (voir Section Introduction A.III.1).

À l'heure actuelle, seuls deux types de diurétiques proximaux sont employés. Les premiers sont des inhibiteurs de l'Anhydrase Carbonique II (ACII) tel l'Acétazolamide, des diurétiques modérés augmentant la fuite urinaire du bicarbonate (Chou *et al.*, 1977). Les seconds sont des inhibiteurs du cotransporteur Na^+ /glucose SGLT-2 tels que l'Empagliflozine. L'intérêt clinique pour ces derniers inhibiteurs est actuellement important: employés comme diurétiques favorisant la glycosurie, ils sont désormais prescrits dans le cadre du diabète de type 2. Les dernières données cliniques montrent qu'ils réduisent le pourcentage d'hémoglobine glyquée et la volémie, réduisant d'autant les risques cardiovasculaires liés au diabète. Leur effet diurétique en amont de la *Macula Densa* permettrait aussi de réduire la pression hydrostatique glomérulaire en affectant le rétrocontrôle tubulo-glomérulaire (voir Section Introduction A.III.2). Ce faisant, ils freinent la progression de la néphropathie diabétique. Ils mettent donc en avant l'intérêt des diurétiques proximaux (seuls ou combinés aux diurétiques distaux) dans le traitement des maladies rénales chroniques (Wanner *et al.*, 2016; Martens *et al.*, 2017).

Par ailleurs, les cellules du TP sont aussi impliquées dans la sécrétion de nombreux anions et cations organiques via leur transporteurs OAT, OATP ou OCT apicaux et basolatéraux très variés. Elles sont de fait responsable d'une partie de la clairance plasmatique (et de la pharmaco-cinétique) de nombreuses substances médicamenteuses, dont la metformine (anti-diabétique), le méthotrexate (anti-métabolite), le Furosémide et l'hydrochlorothiazide (voir Section Introduction A.III.1), le diclofénac (anti-inflammatoire), quelques antibiotiques et anti-rétroviraux. Ces dernières années, différents polymorphismes de ces transporteurs ont été clairement identifiés chez l'homme comme responsables de sensibilités ou de résistances à ces substances actives (Roth *et al.*, 2012; Nigam *et al.*, 2015). De manière intéressante, l'utilisation clinique des aminoglycosides est restreinte par leur accumulation dans les cellules proximales, qui dépend de leur endocytose par la Mégaline (Lopez-Novoa *et al.*, 2011). Posséder et conserver une bonne fonction rénale proximale est donc nécessaire à la prescription et à l'efficacité de nombreux médicaments.

III. Les segments distaux du néphron

En aval du TP se trouvent l'anse de Henle, le TCD puis le TCN, qui aboutit au niveau cortical dans un CC commun à une quinzaine de néphrons (voir Section Introduction A.I.1.b). L'anse forme le gradient cortico-papillaire que les segments suivants utilisent afin de concentrer l'urine primitive. Ils assurent également un bilan de l'excrétion urinaire du NaCl et de l'eau. Pour cela, leurs activités de transport, médiées par de très nombreuses protéines membranaires, sont finement régulées (Nielsen *et al.*, 2012).

1. Aperçu des principaux transports transépithéliaux du néphron distal

Les sections fines de l'anse de Henle permettent la réabsorption d'eau et la sécrétion d'urée, principal catabolite du métabolisme de l'azote et soluté urinaire le plus concentré. Cette urée provient des capillaires péri-tubulaires ainsi que de l'interstitium de la médulla interne où elle a été accumulée afin de contribuer à la constitution du gradient cortico-papillaire (Sands *et al.*, 2012; Westrick *et al.*, 2013; Dantzler *et al.*, 2014).

La BAL ne réabsorbe pas d'eau mais environ 25 % des ions Na^+ , Cl^- et Ca^{2+} filtrés ainsi que 60 % des ions Mg^{2+} et environ 15 % des ions K^+ et HCO_3^- filtrés. Comme indiqué précédemment, la BAL réabsorbe également les ions NH_4^+ issus de l'ammoniogénèse (voir Section Introduction A.II.4.b). Les réabsorptions sont effectuées par divers transporteurs, dont le cotransporteur apical $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ NKCC2 et par la voie paracellulaire [Voir Figure 8]. Une fraction conséquente du NaCl et des ions NH_4^+ réabsorbés s'accumulent dans l'interstitium médullaire, participant à son hyperosmolalité. L'inhibition pharmacologique de NKCC2 par un diurétique de l'anse (comme le Furosémide) bloque les réabsorptions de la BAL et permet de mimer les effets du syndrome de Bartter de type II (Mount, 2014).

Le TCD est subdivisé en 2 parties: "*initiale*" (TCD1) et "*terminale*" (TCD2). Dans l'ensemble, le TCD dilue l'ultrafiltrat car il y réabsorbe environ 5 % des ions Na^+ et Cl^- ainsi que 10 % des ions Ca^{2+} et Mg^{2+} filtrés. La réabsorption apicale du sodium est effectuée par le cotransporteur Na^+-Cl^- NCC, mais aussi par le canal ENaC dans le TCD2. Dans cette 2nde partie, plus le canal ENaC réabsorbe d'ions Na^+ , plus le TCD sécrète d'ions K^+ via le canal Kir1.1 et moins il réabsorbe d'ions Ca^{2+} via le canal TRPV5. Le TCD1 n'exprime pas TRPV5 mais exprime le canal TRPM6 réabsorbant des ions Mg^{2+} [Voir Figure 8]. Inhiber NCC par un diurétique thiazidique mime le "*Syndrome de Gitelman*" (Subramanya & Ellison, 2014).

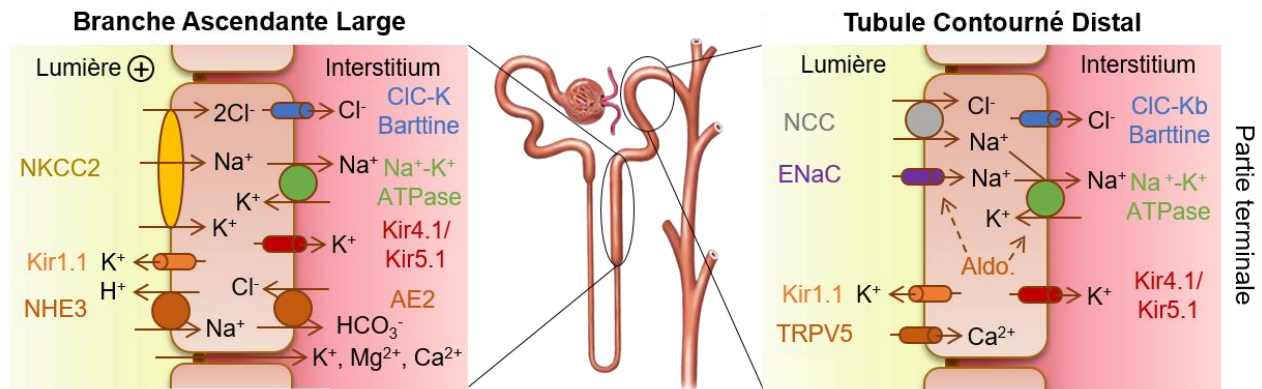


Figure 8: Principaux mécanismes de réabsorption de la branche ascendante large de l'anse de Henle et le tubule contourné distal (d'après Mount, 2014; Subramanya & Ellison, 2014)

Le TCN et le CC sont des épithéliums serrés constitués de différents types de cellules épithéliales: les "cellules principales" (majoritaires) et les "cellules intercalaires" (CI). Il existe au moins 3 types de cellules intercalaires: les CI- α (ou A), les CI- β (ou B) et les CI non-A non-B. La nature et le rôle des CI non-A non-B ne sont pas clairement définis et ne seront pas discutés. Les CI sont, en proportion des cellules principales, plus nombreuses dans la partie du CC située dans la médullaire externe que dans la partie située dans le cortex. Par ailleurs, la majorité des CI- α sont localisées du TCN au CC de la partie externe de la médulla externe alors que les CI- β , elles, sont plus présentes dans la partie interne de la médullaire externe (Pearce *et al.*, 2015; Roy *et al.*, 2015).

Dans l'ensemble, le CC réabsorbe par la voie transcellulaire ~ 3 % du NaCl filtré et 18 à 25 % de l'eau filtrée. La réabsorption du sodium est effectuée par les cellules principales, *via* le canal ENaC apical que l'on peut inhiber pharmacologiquement par l'Amiloride (ce qui mime le "pseudo-hypoaldostérisme de type I"). Comme le TCD, le CC cortical contribue à une sécrétion d'ions K⁺ dans la lumière tubulaire, qui est proportionnelle à l'activité de réabsorption du sodium dans le segment. Cependant la partie du CC située dans la médullaire externe sécrète des protons (en parallèle d'ions NH₃) *via* les H⁺-K⁺-ATPases présentes sur les CI: elle est en mesure de réabsorber de cette manière une proportion significative du potassium filtré (~ 6 %). La partie la plus interne du CC, quant à elle, réabsorbe de l'urée depuis la lumière tubulaire: elle s'accumule alors dans la médullaire interne. Enfin, les CI- β sont impliquées dans la réabsorption d'ions Cl⁻ par le CC et permettent une sécrétion d'ions HCO₃⁻ lors de l'adaptation à l'alcalose [Voir Figure 9]. La réabsorption passive de l'eau par des aquaporines est permise par la dilution du contenu luminal lors de son passage dans les segments précédents et la présence du gradient cortico-papillaire (Mount, 2012; Roy *et al.*, 2015).

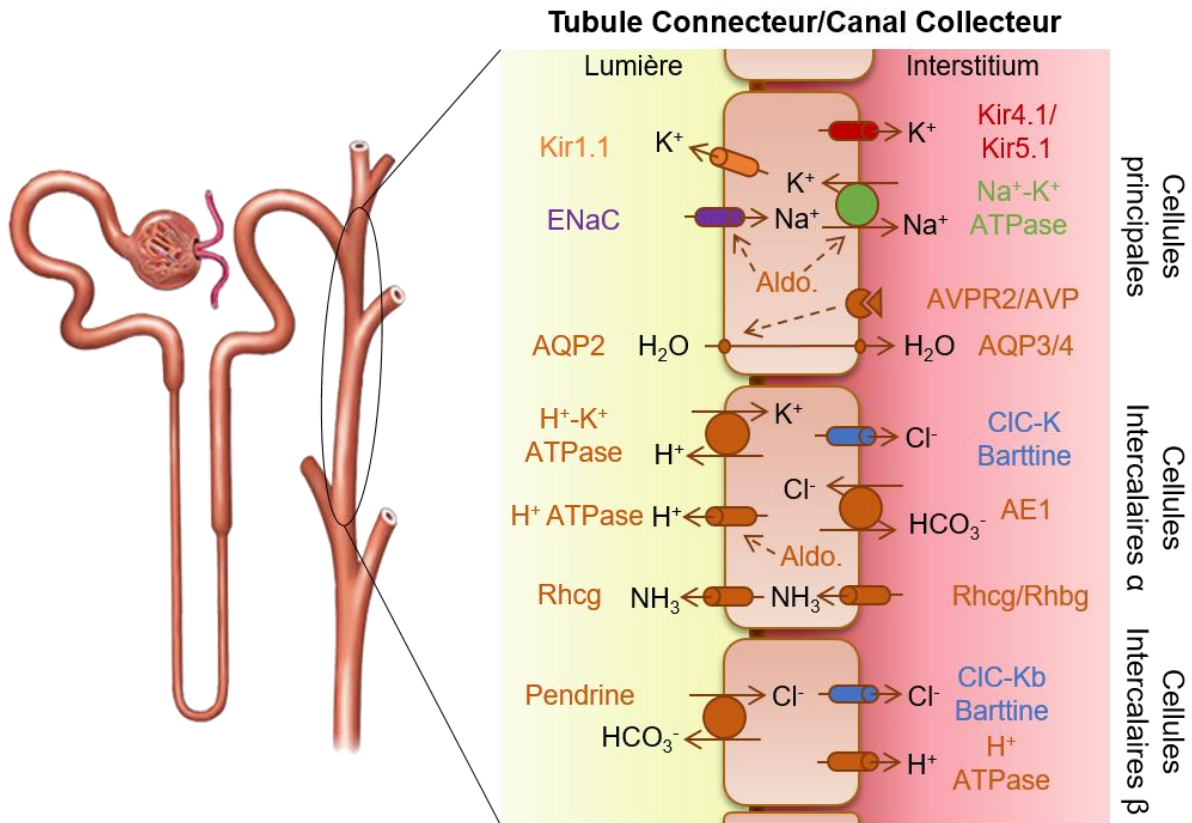


Figure 9: Principaux mécanismes de réabsorption des différents types cellulaires du tubule connecteur et du canal collecteur (d'après Roy et al., 2015; Pearce et al., 2015)

2. Régulations physiologiques des activités de transport du néphron distal

Les transports ioniques du néphron distal sont étroitement liés à la régulation du bilan de l'excrétion rénale de l'eau, du NaCl, du potassium et de la charge acide. Sont brièvement abordées plus loin les régulations: du DFG par la *Macula Densa*; de la natriurèse, la kaliurèse et du volume urinaire par l'aldostérone et la vasopressine; et de l'ENA distale par l'acidose.

La dernière portion de la BAL contient un groupe de cellules accolées au corpuscule rénal appelé la "*Macula Densa*" [Voir Figure 2]. La concentration intracellulaire en ions chlorure de ces cellules augmente parallèlement au DFG. Cela constitue un signal, certainement médié par l'adénosine, qui stimule l'appareil juxta-glomérulaire et la constriction de l'AA [Voir Figure 2]. Cette constriction réduit le débit sanguin rénal et la pression hydrostatique intra-glomérulaire, réduisant alors le DFG. L'ensemble, appelé le "*rétrocontrôle tubulo-glomérulaire*", permet de constamment coupler la détection de la charge filtrée en ions chlorure et le contrôle du DFG (Blantz & Pelayo, 1984; Lorenz et al., 1991; Ren et al., 2001; Peti-Peterdi & Harris, 2010).

Le bilan des réabsorptions réalisées par le CC est variable car il module la natriurèse et le volume urinaire: le volume urinaire est modulé à court terme par la quantité d'AQP2 adressée à la membrane apicale des cellules principales du néphron distal. Or, dans ces cellules, il existe une réserve sous-membranaire d'AQP2, mobilisée en surface lorsque l'hormone anti-diurétique "*Arginine-Vasopressine*" se fixe à ses récepteurs AVPR2 basolatéraux [Voir Figure 9]. L'Arginine-Vasopressine est sécrétée par l'hypophyse lors d'une augmentation supérieure à 1 % de l'osmolarité plasmatique (Brown & Fenton, 2012; Kwon *et al.*, 2013). Inhiber pharmacologiquement ce mécanisme est diurétique: cela mime un "*diabète insipide néphrogénique*", ce qui est utile au traitement des polykystoses rénales (Torres *et al.*, 2012).

En parallèle un système "*rénine-angiotensine-aldostérone*" (RAA) est activé lors d'une baisse forte du DFG (suite à une réduction du débit sanguin rénal et/ou de la volémie), elle-même perçue par la Macula Densa et des barorécepteurs situés au niveau des cellules mésangiales de l'appareil juxta-glomérulaire. Cette baisse stimule la sécrétion de rénine par les cellules à rénine [Voir Figure 2] qui permet alors la formation d'AngII. L'AngII contracte l'AE (ce qui stabilise le DFG) et stimule (comme l'hyperkaliémie) la synthèse de l'aldostérone par les glandes surrénales. Cette dernière hormone augmente en quelques jours la réabsorption du NaCl (et la sécrétion associée d'ions K^+) par le TCD2, le TCN et le CC *via* une augmentation de l'expression d'ENaC et de la $Na^+-K^+-ATPase$. La réabsorption distale du NaCl régule à long terme la quantité de sodium extracellulaire et *a fortiori* la volémie et la pression artérielle (Peti-Peterdi & Harris, 2010; Gilbert *et al.*, 2012; Pearce *et al.*, 2015). Ce système peut être inhibé par le spironolactone afin de traiter les maladies rénales chroniques (Martens *et al.*, 2017).

L'acidose affecte le néphron distal. Dans la BAL la réabsorption du bicarbonate et de l'ammonium est stimulée par l'acidose, *via* la surexpression de NHE3, AE2, NHE4 et NKCC2 (Laghmani *et al.*, 1997; Attmane-Elakeb *et al.*, 1998; Capasso *et al.*, 2002; Quentin *et al.*, 2004; Bourgeois *et al.*, 2010; Mount, 2014). Dans le TCN et le CC, l'acidose augmente le nombre de CI- α et y entraîne une surexpression des $H^+-ATPases$ et $H^+-K^+-ATPases$ apicales, des transporteurs Rhbg et Rhcg (par un phénomène post-transcriptionnel) et de l'échangeur AE1. En parallèle, les CI- β expriment moins de Pendrine et pourraient éventuellement excréter moins d'ions HCO_3^- (Seshadri *et al.*, 2006; Bishop *et al.*, 2010; Weiner & Verlander, 2013; Roy *et al.*, 2015; Pinelli *et al.*, 2016). L'ensemble, qui permet d'augmenter l'ENA serait dépendant de l'activation du système RAA, impliqué notamment dans la surexpression de la pompe $H^+-ATPase$ (Sebastian *et al.*, 1980; Schambelan *et al.*, 1987; Rothenberger *et al.*, 2007).

B. PREMIÈRE ÉTUDE: IMPLICATION DE LA PROTÉINE Kir4.2 DANS LA PHYSIOLOGIE RÉNALE

INTRODUCTION DE LA 1^{ÈRE} ÉTUDE

I. Les canaux potassiques Kir

1. Structure et phylogénie des canaux Kir

Les canaux Kir forment l'une des 5 grandes familles de canaux potassiques et sont présent dans tout l'arbre du vivant (Sun *et al.*, 2006; Lebaudy *et al.*, 2007; Hassinen *et al.*, 2008; Tompkins-Macdonald *et al.*, 2009; Gonzalez *et al.*, 2012; Mamidala *et al.*, 2013). Ils ont été identifiés *in vivo* dès les années 1950 grâce à leurs courants caractéristiques, mais leur parenté phylogénétique n'a été définie qu'après le clonage des premiers d'entre eux dans les années 1990 [Voir Figure 10] (Ho *et al.*, 1993; Kubo *et al.*, 1993; Hibino *et al.*, 2010).

Aujourd'hui chez l'Homme, 17 gènes appelés *KCNJ* ont été identifiés: le produit de chacun d'eux est une sous-unité Kir, constituant élémentaire des canaux Kir. La structure primaire d'une sous-unité Kir comprend deux extrémités N-terminale et C-terminale intracellulaires, entre lesquelles se trouvent deux domaines transmembranaires appelés TM1 et TM2. Ces deux domaines sont reliés entre eux par une boucle extracellulaire dans laquelle se situe une courte hélice α appelée H5. Selon leur degré d'identité moléculaire, les sous-unités Kir sont réparties dans 7 sous-familles numérotées de Kir1 à Kir7. Les canaux qu'elles forment sont eux classés en 4 groupes, chacun possédant des propriétés intrinsèques propres: les canaux Kir "de transport d'ions K^+ ", les canaux Kir dits "classiques", les canaux Kir "dépendants des petites protéines G" et les canaux Kir "sensibles à l'ATP" [Voir Figure 10] (Hibino *et al.*, 2010; Ryan *et al.*, 2010; Paninka *et al.*, 2016).

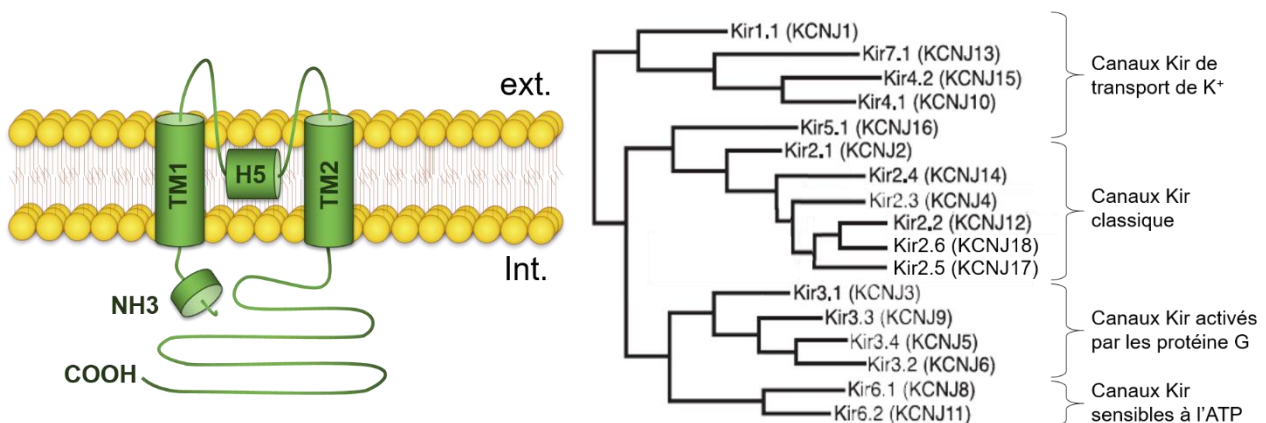


Figure 10: Schéma de la structure secondaire type (à gauche, d'après Hibino et al., 2010) et arbre phylogénétique (à droite, modifié depuis Hibino et al., 2010) des sous-unités Kir

Les gènes *KCNJ* répertoriés chez l'Homme sont des homologues, issus de duplications au cours de l'évolution des chordés (Tompkins-Macdonald *et al.*, 2009), partagés par l'ensemble des mammifères. C'est pourquoi les sous-unités Kir humaines possèdent des orthologues murines (*mus musculus*) dont elles sont très semblables: *KCNJ15* et *Kcnj15* ont des séquences codantes identiques à 86 % tandis que les protéines Kir4.2 qu'ils encodent, constituées de 375 résidus, sont identiques à 96 %. De même, *KCNJ16* et *Kcnj16* ont des séquences codantes identiques à 85 % et leurs protéines Kir5.1 respectives de 419 résidus sont identiques à 92 %.

Il existe également un pourcentage d'identité élevé entre les produits des gènes *KCNJ* d'une espèce (Sun *et al.*, 2006; Hassinen *et al.*, 2008; Hibino *et al.*, 2010; Mamidala *et al.*, 2013). En fait, jusqu'à récemment, *KCNJ17* et *KCNJ18* n'étaient pas reconnus comme des gènes car leurs séquences codantes présentent respectivement 95 % et 99 % d'identité avec celle de *KCNJ12*. Les sous-unités Kir2.5 et Kir2.6 étaient alors considérées comme des variants de Kir2.2 lui étant identiques à 96-99.9 % (Namba *et al.*, 1996; Ryan *et al.*, 2010; Paninka *et al.*, 2016). À titre de comparaison, au sein d'une sous-famille, les sous-unités Kir partagent généralement 60-70 % d'identité: c'est notamment le cas de la protéine Kir2.1 avec les autres Kir2.x ou des Kir6.x entre elles. De même, les séquences codantes humaines de *KCNJ10* et *KCNJ15* possèdent 69 % d'identité tandis que leurs protéines Kir4.1 et Kir4.2 sont à 64 % identiques. Entre sous-familles, les sous-unités Kir d'une espèce sont semblables à ~35-55 %. Ainsi chez l'homme Kir5.1 possède 39, 37, 39, 50 et 40 % d'identité avec Kir4.1, Kir4.2, Kir1.1, Kir2.1 et Kir3.1 respectivement. Kir7.1 possède une séquence assez différente des autres Kir et n'est qu'à 38 % identique à Kir4.2, sa sous-unité la plus proche (Hibino *et al.*, 2010).

Peu après leur clonage et leur expression hétérologue, il fut mis en évidence par des techniques biochimiques et de concaténation que l'association de 4 sous-unités Kir est nécessaire à la formation d'un canal Kir. L'association forme soit un homotétramère, composé de 4 sous-unités identiques, soit un hétérotétramère de 2 paires de sous-unités différentes (Glowatzki *et al.*, 1995; Inanobe *et al.*, 1995; Kofuji *et al.*, 1995; Krapivinsky *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 1995; Pessia *et al.*, 1996; Raab-Graham & Vandenberg, 1998). La cristallographie a ensuite déterminé la conformation tri-dimensionnelle de Kir issus de bactéries, puis d'autres espèces, dont la souris et l'Homme. Cette technique confirma la structure secondaire des sous-unités Kir, leur association en tétramère et mit en évidence une structure tertiaire très conservée [Voir Figure 11] (Nishida & MacKinnon, 2002; Kuo *et al.*, 2003; Pegan *et al.*, 2005; Nishida *et al.*, 2007; Tao *et al.*, 2009; Whorton & MacKinnon, 2011; Whorton & MacKinnon, 2013).

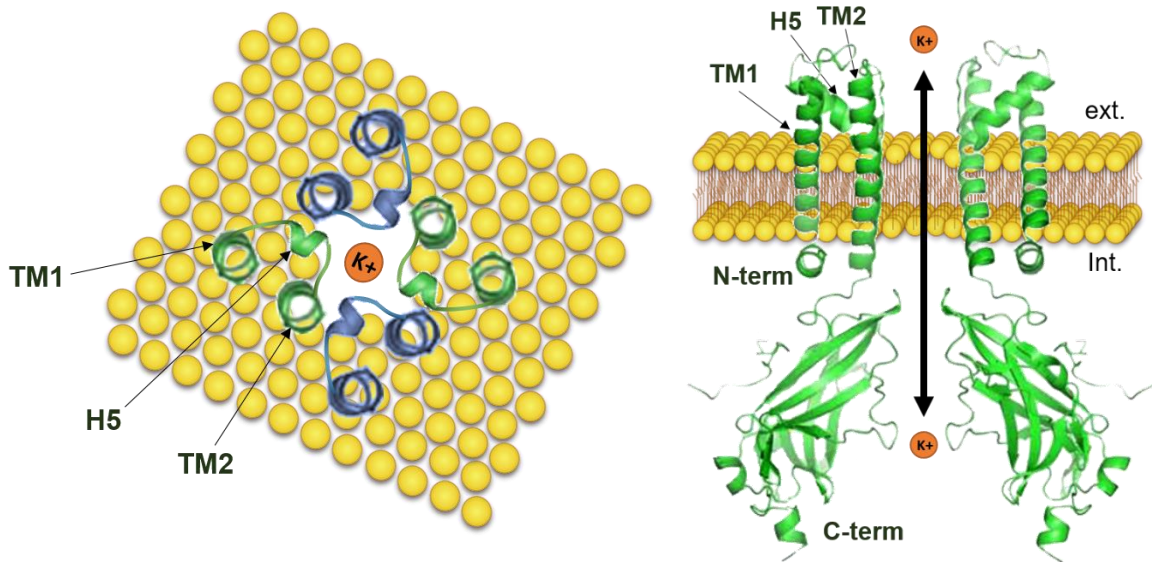


Figure 11: Schéma d'un hétérotétramère Kir vu de l'extérieur (à gauche, d'après Nishida et al., 2007) et structure des sous-unités Kir (à droite, modifié d'après Hibino et al., 2010)

Les 4 sous-unités d'un canal Kir s'agencent de telle manière que leurs domaines TM2 et leurs boucles H5 sont proches du pore du canal alors que leurs domaines TM1 en sont éloignés. Les extrémités C-terminale et N-terminale de chaque sous-unité s'assemblent du côté cytoplasmique et les 4 structures cytoplasmiques qui en résultent forment un cylindre dans lequel les ions circulent. Dans un hétérotétramère, les 2 sous-unités Kir différentes s'alternent [Voir Figure 11] (Pessia et al., 1996; Nishida et al., 2007; Tao et al., 2009). La sélectivité du pore aux ions K^+ est assurée par une séquence T-X-G-Y-G située peu après l'hélice α H5 dans la boucle extracellulaire (Hibino et al., 2010; Ryan et al., 2010).

2. Propriétés électrophysiologiques et régulations des canaux Kir

a. Propriétés et régulations générales des canaux Kir

L'"activité" de transport ionique d'un canal dépend à la fois de son environnement (gradient électrochimique transmembranaire de l'ion transporté, différences de potentiel transmembranaire et transépithéliale) et de ses propriétés intrinsèques qui lui sont conférées par sa structure primaire et tri-dimensionnelle. Dans son ensemble, cette activité ou "conductance globale" (G) dépend de trois paramètres, selon la formule $G = g \times P_o \times N$. La probabilité d'ouverture du canal est appelée P_o , le nombre de canaux actifs à la membrane est appelé N et la capacité du canal à faire passer les ions (ou "conductance unitaire") est appelée g .

Les trois paramètres énoncés précédemment varient en fonction de l'expression membranaire de la protéine concernée et de ses propriétés électrophysiologiques. L'ensemble dépend de paramètres physiques, chimiques ou d'associations de la protéine avec d'autres molécules (on parle de "*gating*"). Dans les faits, l'activité de tous les canaux Kir est régulée par 4 grands paramètres.

Premièrement, toutes les propriétés d'un canal Kir dépendent de son identité, c'est à dire des sous-unités qui le composent. Or, il est généralement vrai que les sous-unités Kir d'une même sous-famille sont capables de s'associer en hétérotétramère (Preisig-Muller *et al.*, 2002; Hibino *et al.*, 2010). De fait, il a été montré que l'association des sous-unités Kir2.1 et Kir2.2, formant un canal appelé Kir2.1/Kir2.2, n'a pas les mêmes propriétés qu'un canal homotétramérique Kir2.1. Deuxièmement, l'activité des canaux Kir nécessite la présence constante du phospholipide membranaire phosphatidyl-inositol 4,5, bisphosphate (PIP₂), qui se lie à la partie C-terminale des sous-unités Kir (Hilgemann & Ball, 1996; Huang *et al.*, 1998; Hibino *et al.*, 2010; Whorton & MacKinnon, 2013). Troisièmement, la conductance globale des canaux Kir (excepté Kir7.1) est proportionnelle à la concentration extracellulaire en ions K⁺. Lorsque cette concentration augmente, les canaux Kir présentent une activité semblable à celle de canaux possédant plusieurs pores. Ce phénomène serait lié à la présence de plusieurs sites de fixation des ions K⁺ dans leur filtre de sélectivité (Makhina *et al.*, 1994; Perier *et al.*, 1994; Lopatin & Nichols, 1996; Doyle *et al.*, 1998; Krapivinsky *et al.*, 1998; Hibino *et al.*, 2010). Quatrièmement, la sortie d'ions K⁺ par les canaux Kir est réduite par les ions Mg²⁺ et les polyamines intracellulaires. Lors de la sortie d'ions K⁺ par le canal et la dépolarisation cellulaire (lorsque le potentiel membranaire V_m est supérieur au potentiel d'équilibre de l'ion K⁺ "*E_K*") des ions Mg²⁺ entrent rapidement dans le pore puis y sont rejoints par des polyamines. L'inverse se produit durant l'entrée d'ions K⁺ par le canal, lors de l'hyperpolarisation ou la repolarisation cellulaire (Lopatin *et al.*, 1994; Lopatin *et al.*, 1995; Hibino *et al.*, 2010; Hsieh *et al.*, 2016).

L'ensemble donne aux canaux Kir une conductance sortante faible mais la possibilité d'avoir une conductance entrante élevée. Cette propriété qui leur est caractéristique est à l'origine de leur nom de "*canaux potassiques à rectification entrante*" ou "*K⁺ inwardly rectifying*" (Kir) [Voir Figure 12]. Par ailleurs, les canaux Kir sont inhibés par la présence de faibles concentrations extracellulaires d'ions Ba²⁺ (Hibino *et al.*, 2010).

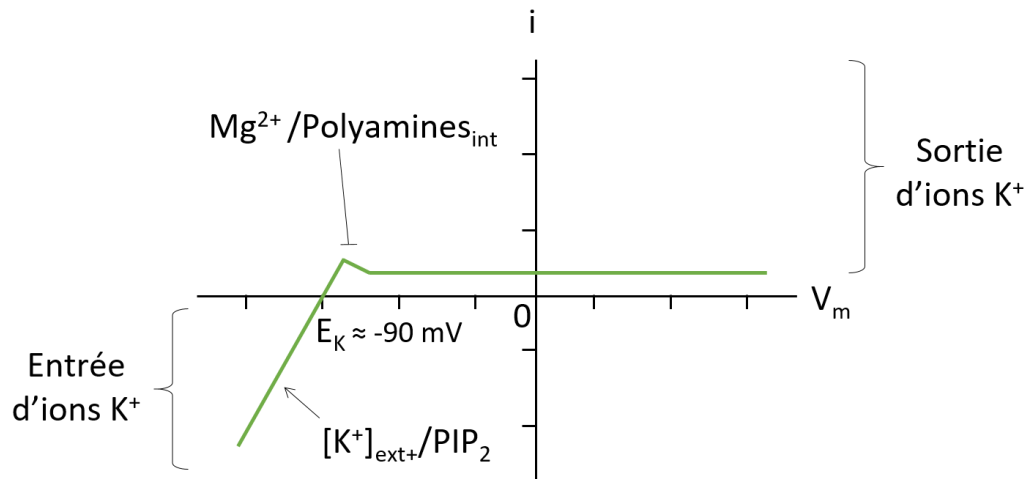


Figure 12: Schéma de l'allure des courants rectifiants entrants des canaux Kir en fonction du potentiel membranaire et leurs régulateurs principaux (d'après Hibino et al., 2010)

b. Règles particulières d'assemblage en tétramère des sous-unités Kir

In vitro, les sous-unités d'une sous-famille Kir peuvent former des hétérotétramères fonctionnels. Toutefois, Kir2.5 dispose d'un acide aminé inhabituel dans son filtre de sélectivité, qui le rend imperméable aux ions K⁺. En conséquence, son homotétramère et l'hétérotétramère Kir2.5/Kir2.2 ne sont pas fonctionnels (Namba *et al.*, 1996; Ryan *et al.*, 2010). De la même façon, Kir5.1 n'est pas capable de former seule un canal Kir fonctionnel. Elle pourrait y parvenir en s'associant à une protéine appelée PSD-95 (Pessia *et al.*, 1996; Pearson *et al.*, 1999; Tanemoto *et al.*, 2002). Bien que des doutes persistent, les sous-unités Kir3.1 et Kir6.1 ne seraient fonctionnelles qu'en hétérotétramères avec les autres sous-unités de leur sous-familles respectives (Krapivinsky *et al.*, 1995; Seharaseyon *et al.*, 2000; Pountney *et al.*, 2001; Hibino *et al.*, 2010). Les hétérotétramères de Kir6.x ne sont, de plus, fonctionnels que couplés à 4 protéines régulatrices (ou sous-unités) appelées SUR (Inagaki *et al.*, 1995; Inagaki *et al.*, 1996). Peu après son clonage, Kir4.2 semblait également n'être pas ou peu actif en homotétramère ou en hétérotétramère avec Kir4.1 (Shuck *et al.*, 1997; Derst *et al.*, 1998), mais les études ultérieures ont permis de montrer que ses courants étaient faibles mais significatifs en homotétramère et conséquents en hétérotétramère Kir4.2/Kir5.1 (Pearson *et al.*, 1999; Pessia *et al.*, 2001; Lam *et al.*, 2006; Edvinsson *et al.*, 2011). Ce dernier fait souligne que certains canaux Kir sont formés par association de sous-unités Kir de sous-familles différentes. Ainsi, Kir5.1 entre dans la composition d'hétérotétramères fonctionnels avec Kir4.1 ou Kir4.2 (Pearson *et al.*, 1999; Tucker *et al.*, 2000; Pessia *et al.*, 2001; Lam *et al.*, 2006) et s'assemble *in vitro* à Kir2.1 (Derst *et al.*, 2001b). Des canaux formés *in vitro* par concaténation de Kir1.1 avec Kir4.1, Kir4.2 ou Kir2.1 seraient également fonctionnels (Fakler *et al.*, 1996; Derst *et al.*, 1998).

c. Régulation de l'expression membranaire des canaux Kir

L'expression membranaire d'une protéine résulte à la fois de son adressage selon l'axe réticulum endoplasmique (RE)/appareil de Golgi/vésicules de sécrétion et de son endocytose vers la voie lysosomale. Ces 2 étapes sont pré-déterminées par l'existence sur la protéine de signaux peptidiques d'adressage et régulées par des modifications post-traductionnelles (clivage de peptide signal, N-glycosylation, phosphorylation, ubiquitinylation). Les déterminants de l'expression membranaire des canaux Kir ont été très étudiés durant les années 2000.

Les sous-unités Kir possèdent généralement un signal peptidique de sortie du RE vers l'appareil de Golgi, localisé dans l'extrémité C-terminale (Kir2.x, Kir1.1) ou N-terminale de la protéine (Kir3.x, sauf Kir3.3) et parfois d'un signal de sortie de l'appareil de Golgi à l'extrémité N-terminale (Kir2.x) (Ma *et al.*, 2001; Stockklauser *et al.*, 2001; Stockklauser & Klocker, 2003; Hofherr *et al.*, 2005). Les sous-unités Kir2.x et Kir3.x possèdent aussi un signal C-terminal d'adressage vers la membrane plasmique depuis les endosomes précoces (Ma *et al.*, 2002). À l'inverse, un signal de rétention dans le RE est situé à l'extrémité C-terminale des sous-unités Kir6.x, SUR, Kir4.2, Kir5.1 et Kir1.1 et à l'extrémité N-terminale de Kir7.1 (Tucker *et al.*, 1997; Zerangue *et al.*, 1999; Tanemoto *et al.*, 2002; O'Connell *et al.*, 2005; Pearson *et al.*, 2006; Kumar & Pattnaik, 2014). Certaines sous-unités ont enfin des motifs d'internalisation par endocytose (Kir1.1, Kir4.2, Kir7.1 et Kir3.2) ou d'adressage aux lysosomes (Kir3.3) (Ma *et al.*, 2002; Pearson *et al.*, 2006; Kumar & Pattnaik, 2014; Welling, 2016).

L'impact de ces signaux d'adressage varie d'un canal Kir à l'autre (Ma *et al.*, 2002; Tanemoto *et al.*, 2002; Hofherr *et al.*, 2005; Hibino *et al.*, 2010). Ainsi l'assemblage en octamère des sous-unités Kir6.x et SUR masque leurs 8 peptides de rétention dans le RE et permet leur adressage (Tucker *et al.*, 1997; Zerangue *et al.*, 1999). À l'inverse, les sous-unités Kir3.1 et Kir3.3 étant, seules, exprimées dans le RE, une fois co-exprimées avec Kir3.2 ou Kir3.4 elles forment des hétérotétramères moins membranaires et moins actifs que les homotétramères Kir3.2 ou Kir3.4 (Kofuji *et al.*, 1995; Ma *et al.*, 2002). De manière intéressante, les courants modestes générés par l'homotétramère Kir4.2 sont attribués à sa faible insertion membranaire, qui serait indépendante de la présence de ses signaux d'adressage (Derst *et al.*, 1998; Pearson *et al.*, 2006). Une fois associée avec Kir5.1 dont l'homotétramère est pourtant retenu dans le RE, Kir4.2 forme un hétérotétramère plus actif (voir Section Introduction B.I.2.d) (Pessia *et al.*, 2001; Tanemoto *et al.*, 2002; Lam *et al.*, 2006; Edvinsson *et al.*, 2011). Tous ces éléments tendent à montrer que la tétramérisation des sous-unités Kir a lieu dans le RE.

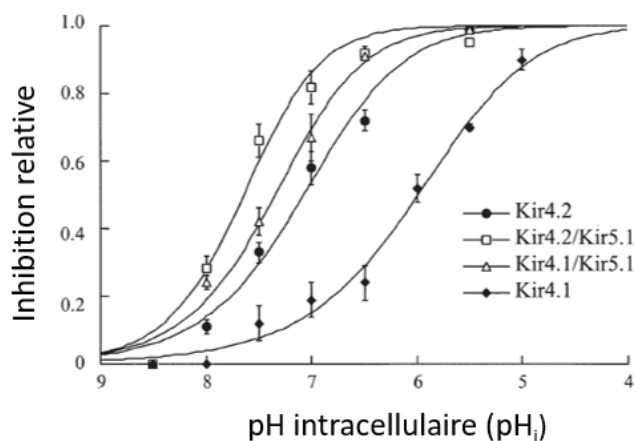
Généralement, le processus d'adressage des protéines membranaires comprend une étape post-traductionnelle de N-glycosylation. Cette maturation se fait en deux temps: dans le RE, des oligosaccharides riches en mannoses sont ajoutés sur certains résidus, ce qui permet aux protéines chaperonnes du RE comme la calnexine de donner une conformation adéquate à la protéine. À l'arrivée de la protéine dans l'appareil de Golgi, les mannoses de cette "*core-glycosylation*" sont remplacés par une "*glycosylation complexe*" constituée de galactose, d'acide N-acetylneuraminique et de fucose, nécessaire à l'adressage ou la fonction protéique [voir Figure 19] (Ellgaard & Helenius, 2003; Nettleship *et al.*, 2012). C'est pourquoi la plupart des canaux Kir, notamment Kir1.1, Kir2.1, Kir3.1 et les sous-unités régulatrices SUR, présentent des degrés de N-glycosylation reflétant leur degré d'adressage à la membrane plasmique (Pabon *et al.*, 2000; Conti *et al.*, 2002; Fang *et al.*, 2010; Ma *et al.*, 2011; Wade *et al.*, 2011). Les sous-unités Kir4.1 et Kir4.2 sont également N-glycosylées, mais pas la sous-unité Kir5.1 avec laquelle elles s'associent (Hibino *et al.*, 2004a; Hibino *et al.*, 2004b; Lachheb *et al.*, 2008).

L'expression membranaire de certains canaux Kir est également régulée par phosphorylation de leurs résidus par des kinases. Ainsi, l'expression membranaire des canaux Kir3.x et Kir2.x est partiellement assurée par la présence et la phosphorylation de domaines cibles de la PKA, d'OSR1 ou de SPAK (Zhu *et al.*, 1999; Dart & Leyland, 2001; Zitron *et al.*, 2004; Chung *et al.*, 2009; Fezai *et al.*, 2015). Inversement, le canal Kir4.2 est plus présent à la membrane lorsque lui est enlevé un site de phosphorylation putatif de la kinase c-src (à l'extrémité C-terminale) et ses courants sont inhibés par la PKC (Pearson *et al.*, 1999; Pearson *et al.*, 2006). De même, la sortie de Kir4.1 du RE, qui permet son adressage à la membrane basolatérale des cellules, semble permise par l'association d'un domaine PDZ de son extrémité C-terminale avec la protéine MAGI-1a. Cette interaction est inhibée par la phosphorylation, *via* la PKA, de la sérine 377 de Kir4.1. Kir4.2 possède également un tel site PDZ à son extrémité C-terminale, mais son rôle est inconnu (Tanemoto *et al.*, 2005; Tanemoto *et al.*, 2008; Hibino *et al.*, 2010). L'exemple le plus étudié de régulation d'un canal Kir par la phosphorylation concerne Kir1.1: sa phosphorylation en position S44 par la PKA ou la SGK-1 masque son signal de rétention dans le RE et augmente son expression membranaire (Yoo *et al.*, 2003; O'Connell *et al.*, 2005). Au contraire, la phosphorylation de Kir1.1 par la PKC réduit l'expression membranaire de Kir1.1 (Wang & Giebisch, 1991). Enfin, l'expression membranaire de Kir1.1 est moins élevée en présence des kinases WNK1, WNK3 et WNK4: la première phosphoryle Kir1.1 tandis que les deux autres favorisent son internalisation par interaction avec ses motifs C-terminaux d'endocytose (Kahle *et al.*, 2003; Wade *et al.*, 2006; Welling, 2016).

d. Régulations des propriétés électrophysiologiques des canaux Kir

La P_o est un paramètre variable, qui dépend chez les canaux Kir de la mobilité du domaine TM2 capable de se plier au niveau de "résidus charnières". Certains canaux Kir constitutivement actifs ont une P_o élevée (Kir2.x, Kir6.x, Kir1.1, Kir4.1/Kir5.1 et Kir4.2) tandis que les canaux Kir3.x sont constitutivement inactifs. Ces derniers sont dits "*activés par les protéines G*" car leur ouverture est conditionnée par la fixation de protéines $G_{\beta\gamma}$, libérée des récepteurs auxquelles elles sont couplées lors de l'activation de ceux-ci. A l'inverse, les canaux Kir6.x sont dits "*sensibles à l'ATP*" car une augmentation de la quantité d'ATP intracellulaire diminue leur P_o (Hibino *et al.*, 2010; Luscher & Slesinger, 2010; Shi *et al.*, 2012). Il est également notable que la PKA augmente la P_o de Kir1.1 en le phosphorylant (MacGregor *et al.*, 1998) et que l'association de Kir4.2 ou Kir4.1 avec Kir5.1 modifie leurs P_o et leurs conductances unitaires (g) respectives [Voir Figure 13] (Pessia *et al.*, 2001; Paulais *et al.*, 2011).

Certains canaux Kir sont également sensible au pH, du fait entre autres, de l'existence de liaisons hydrogènes entre leurs domaines TM1 et TM2 (Rapedius *et al.*, 2007). Ainsi, les canaux Kir2.1, Kir2.3, Kir2.4, Kir7.1, Kir1.1, Kir4.x et Kir4.x/Kir5.1 sont inhibés par les ions H^+ intracellulaires (pH_i) [Voir Figure 14] et les canaux Kir2.3, Kir2.4 et Kir7.1 sont inhibés par les ions H^+ extracellulaires (Coulter *et al.*, 1995; Krapivinsky *et al.*, 1998; McNicholas *et al.*, 1998; Hughes *et al.*, 2000; Pessia *et al.*, 2001). Enfin, les canaux Kir peuvent être fortement (Kir2.x et Kir3.x), moyennement (Kir4.x) ou peu rectifiants (Kir1.1 et Kir6.x) selon le degré d'affinité de leur pores et domaines TM2 pour les ions Mg^{2+} . L'association de Kir4.2 ou Kir4.1 avec Kir5.1 augmente leur sensibilité aux ions Mg^{2+} et aux protons (Hibino *et al.*, 2010).



	g (pS)	P_o	pK_H
Kir5.1	Intracellulaire		
Kir4.1	25	0.3	6.0
Kir4.1/5.1	45	0.7	7.1
Kir4.2	25	0.9	7.5
Kir4.2/5.1	55	0.3	7.6

*Figure 13: Courbes d'inhibition par le pH_i (gauche, depuis Pessia *et al.*, 2001) et propriétés des canaux Kir4.x et Kir4.x/Kir5.1 (droite, d'après Pessia *et al.*, 2001; Paulais *et al.*, 2011)*

II. Rôles physiologiques et physiopathologiques des canaux Kir

1. Principales fonctions extra-rénales des canaux Kir

Les canaux Kir sont exprimés dans de nombreux tissus et y possèdent des fonctions multiples. Initialement, leurs courants rectifiants entrants ont été considérés comme des anomalies: contrairement aux canaux potassiques K_v , ils ne sont pas activés mais inactivés aux potentiels positifs et ne contribueraient donc pas à la repolarisation lors du potentiel d'action (Katz, 1949; Hibino *et al.*, 2010). En réalité, les canaux Kir participent à la fois au contrôle du potentiel membranaire de repos et au maintien de l'excitabilité cellulaire. Leurs altérations génétiques sont donc les causes de nombreuses pathologies [Voir Tableau 1].

a. Rôles des canaux Kir dans la modulation du potentiel de repos

Les canaux Kir contribuent au maintien du potentiel de membrane: au potentiel de repos d'une cellule, ils font sortir de la cellule les ions K^+ entrés par les pompes $3Na^+/2K^+$ -ATPases. Ce recyclage des ions K^+ vers le compartiment extracellulaire évite l'accumulation intracellulaire d'ions K^+ . L'importance d'un tel couplage canal Kir/pompe Na^+/K^+ -ATPase est bien illustré par le rôle des canaux Kir4.1/Kir5.1 dans la fonction rénale (voir Section Introduction B.II.2.c). Dans les cellules β -pancréatiques, la modulation du potentiel de membrane par l'octamère Kir6.2/SUR1 revêt également une importance majeure: lors d'une augmentation de la glycémie, du glucose entre dans les cellules β -pancréatiques et induit la production d'ATP. De fait, l'augmentation de la concentration intracellulaire d'ATP inhibe les canaux Kir6.2/SUR1 habituellement actifs. Leur fermeture provoque une dépolarisation suffisante pour stimuler des canaux calciques, qui font entrer des ions Ca^{2+} dans la cellule et provoquent à leur tour la fusion de vésicules d'insuline avec la membrane plasmique (Fu *et al.*, 2013). C'est pourquoi une mutation inactivatrice de Kir6.2 ou de SUR1 réduit la sécrétion d'insuline et provoque un "*diabète néonatal permanent*", tandis qu'une mutation inactivatrice de Kir6.2 ou de SUR1 provoque une "*hyperinsulinémie néonatale hypoglycémiante persistante*" [Voir Tableau 1] (Thomas *et al.*, 1995; Thomas *et al.*, 1996; Koster *et al.*, 2000; Gloyn *et al.*, 2004; Babenko *et al.*, 2006). Par ailleurs, une mutation singulière du filtre de sélectivité de Kir3.4 peut le rendre perméable au sodium. Un tel canal Kir, exprimé dans les cellules de la glande surrénales, y provoque une dépolarisation constitutive qui aboutit à un syndrome d'"*hyperaldostérisme primaire*" [Voir Tableau 1] (Choi *et al.*, 2011).

b. Rôles des canaux Kir dans le maintien de l'excitabilité cellulaire

L'inactivation des canaux Kir aux potentiels membranaires positifs limite l'efflux d'ions K^+ de la cellule lors des phases de dépolarisation. Cela permet d'assurer un pic de dépolarisation élevé et une phase de plateau à un potentiel d'action. Lors de la repolarisation des cellules, les canaux K_v s'ouvrent: la sortie d'ions K^+ des cellules diminue assez le potentiel de membrane pour réduire l'affinité des ions Mg^{2+} avec les canaux Kir. La conductance sortante de ces derniers augmentant, ils contribuent à la fin de l'étape de repolarisation. C'est pourquoi l'inactivation génétique du gène encodant Kir2.1, sous-unité très présente dans les cardiomyocytes, provoque le syndrome d'Andersen caractérisé par un allongement de l'intervalle QT cardiaque. Inversement, une mutation activatrice de Kir2.1 raccourcit cet intervalle QT [Voir Tableau 1] (Plaster *et al.*, 2001; Priori *et al.*, 2005).

Par ailleurs, certains canaux Kir grâce à leur grande conductance potassique entrante stimulée par la concentration extracellulaire en ions K^+ , sont indirectement responsables de l'excitabilité neuronale. En effet, exprimés dans les cellules gliales associées aux neurones, ils permettent de récupérer puis de répartir la grande quantité de potassium extracellulaire qui s'accumule autour des neurones après leur repolarisation (Hibino *et al.*, 2010). Les canaux Kir les plus impliqués dans ce phénomène de " K^+ buffering" sont les canaux Kir4.1 et Kir4.1/Kir5.1, très exprimés dans les astrocytes du cortex cérébral et les cellules de Müller rétiniennes: chez l'homme, la disparition de Kir4.1 provoque un syndrome appelé *SeSAME* ("Seizures, sensorineural deafness, ataxia, mental retardation and electrolyte imbalance") comprenant une épilepsie, un retard mental, une surdité neuro-sensorielle et un phénotype rénal (voir Section Introduction B.II.2.c). L'altération du système nerveux central serait liée à une dépolarisation constante des neurones, qui subissent une entrée de potassium excessive. Chez la souris invalidée pour le gène encodant Kir4.1, ce syndrome est reproduit et s'accompagne d'une disparition de certains potentiels évoqués visuels liés aux transports rétiens du potassium extracellulaire (Higashi *et al.*, 2001; Ishii *et al.*, 2003; Neusch *et al.*, 2006; Bockenhauer *et al.*, 2009; Scholl *et al.*, 2009). L'homotétramère Kir4.1 est également exprimé dans les membranes apicales des cellules intermédiaires de la cochlée. De fait, la surdité neuro-sensorielle du syndrome *SeSAME* est expliquée par l'incapacité des cellules intermédiaires à fournir aux cellules de la *stria vascularis* des ions K^+ à accumuler dans l'endolymphe, causant une disparition du potentiel endocochléaire (Hibino *et al.*, 1997; Marcus *et al.*, 2002; Nin *et al.*, 2008).

c. Rôles des canaux Kir dans les cellules sensibles au pH

Certains canaux Kir, inhibés par les protons intracellulaires, jouent un rôle de capteur de pH. Ce phénomène a clairement été mis en évidence dans les neurones du *locus caeruleus*, nécessaires à l'augmentation de la fréquence respiratoire durant l'acidose (voir Section Introduction A.II.4). Très tôt, l'implication de courants rectifiants entrants dans ce phénomène a été établie (Pineda & Aghajanian, 1997). Peu après, l'hypothèse que cette sensibilité soit sous-tendue par l'expression des sous-unités Kir4.1 et Kir5.1 dans le système nerveux central est apparue (Xu *et al.*, 2000). Il a finalement été montré que la diminution du pH intracellulaire des neurones du *locus caeruleus* durant l'hypercapnie provoque la fermeture d'un hétérotétramère Kir4.1/Kir5.1 constitutivement actif. Cette fermeture s'accompagne d'une dépolarisation légère des neurones et augmente leur fréquence de production d'un potentiel d'action. En conséquence, la fréquence respiratoire augmente, ce qui diminue la PCO_2 et fait remonter le pH extracellulaire à sa valeur physiologique (D'Adamo *et al.*, 2011).

De façon intéressante, bien que Kir4.1 soit capable de former un homotétramère fonctionnel et que d'autres sous-unités Kir y soient exprimées, la sensibilité au pH des neurones du *locus caeruleus* requiert la présence de Kir5.1: chez les souris invalidées pour le gène *Kcnj16* encodant Kir5.1, ces neurones ne répondent plus à l'hypercapnie. Pour cause, le canal Kir4.1 est peu sensible au pH intracellulaire lorsque celui-ci est physiologique (pK_H : 6.0), alors que le canal Kir4.1/Kir5.1 y est très sensible (pK_H : 7.1) [Voir Figure 13] (D'Adamo *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011). Récemment, la possibilité que Kir5.1 confère leur sensibilité au pH intracellulaire à d'autres neurones a été évoquée (Puissant *et al.*, 2017).

Dans les cellules gliales la sensibilité au pH_i du canal Kir4.1/Kir5.1 pourrait également s'avérer nécessaire: elle permettrait de stimuler l'activité de " K^+ buffering" lors d'une augmentation de la concentration extracellulaire en ions K^+ (voir Section Introduction B.II.1.b). En effet, une telle augmentation, en dépolarisant les cellules gliales, pourrait augmenter l'activité de leurs cotransporteurs électrogéniques $Na^+/3HCO_3^-$, ce qui alcaliniserait leur cytoplasme et activerait leurs canaux Kir4.1/Kir5.1 (Ishii *et al.*, 2003; Hibino *et al.*, 2010).

Enfin, il a été récemment rapporté que la sensibilité des papilles gustatives au goût acide est liée à la modulation par le pH intracellulaire de l'activité du canal Kir2.1 exprimé dans l'épithélium lingual (Ye *et al.*, 2016).

d. Expression et fonctions hypothétiques de Kir4.2 et Kir5.1

La plupart des sous-unités Kir sont reconnues porteuses de fonctions physiologiques, mises en évidence par l'étude de modèles animaux génétiquement modifiés. Pourtant certaines ne sont pas reliées à une pathologie humaine: leurs fonctions sont souvent redondantes avec celles d'autres sous-unités (Torrecilla *et al.*, 2002; Zobel *et al.*, 2003; Fang *et al.*, 2005). Mais le rôle physiologique de quelques sous-unités Kir est inconnu car aucun modèle animal d'inactivation de leur gène n'a été étudié: c'est le cas de Kir2.3 et Kir2.4, exprimées dans le cœur ou le système nerveux central, de la sous-unité Kir2.5 récemment identifiée comme une sous-unité à part entière (voir Section Introduction B.I.1) et de Kir4.2 (Hibino *et al.*, 2010).

Le profil d'expression de Kir4.2 est encore incertain. Chez l'homme, la souris ou le rat, de nombreux tissus ont été testés par différentes équipes et méthodes pour évaluer la présence de Kir4.2 ou de son ARNm. Dans l'ensemble, il ressort que Kir4.2 est exprimée dans le cortex rénal et pourrait être dans les cellules β -pancréatiques, les cellules pariétales de l'estomac, l'épithélium pulmonaire, l'intestin, le cœur, les leucocytes, le cerveau et le foie. Toutefois, pour ces derniers les résultats sont parfois variables ou contradictoires (Gosset *et al.*, 1997; Ohira *et al.*, 1997; Shuck *et al.*, 1997; Pearson *et al.*, 1999; Thiery *et al.*, 2000; Hibino *et al.*, 2004a; Hibino *et al.*, 2004b; Yang *et al.*, 2008; He *et al.*, 2011; Okamoto *et al.*, 2012; Yuan *et al.*, 2015). Il est intéressant de constater que dans le néphron humain, l'ARNm de Kir4.2 est seulement présent dans le TP alors qu'il a été identifié une fois dans le TCD de souris (Lourdel *et al.*, 2002; Chabardes-Garonne *et al.*, 2003). Étonnamment, bien que Kir4.2 soit très sensible au pH intracellulaire physiologique (pK_H : 7.5), elle n'est pas exprimée dans le *locus caeruleus* ou certains neurones sensibles au pH (Pessia *et al.*, 2001; Puissant *et al.*, 2017).

La sous-unité Kir4.2 peut former un homotétramère fonctionnel, mais probablement peu exprimé à la membrane plasmique (voir Section Introduction B.I.2.c), ou un hétérotétramère fonctionnel, avec la sous-unité Kir5.1 (voir Section Introduction B.I.2.b). Or, en dehors du système nerveux central et du néphron distal où elle est associée à Kir4.1 (voir Section Introductions B.II.1 et B.II.2.c), Kir5.1 est exprimée dans le pancréas et les fibrocytes du ligament spiral de l'oreille interne (Pessia *et al.*, 2001; Hibino *et al.*, 2004b) et pourrait être présente dans le TP (Tucker *et al.*, 2000; Derst *et al.*, 2001b). Dans le ligament spiral, Kir5.1 est seule dans le compartiment intracellulaire et son rôle est incertain (Pan *et al.*, 2016). Kir5.1 est peut-être également exprimée dans l'estomac (Fujita *et al.*, 2002; He *et al.*, 2011) mais n'est vraisemblablement pas exprimée dans les poumons (Wu *et al.*, 2004).

Malgré un profil d'expression potentiellement étendu des canaux Kir4.2 et Kir4.2/Kir5.1, aucun modèle murin génétiquement invalidé pour *Kcnj15* n'a été décrit. Seules quelques études depuis le début des années 2010 prêtent au gène *KCNJ15* et à Kir4.2 des rôles, mineurs ou débattus.

Ainsi, Kir4.2 est exprimée à la membrane apicale des cellules pariétales de la muqueuse gastrique de lapin et de souris. Elle y est impliquée dans le recyclage vers le milieu extracellulaire des ions K^+ entrés par la H^+-K^+ -ATPase gastrique, qui acidifie les sécrétions stomacales. Lors d'une stimulation des glandes gastriques, Kir4.2 est plus présente à la surface des cellules pariétales. En conséquence, réduire l'expression de Kir4.2 dans des cellules pariétales de lapin par des ARN interférents réduit leur sécrétion de protons (He *et al.*, 2011; Yuan *et al.*, 2015). La pompe H^+-K^+ -ATPase gastrique pourrait alcaliniser le cytoplasme des cellules pariétales et augmenter la concentration extracellulaire en ions K^+ , deux paramètres susceptibles d'activer Kir4.2. Toutefois, les canaux potassiques couplés avec la H^+-K^+ -ATPase gastrique sont nombreux: on y compte Kir4.1 et KCNQ1, considéré comme le plus important (Fujita *et al.*, 2002; Kaufhold *et al.*, 2008). L'implication de Kir5.1 dans le phénomène n'est pas exclue mais son importance n'a pas été déterminée (Fujita *et al.*, 2002; He *et al.*, 2011).

Par ailleurs, une équipe japonaise avait initialement rapporté qu'un polymorphisme activateur de *KCNJ15* (C566T) pourrait constituer un allèle de susceptibilité au diabète de type II dans une population asiatique. Ils ont de plus établi, à l'aide de souris semi-invalidées pour *Kcnj15* durant quelques jours (par injection d'un ARN interférant), que l'expression de Kir4.2 réprimait la sécrétion d'insuline durant un test de tolérance au glucose. Les souris ainsi modifiées étaient plus tolérantes au glucose (Okamoto *et al.*, 2010; Okamoto *et al.*, 2012). Toutefois, une étude clinique postérieure réalisée au sein d'une population japonaise, obtint des résultats s'opposant à la conclusion que le polymorphisme C566T de *KCNJ15* soit un facteur de susceptibilité au diabète de type II (Fukuda *et al.*, 2013).

De façon moins évidente, Kir4.2 serait impliquée dans des phénomènes de migration cellulaire (deHart *et al.*, 2008; Nakajima *et al.*, 2015), l'acidification du contenu de la vacuole phagocytaire des leucocytes (Foote *et al.*, 2017) et l'aspect des globules rouges (Lee *et al.*, 2016). Initialement, le rôle du gène *KCNJ15* au cours du développement fut étudié car il se situe dans une région du chromosome 21 impliquée dans le syndrome de Down. Toutefois l'implication de Kir4.2 dans cette trisomie semble faible ou inexistante (Gosset *et al.*, 1997; Ohira *et al.*, 1997; Thierry *et al.*, 2000; Ferrando-Miguel *et al.*, 2004; Stern *et al.*, 2015).

2. Rôles des canaux Kir dans la physiologie rénale

a. Revue des sous-unités Kir exprimées dans le tissu rénal

Dans le tissu rénal, des canaux Kir ont été fonctionnellement décrit dans un grand nombre de membranes cellulaires. A l'heure actuelle, une dizaine de sous-unité Kir y ont été moléculairement identifiées et pourraient donc participer à la formation de ces canaux Kir (Hebert *et al.*, 2005; Hibino *et al.*, 2010; Hamilton & Devor, 2012; Welling, 2016).

Parmi les sous-unités Kir rénales se trouvent Kir2.1, Kir2.2, Kir2.3 et Kir6.1 qui sont exprimées dans les cellules vasculaires endothéliales ou musculaires lisses des artérioles glomérulaires et des capillaires péri-tubulaires. Leurs rôles à l'heure actuelle sont incertains: elles pourraient notamment contribuer à la modulation du tonus des artérioles glomérulaires lors des changements de kaliémie, en permettant indirectement la production du NO par les cellules endothéliales vasculaires (Cao *et al.*, 2007; Chilton *et al.*, 2008; Hibino *et al.*, 2010; Magnusson *et al.*, 2011; Salomonsson *et al.*, 2017). Certaines de ces sous-unités Kir sont également exprimées dans d'autres tissus rénaux. Ainsi, un canal Kir2.1 est exprimé dans les cellules de l'appareil juxtaglomérulaire où il permet le maintien d'un potentiel de repos de -60 mV (Leichtle *et al.*, 2004; Hibino *et al.*, 2010) et son ARNm a été reporté dans les cellules proximales humaines (Derst *et al.*, 2001b). De même, la présence d'un canal Kir2.3 dans la membrane basolatérale des cellules principales du CC a été montrée par immunohistochimie et patch-clamp (Welling, 1997; Millar *et al.*, 2006). Enfin, la sous-unité Kir6.1 est exprimée dans les mitochondries d'un grand nombre de cellules rénales comprenant celles du CC, du TCD et éventuellement du TP (Brochiero *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2007; Hamilton & Devor, 2012). Par ailleurs, Kir7.1 est exprimée dans les membranes basolatérales du TCD, du TCN, du CC et dans le TP (Krapivinsky *et al.*, 1998; Ookata *et al.*, 2000; Derst *et al.*, 2001a) et l'ARNm de Kir4.2 a été rapporté dans le TP et le TCD (voir Section Introduction B.II.1.d). Cependant, le caractère primordial de ces 7 sous-unités dans l'établissement de la fonction rénale n'a été mis en évidence, ni par l'utilisation de modèles animaux ni par la découverte de pathologies associées à leurs gènes [Voir Tableau 1] (Hibino *et al.*, 2010; Villanueva *et al.*, 2015; Welling, 2016).

Au contraire, les canaux Kir1.1 et Kir4.1/Kir5.1 sont considérés comme les principaux canaux potassiques des membranes apicales ou basolatérales du néphron distal et sont dotés d'une importance physiologique majeure à ces emplacements (Hebert *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2010; Hamilton & Devor, 2012; Su & Wang, 2016; Welling, 2016).

b. Rôle de Kir1.1 dans la physiologie et la physiopathologie rénale

Kir1.1 est la première sous-unité Kir à avoir été clonée, depuis les reins de rat et d'Homme. L'homotétramère Kir1.1 est plus connu sous le nom lui ayant été initialement donné de canal ROMK ("Rat Outer-Medullary K⁺"). Au total, six variants d'épissage de *KCNJ1* ont été identifiés, qui codent pour 3 isoformes appelée Kir1.1a, Kir1.1b et Kir1.1c. Les extrémités N-terminales des isoformes a et c sont plus longues de quelques résidus que celle de l'isoforme b (Ho *et al.*, 1993; Shuck *et al.*, 1994; Kondo *et al.*, 1996). Ces 3 isoformes sont exprimées dans les membranes apicales des cellules de la BAL et des cellules principales du CC, mais dans des segments différents: Kir1.1a est exprimée dans le CC cortical et de la médulla externe, Kir1.1b est exprimée de la BAL au CC cortical et Kir1.1c de la BAL au TCD2 [Voir Figure 8, 9 et 14] (Boim *et al.*, 1995; Mennitt *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 1997; Kohda *et al.*, 1998; Hebert *et al.*, 2005; Hibino *et al.*, 2010; Wade *et al.*, 2011; Hamilton & Devor, 2012).

L'importance du canal Kir1.1 dans le fonctionnement du néphron a été rapidement souligné lorsque des mutations inactivatrices de *KCNJ1* ont été découvertes chez des patients atteints du "syndrome de Bartter" (SB). Ces mutations peuvent affecter la phosphorylation, l'adressage, la stabilité ou les propriétés électrophysiologiques du canal Kir1.1 (Simon *et al.*, 1996a; ICSGFB, 1997; Jeck *et al.*, 2001; Peters *et al.*, 2003; Hibino *et al.*, 2010).

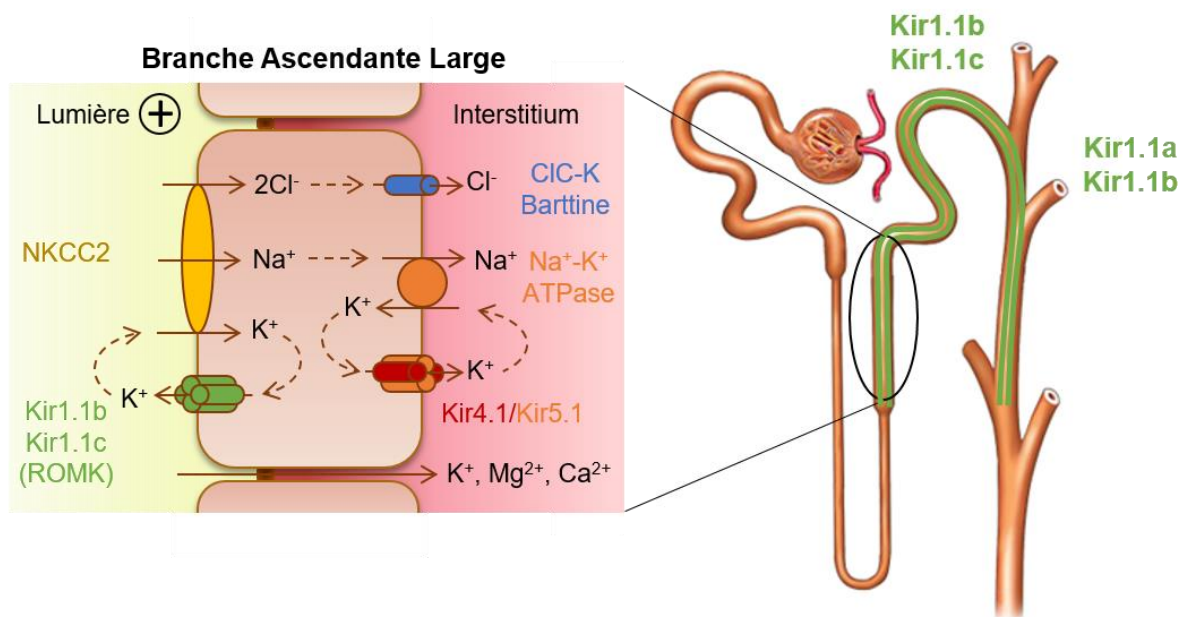


Figure 14: Schéma du profil d'expression des isoformes de Kir1.1 dans le néphron distal et du couplage des transports de la branche ascendante large (d'après Hibino *et al.*, 2010)

Le SB est généralement transmis par la voie autosomale récessive. Six gènes sont impliqués dans l'apparition de 6 types de SB. Chaque type est causé par l'altération d'un gène encodant pour une protéine de la BAL: l'inactivation de *KCNJ1* aboutit au SB de type II. Le SB se caractérise par une diurèse excessive, une natriurèse élevée, une fuite urinaire d'ions Ca^{2+} et Mg^{2+} , une alcalose métabolique hyperchlorémique et une hypokaliémie. L'ensemble est accompagné d'un taux plasmatique de rénine élevé et d'un hyperaldostéronisme secondaire (Bartter *et al.*, 1962; Deschenes & Fila, 2011; Andrini *et al.*, 2015; Laghmani *et al.*, 2016).

La physiopathologie du SB a pu être mise en évidence chez les souris invalidées génétiquement pour *Kcnj1*, qui reproduisent le phénotype humain (Lorenz *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2002). Dans la BAL des souris et des patients, l'inactivation de Kir1.1 réduit la sécrétion des ions K^+ vers la lumière tubulaire d'où ils étaient employés par NKCC2 pour accumuler des ions Na^+ et Cl^- dans le cytoplasme. L'absence de ce recyclage d'ions K^+ provoque une diminution de l'activité de NKCC2: c'est pourquoi le SB mime un empoisonnement au Furosémide et peut être causé par l'inactivation génétique de NKCC2. Indirectement, l'activité de réabsorption du NaCl par la $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ et les canaux chorure ClC-K diminue, ce qui réduit l'accumulation d'ions NaCl dans l'interstitium de la médulla interne ainsi que la ddp transépithéliale lumière-positive qui assurait la réabsorption paracellulaire d'ions Mg^{2+} et Ca^{2+} [Voir Figure 14]. La diminution du gradient cortico-papillaire qui s'ensuit provoque une importante diurèse: cela génère transitoirement une hypovolémie qui stimule fortement l'axe RAA. L'hyperaldostéronisme augmente alors dans le néphron distal la réabsorption d'ions Na^+ , ce qui exagère la ddp transépithéliale lumière-négative et provoque une sécrétion excessive d'ions H^+ et K^+ (Hebert *et al.*, 2005; Hibino *et al.*, 2010; Deschenes & Fila, 2011).

Cependant, Kir1.1 est lui-même nécessaire à la sécrétion d'ions K^+ dans le néphron distal (voir Section Introduction A.III.1). C'est pourquoi le SB de type II provoque transitoirement une hyperkaliémie, avant que l'activation d'autres canaux potassiques apicaux dans le CC ne provoque l'hypokaliémie modérée observée (Peters *et al.*, 2002; Finer *et al.*, 2003; Bailey *et al.*, 2006). De même, les souris invalidées pour l'isoforme Kir1.1a distale ne présentent pas de SB mais une difficulté à excréter une charge importante en ions K^+ (Dong *et al.*, 2016). Kir1.1 étant impliqué dans la régulation du bilan urinaire du potassium, il régule à la fois la sécrétion d'aldostérone *via* la kaliémie et son impact sur la kaliurèse. En conséquence, les régulations de Kir1.1, impliquées dans la physiopathologie du pseudo-hypoaldostéronisme de type II, font l'objet d'intenses recherches (Hadchouel *et al.*, 2016; Welling, 2016; Zhang *et al.*, 2017).

c. Rôle de Kir4.1/Kir5.1 dans la physiologie et la physiopathologie rénale

Les deux sous-unités Kir4.1 et Kir5.1, qui ne possèdent pas d'isoforme, ont été clonées simultanément par plusieurs équipes indépendantes depuis le cerveau ou le rein de rat et d'Homme (Bond *et al.*, 1994; Bredt *et al.*, 1995; Takumi *et al.*, 1995; Shuck *et al.*, 1997). Immédiatement, Kir5.1 fut considérée non-fonctionnelle, jusqu'à la découverte de son association avec Kir4.1 en un canal Kir hétérotétramérique Kir4.1/Kir5.1 possédant des propriétés différentes de l'homotétramère Kir4.1 (voir Section Introduction B.I.2.d) (Bond *et al.*, 1994; Pessia *et al.*, 1996; Tanemoto *et al.*, 2000; Tucker *et al.*, 2000; Pessia *et al.*, 2001).

La présence dans les membranes basolatérales du néphron distal de canaux Kir a été rapportée très tôt chez le lapin par patch-clamp. Ces canaux possèdent des propriétés compatibles avec celles du canal Kir4.1/Kir5.1 exprimé en système d'expression hétérologue (voir Section Introduction B.I.2.d) (Taniguchi *et al.*, 1989; Hurst *et al.*, 1992). Ces observations ont été renouvelées dans la BAL, le TCD et les cellules principales du CC de souris et de rat, accompagnées de preuves moléculaires de l'expression de Kir4.1 et Kir5.1 dans ces segments (Ito *et al.*, 1996; Lourdel *et al.*, 2002; Paulais *et al.*, 2002; Hibino *et al.*, 2004a; Hibino *et al.*, 2004b; Gray *et al.*, 2005; Lachheb *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2015; Su & Wang, 2016; Su *et al.*, 2016). Finalement, la nature de ces canaux Kir fut confirmée par leur disparition chez la souris génétiquement invalidée pour *Kcnj10*, le gène encodant pour Kir4.1 (Bockenhauer *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2015; Su *et al.*, 2016).

Dans le TCD, le canal Kir4.1/Kir5.1 est considéré comme l'unique *media* de la conductance K^+ basolatérale des cellules: 2 autres canaux potassiques y ont été immunomarqués, mais seule l'activité de Kir4.1/Kir5.1 y a été reportée (Lourdel *et al.*, 2002; Lachheb *et al.*, 2008). Toutefois, l'importance du canal Kir4.1/Kir5.1 dans le TCD n'est apparue qu'à la découverte du syndrome "SeSAME", pathologie autosomale récessive causée par l'absence d'une sous-unité Kir4.1 fonctionnelle (Bockenhauer *et al.*, 2009; Scholl *et al.*, 2009). Ce syndrome est la conséquence de mutations inactivatrices du gène *KCNJ10* aboutissant à la formation d'une sous-unité Kir4.1 immature ou inactive (Sala-Rabanal *et al.*, 2010; Williams *et al.*, 2010). Mise à part ses composantes extra-rénales (voir Section Introduction B.II.1), le syndrome SeSAME se présente comme un syndrome de Gitelman causé par l'invalidation de NCC: les patients ont une natriurèse élevée, une alcalose métabolique, un hyperaldostérionisme secondaire, ils sont hypokaliémiques, hypomagnésémiques et hypocalciuriques (Simon *et al.*, 1996b; Bockenhauer *et al.*, 2009; Scholl *et al.*, 2009).

Les souris invalidées pour *Kcnj10* développent le même phénotype que les patients SeSAME et meurent d'épilepsie vers 2 semaines de vie. Celles invalidées dans le cerveau seulement meurent en 3-4 semaines et celles invalidées adultes dans le tissu rénal survivent (Djukic *et al.*, 2007; Bockenhauer *et al.*, 2009; Cuevas *et al.*, 2017). L'étude de ces modèles a permis de comprendre la physiopathologie du syndrome: l'absence de Kir4.1 dépolarise la membrane basolatérale des cellules du TCD, qui ne présente plus de conductance potassique. Dans le même temps, Kir5.1 reste intracellulaire et le cotransporteur NCC, réabsorbant le NaCl, est moins actif [Voir Figure 15] (Zhang *et al.*, 2014; Cuevas *et al.*, 2017). Les syndromes SeSAME et de Gitelman sont donc tous deux caractérisés par une altération des transports du TCD1: la natriurèse élevée et l'hypomagnésémie sont imputables aux fuites urinaires de NaCl et de Mg^{2+} consécutives à l'inactivité de NCC et TRPM6 [Voir Figure 15]. Cette natriurèse occasionne une hypovolémie et une hypotension stimulant l'axe RAA: ENaC plus actif, la sécrétion d'ions K^+ dans la lumière du CC est excessive et cause une hypokaliémie (Simon *et al.*, 1996b; Scholl *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2014; Su *et al.*, 2016; Cuevas *et al.*, 2017).

L'inactivité du TCD en l'absence de *Kcnj10* serait expliquée par un couplage de Kir4.1/Kir5.1 avec les autres transporteurs du segment: le recyclage basolatéral d'ions K^+ vers l'interstitium permet l'activité de la $Na^+-K^+-ATPase$, donc le maintien du gradient électrochimique apical de sodium et du potentiel de membrane basolatéral. L'ensemble est nécessaire au fonctionnement de NCC et à la sortie d'ions Cl^- via ClC-Kb. Or, une faible concentration intracellulaire en ions Cl^- autophosphoryle et active des kinases WNK qui activent à leur tour la kinase SPAK. L'absence de Kir4.1/Kir5.1, en augmentant la concentration intracellulaire en ions Cl^- , réduirait donc l'activation de NCC par SPAK [Voir Figure 15] (Paulais *et al.*, 2011; Hadchouel *et al.*, 2016; Su & Wang, 2016; Welling, 2016).

Inversement, la BAL et le CC ne sont pas affectés dans le syndrome SeSAME (Scholl *et al.*, 2009; Deschenes & Fila, 2011; Zhang *et al.*, 2017). Pour cause, dans la BAL un canal potassique appelé Slo2.2 a été identifié: à l'origine d'un tiers de la conductance basolatérale du segment aux ions K^+ (Paulais *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2015), il est plus actif en l'absence de Kir4.1 et évite ainsi la dépolarisation des cellules (Fan *et al.*, 2015; Su *et al.*, 2016). Dans les cellules principales du CC cortical, Kir4.1/Kir5.1 est le principal canal potassique basolatéral, mais il en existe 2 autres (dont Kir2.3) qui pourraient compenser son absence (voir Section Introduction B.II.2.a) (Hirsch & Schlatter, 1993; Wang *et al.*, 1994; Welling, 1997; Millar *et al.*, 2006; Lachheb *et al.*, 2008; Theilig *et al.*, 2008; Hamilton & Devor, 2012; Su *et al.*, 2016).

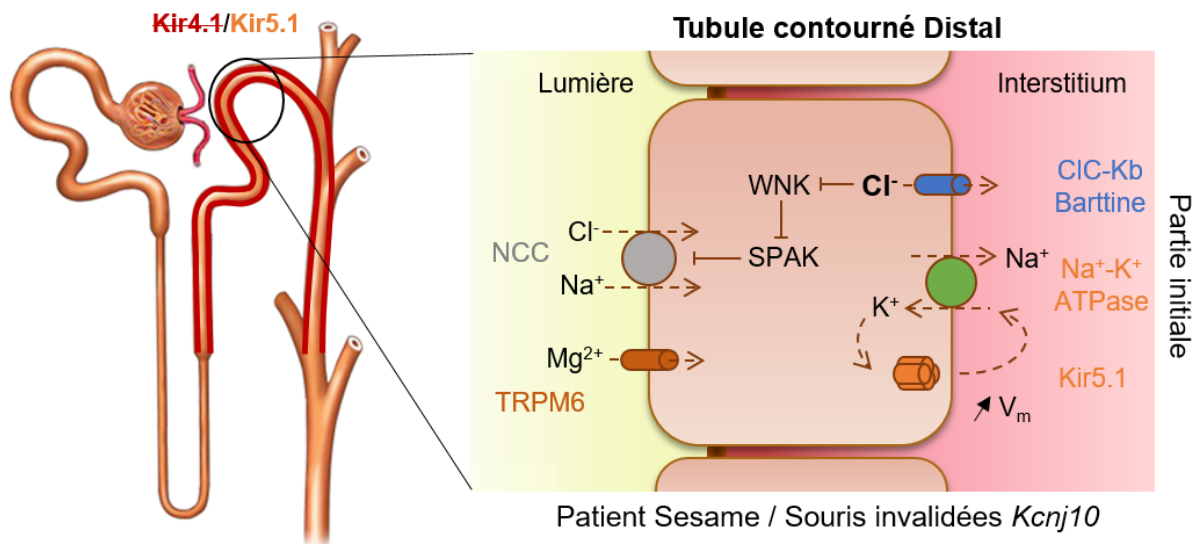


Figure 15: Schéma de l'altération des transports du tubule contourné distal dans le syndrome SeSAME (d'après Scholl et al., 2009; Welling et al., 2016; Su & Wang, 2016)

L'étude, réalisée au laboratoire, de souris invalidées pour *Kcnj16* a révélé qu'en l'absence de Kir5.1, un canal Kir4.1 insensible au pH intracellulaire physiologique est constitutivement actif. Celui-ci hyperpolariserait la membrane basolatérale des cellules du TCD1. Le phénotype complexe des souris fait certainement intervenir d'autres organes (voir Section Introduction B.II.1) ou segments du néphron (voir Section Introduction B.II.1.d). Il comprend polyurie, polydipsie, acidose métabolique hyperchlorémique, hypercalciurie, hypermagnésurie, hyperkaliurie et hypokaliémie. Mais à l'inverse du syndrome SeSAME, l'activité du TCD de souris est excessive: leur acidose métabolique et leur hypercalciurie, traits communs avec le pseudo-hypoaldostérisme de type II activant le TCD, sont atténués par l'inhibition de NCC. De plus, cette inhibition provoque également chez elles une natriurèse exagérée (Paulais *et al.*, 2011). Récemment, il fut proposé qu'une faible expression rénale de Kir5.1 explique l'hypomagnésémie et l'hypokaliémie de patients atteints d'une maladie rénale tubulo-intersticielle autosomale et dominante (Kompatscher *et al.*, 2017).

Le contrôle par Kir4.1/Kir5.1 de la phosphorylation de NCC aurait un rôle physiologique: Kir4.1/Kir5.1 est stimulé par l'AngII (qui provoque sa phosphorylation), inhibé par la forte concentration interstitielle en ions K⁺ lors de l'hyperkaliémie et l'activation des WNK réduit l'activité de Kir1.1 (voir Section Introduction B.I.2.c). Donc, lorsque à kaliémie normale l'axe RAA est stimulé, l'activation de Kir4.1/Kir5.1 pourrait augmenter la réabsorption de NaCl par le DCT tout en réduisant sa sécrétion d'ions K⁺. Ce faisant, peu de NaCl atteint le CC et celui-ci excrète donc peu de potassium (Su & Wang, 2016; Welling, 2016).

3. Revue des pathologies monogéniques associées aux canaux Kir

Sous-unité	Expression	Fonctions contrôlées	Type de mutation	Pathologies humaines	Phénotype murin	Références
Kir1.1 (<i>KCNJ1</i>)	Cerveau, rein	Transports du néphron distal	Inactivatrice récessive	Syndrome de Bartter Type II	Syndrome de Bartter Type II	(Simon et al., 1996a) (Lorenz et al., 2002)
Kir2.1 (<i>KCNJ2</i>)	Cœur, vaisseaux	Rythme cardiaque, vasodilatation	Inactivatrice dominante	Syndrome d'Andersen Type I	Syndrome d'Andersen, Hypertension	(Plaster et al., 2001) (Zaritsky et al., 2001)
			Activatrice dominante	Syndrome QT court type III Fibrillation atriale	Syndrome QT court, Fibrillation atriale, Fente palatine	(Priori et al., 2005) (Zaritsky et al., 2001) (Xia et al., 2005) (Ahn et al., 2017)
Kir2.6 (<i>KCNJ18</i>)	Muscles squelettiques	Excitabilité musculaire	Inactivatrice dominante (?)	Paralysies Périodiques Thyrotoxiques Hypokaliémique	---	(Ryan et al., 2010) (Paninka et al., 2016) (Paninka et al., 2017)
Kir3.4 (<i>KCNJ5</i>)	Cœur, cerveau, glande surrénale	Rythme cardiaque, sécrétion d'aldostérone	Inactivatrice dominante	Syndrome d'Andersen	Tachycardie, capacités spatiales altérées	(Wickman et al., 1998; Wickman et al., 2000; Yang et al., 2010)
			Activatrice dominante	Hyperaldostéronisme Primaire type III	---	(Choi et al., 2011)
Kir4.1 (<i>KCNJ10</i>)	Cerveau, rétine, rein, oreille interne,	Excitabilité neuronale, potentiels endocochléaires/visuels transports du néphron distal	Inactivatrice récessive	Syndrome SeSAME	Syndrome SeSAME potentiels visuels altérés	(Bockenhauer et al., 2009) (Scholl et al., 2009)
			Activatrice dominante	Épilepsie et autisme	---	(Sticca et al., 2016)
Kir6.1 (<i>KCNJ8</i>)	Cœur, os, cerveau, vaisseaux, pancréas	Excitabilité neuronale, vasodilatation	Inactivatrice Dominante	---	Angor de Prinzmetal, mort subite, hypertension	(Miki et al., 2002; Haissaguerre et al., 2009; Delaney et al., 2012)
			Activatrice Dominante	Syndrome de Cantú, Syndrome de Brugada, Fibrillation cardiaque	Hypotension, diabète	(Brownstein et al., 2013; Li et al., 2013; Cooper et al., 2014; Remedi et al., 2017)
Kir6.2 (<i>KCNJ11</i>)	Cerveau, cœur, pancréas	Sécrétion d'insuline, excitabilité neuronale, adaptation cardiaque à l'effort	Inactivatrice Récessive/Dominante	Hyperinsulinémie néonatale persistante	Hyperinsulinémie néonatale transitoire, arythmie, insuffisance cardiaque	(Thomas et al., 1996; Miki et al., 1998; Yamada et al., 2006; Pimey et al., 2008)
			Activatrice Dominante	Diabète néonatal permanent +/- Épilepsie	diabète néonatal	(Gloyn et al., 2004) (Koster et al., 2000) (Clark et al., 2012)
Kir7.1 (<i>KCNJ13</i>)	Rétine, rein, utérus, palais, poumons	Transports de l'épithélium pigmentaire rétinien, Contraction utérine, Développement	Inactivatrice Dominante	Amaurose congénitale de Leber, Dégénérescence vitréo-rétinienne en flocons de neige	Fente palatine, retard développemental pulmonaire	(Hejmcicik et al., 2008; McCloskey et al., 2014; Pattnaik et al., 2015) (Villanueva et al., 2015)

Tableau 1: Résumé des pathologies humaines et murines associées aux altérations génétiques des canaux Kir

III. Rôles et revue des canaux potassiques du tubule proximal

1. Rôles des canaux potassiques du tubule proximal

Contrairement à ceux du néphron distal, les canaux K^+ du TP sont peu étudiés: bien qu'ils soient présents dans les membranes apicales et basolatérales, leurs identités sont souvent indéfinies. De plus, la réabsorption des ions K^+ étant effectuée passivement par la voie paracellulaire dans le TP (voir Section Introduction A.II.2.a), leur impact sur le bilan urinaire du potassium est incertain (Weinstein, 1988; Hebert *et al.*, 2005; Hamilton & Devor, 2012).

Toutefois quelques rôles sont inférés aux canaux K^+ du TP. Premièrement ils permettraient d'assurer une sortie apicale d'ions K^+ qui maintiendrait le potentiel de la membrane apicale négatif durant l'entrée massive et dépolarisante de sodium par les cotransporteurs variés d'acides aminés, de glucose ou de phosphates. Ce potentiel négatif est nécessaire au maintien de l'activité de ces transports électrogéniques (Biagi *et al.*, 1981; Fromter, 1982; Hebert *et al.*, 2005; Hamilton & Devor, 2012). Deuxièmement, en l'absence de canaux K^+ , les entrées apicales de solutés conduiraient à des mouvements d'eau aboutissant à un gonflement cellulaire (Barriere *et al.*, 2003; Hebert *et al.*, 2005; Hamilton & Devor, 2012). Troisièmement, comme dans les autres segments du néphron, les canaux K^+ basolatéraux du TP assurent le maintien de l'activité de la $Na^+-K^+-ATPase$ en recyclant des ions K^+ vers l'interstitium, ce qui permet le maintien du potentiel membranaire nécessaire à l'activité du cotransporteur $Na^+/3HCO_3^-$ NBCe-1A (voir Section Introduction A.II.2.a) (Warth *et al.*, 2004).

Enfin, les transports de potassium dans le TP impactent l'ammoniurie par des mécanismes incompris. En effet, de manière globale l'hyperkaliémie réduit l'excrétion urinaire d'ammonium alors que l'hypokaliémie l'augmente. Différents segments sont impliqués dans ce phénomène mais plusieurs études de micro-perfusion ont montré que l'ammoniogenèse était inversement proportionnelle à la concentration luminale en ions K^+ dans le TP. De plus, l'inhibition des canaux K^+ du TP réduit la capacité de ce dernier à transporter de l'ammonium. La dépendance de l'ammoniogenèse au métabolisme du potassium est incomprise, mais pourrait être liée à la perméabilité généralement élevée des canaux K^+ pour l'ammonium ou à l'alcalinisation du pH intracellulaire lors d'une entrée importante d'ions K^+ . Ce dernier phénomène est susceptible de réduire l'ammoniogenèse (voir Section Introduction A.II.4.c) (Jaeger *et al.*, 1983; Adam *et al.*, 1986; Nagami, 1990; DuBose & Good, 1991; Simon *et al.*, 1992; Karet, 2009; Weiner & Verlander, 2013; Hamm *et al.*, 2015).

2. Revue des canaux potassiques du tubule proximal

a. Identité des canaux potassiques apicaux du tubule proximal

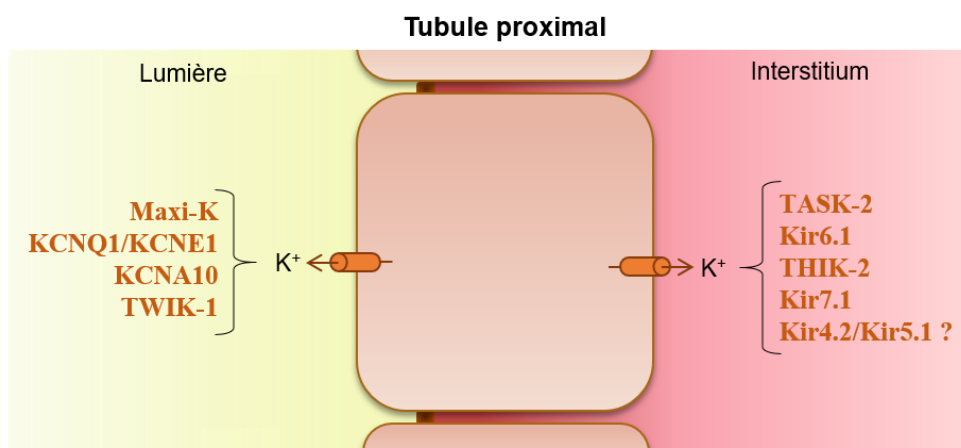
La membrane apicale du TP contient plusieurs canaux potassiques [voir Figure 16]. Chez le lapin et la souris, différents canaux ayant des conductances unitaires de 30, 40, 60 et 200-300 pS y ont été enregistrés (Gogelein, 1990; Hebert *et al.*, 2005). Le canal de 200-300 pS est identifié comme Maxi-K, canal activé par la dépolarisation et le gonflement cellulaire généralement fermé (Zweifach *et al.*, 1991). Sur une lignée cellulaire de TP humain, un canal Kir de 42 pS sensible à l'ATP a été observé (Nakamura *et al.*, 2001). Chez la souris et le rat un canal de 12 pS appelé MinK, constitué du duo de protéines KCNQ1/KCNE1, forme un canal potassique apical (Sugimoto *et al.*, 1990; Vallon *et al.*, 2001). L'importance de MinK est illustrée par les pertes urinaires modérées de NaCl, d'acides aminés et de glucose des souris invalidées pour KCNE1 (Vallon *et al.*, 2001). Cependant KCNQ1 n'est pas toujours rapportée dans le TP (Zheng *et al.*, 2007). Le canal KCNA10 de 10-12 pS est lui aussi exprimé dans la membrane apicale du TP de rat: stimulé par la dépolarisation, il pourrait coupler son activité à l'entrée apicale du sodium (Yao *et al.*, 2002). Enfin, le canal potassique TWIK-1 a été immunomarké dans la bordure en brosse du TP de souris (Cluzeaud *et al.*, 1998) et les souris invalidées pour TWIK-1, qui expriment moins de Napi-2 à la surface de leurs cellules, ont une capacité de réabsorption proximale des phosphates réduite [Voir Figure 4] (Nie *et al.*, 2005).

b. Identité des canaux potassiques basolatéraux du tubule proximal

Plusieurs canaux potassiques basolatéraux du TP décrits fonctionnellement ne sont toujours pas identifiés: ils possèdent des conductances unitaires de 12, 36, 46, 54 et 60 pS (Gogelein & Greger, 1987; Gogelein, 1990; Noulain *et al.*, 1999; Hamilton & Devor, 2012). Inversement, la conductance de THIK-2, canal potassique immunomarké du coté basolatéral du TP de souris, n'a pas été rapportée (Theilig *et al.*, 2008). Chez le lapin, un canal Kir peu actif de 50-60 pS inhibé par l'ATP intracellulaire a été décrit. Il s'agirait de Kir6.1: l'ARNm de Kir6.1 est présent dans le TP de lapin et le canal est inactif en présence d'un sulfonyleurée, inhibiteur des protéines SUR associées aux sous-unités Kir6.x (Tsuchiya *et al.*, 1992; Hurst *et al.*, 1993; Noulain *et al.*, 1999). Son rôle est toutefois incertain: il pourrait n'être exprimé que dans les mitochondries et/ou n'être actif qu'en cas d'hypoxie (Reeves & Shah, 1994; Zhou *et al.*, 2007). Finalement, les souris n'exprimant pas Kir6.1 n'ont pas de phénotype rénal évident, bien qu'elles présentent des lésions inflammatoires rénales (Kane *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2015).

TASK-2 est un canal potassique clairement identifié dans la membrane basolatérale du TP, activé par l'alcalinisation extracellulaire et le gonflement cellulaire (Niemeyer *et al.*, 2001; Warth *et al.*, 2004). Les souris n'exprimant pas TASK-2 présentent une légère augmentation de leur diurèse et de leur natriurèse, ainsi qu'une difficulté à réabsorber les ions HCO_3^- filtrés, qui s'accompagne d'une faible acidose métabolique proximale. Ce phénotype serait la conséquence d'un couplage entre l'activité de TASK-2 et NBCe-1A: TASK-2 maintien le potentiel de membrane négatif nécessaire à NBCe-1A tandis que NBCe-1A, qui réabsorbe les ions HCO_3^- , active TASK-2 en augmentant le pH interstitiel (Warth *et al.*, 2004; Sepulveda *et al.*, 2015).

Plusieurs des canaux K^+ basolatéraux non-identifiés du TP de lapin sont rectifiants entrants, possèdent une conductance de 50-60 pS et sont inhibés par les protons intracellulaires (Gogelein & Greger, 1987; Parent *et al.*, 1988; Gogelein, 1990; Beck *et al.*, 1993). Si le canal Kir7.1 a pu être observé dans la membrane basolatérale du TP de hamster, sa conductance de 50 fS est trop faible pour correspondre à ces canaux Kir non-identifiés (Derst *et al.*, 2001a; Hibino *et al.*, 2010). Au contraire, les canaux non-identifiés ont des propriétés similaires à celles de l'hétérotétramère Kir4.2/Kir5.1 *in vitro* (voir Section Introduction B.I.2.d). Or Kir5.1 a parfois été rapportée dans le TP et les souris invalidées pour Kir5.1 ont une ammoniurie faible qui pourrait être le signe d'un défaut d'ammoniogenèse proximale (voir Section Introduction A.II.4.b) (Tucker *et al.*, 2000; Derst *et al.*, 2001b; Paulais *et al.*, 2011). Kir5.1 n'étant active qu'associée à Kir4.1, qui n'est pas exprimée dans le TP, ou à Kir4.2 qui y est possiblement (voir Section Introduction B.II.1.d), un canal Kir4.2/Kir5.1 pourrait être exprimé dans la membrane basolatérale des cellules du TP [Voir Figure 16] (Ito *et al.*, 1996; Chabardes-Garonne *et al.*, 2003; Hibino *et al.*, 2004a; Lachheb *et al.*, 2008; Bockenhauer *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2015).



*Figure 16: Schéma des canaux potassiques exprimés dans les membranes apicales et basolatérales du tubule proximal (d'après Hebert *et al.*, 2005; Hamilton & Devor, 2012)*

OBJECTIF DE LA 1^{ÈRE} ÉTUDE

Les 17 protéines Kir, phylogénétiquement apparentées, constituent par tétramérisation des canaux potassiques appelés des *canaux Kir* (voir Section Introduction B.I.1). Considérés tardivement par les physiologistes, ces canaux possèdent des propriétés électrophysiologiques, des régulations et des rôles très étudiés depuis vingt ans (voir Section Introductions B.I.2 et B.II). Ces canaux, présents à la membrane plasmique de tous les organismes vivants, contribuent à des fonctions physiologiques variées. De fait, l'altération de leur fonctionnalité est à l'origine de nombreuses pathologies génétiques (voir Section Introduction B.II.3).

Parmi les membres du groupe des canaux Kir "*de transport d'ions K⁺*", les canaux Kir1.1, Kir4.1 et Kir5.1 sont désormais considérés majeurs au fonctionnement du néphron. Ainsi, l'activité de Kir1.1, exprimé dans les membranes apicales du tubule distal, est nécessaire au fonctionnement de la branche ascendante large de l'anse de Henle. Sa perte de fonctionnalité provoque de fait un Syndrome de Bartter (voir Section Introduction B.III.2.b). De même, les protéines Kir4.1 et Kir5.1 possèdent une activité couplée à celle de la Na⁺-K⁺-ATPase, une fois associées en un canal hétérotétramérique Kir4.1/Kir5.1, dans les membranes basolatérales du néphron distal. Leurs altérations provoquent alors une modification du potentiel de membrane basolatéral qui impacte majoritairement le tubule contourné distal. Il y a quelques années, une pathologie génétique appelée le "*Syndrome SeSAME*", provoquée par la perte de fonctionnalité de Kir4.1 et du tubule contourné distal a été décrite. Peu après, le laboratoire a décrit le phénotype de souris invalidées génétiquement pour Kir5.1, qui présentent également une atteinte du tubule contourné distal (Paulais *et al.*, 2011) (voir Section Introduction B.II.2.c).

Depuis la découverte du rôle du canal Kir4.1/Kir5.1 dans le néphron distal, l'étude de ses régulations physiologiques et physiopathologiques est un domaine de recherche très actif. En revanche, le rôle de Kir5.1 dans le tubule proximal, suggéré par le phénotype des souris invalidées, reste inconnu. Kir5.1 n'étant fonctionnelle qu'en hétérotétramère (voir Section Introduction B.I.2.b), elle pourrait s'y associer avec la protéine Kir4.2 dont le rôle physiologique et le profil d'expression restent très incertains (voir Section Introduction B.II.1.d).

L'objectif de cette étude a été de déterminer le rôle de Kir4.2, seule ou en association avec Kir5.1, dans la physiologie rénale. Pour cela, j'ai analysé le phénotype et la fonction rénale de souris génétiquement invalidées pour Kir4.2 (*Kcnj15^{-/-}*).

MATÉRIEL ET MÉTHODES N°1

I. Modèles d'étude

1. Modèle murin génétiquement invalidé pour *Kcnj15*

La lignée de souris génétiquement invalidées pour le gène *Kcnj15*, encodant Kir4.2, a été réalisée à partir d'un couple de souris fondatrices hétérozygotes "*Kcnj15*^{+/-}", au fond génétique hétérogène 129P2/OlaHsd et C57Bl/6j, acheté au Mary Lyon Centre (Oxford, Grande Bretagne). Ces souris ont été générées par la société Deltagen (San Mateo, CA, USA), qui a remplacé 136 bases du 4^{ème} exon de *Kcnj15*, encodant 46 acides-aminés situés entre le domaine TM1 et l'hélice α H5 de Kir4.2, par une cassette de résistance à la néomycine. L'allèle *Kcnj15* résultant de cette mutation ne produit pas Kir4.2 [voir Figure S3 dans l'article]. Les souris fondatrices et leurs descendantes hétérozygotes ont été rétro-croisées durant 5 générations avec des souris sauvages C57Bl/6j (Charles River) afin d'homogénéiser le fond génétique de la lignée. L'élevage des souris a été réalisé au Centre d'Explorations Fonctionnelles des Cordeliers (Numéro d'agrément : B-75-06-12). Durant cet élevage, les souris ont été nourries et abreuvées *ad libitum* à l'aide d'abreuvoirs automatiques d'eau potable ou de croquettes commerciales SAFE-A04 contenant notamment 0.25 % de sodium, 0.6 % de potassium et 0.73 % de calcium (Usine d'Alimentation Rationnelle).

Les souris ont été génotypées par biopsie de queue, extraction d'ADN, amplification PCR des allèles sauvages ou invalidés et migration du produit PCR en gel d'agarose. Les expérimentations ont été réalisées avec l'accord du comité éthique Charles Darwin (Permis 03-MP/8569/(0)) sur des souris mâles de 20 semaines homozygotes invalidées *Kcnj15*^{-/-} et homozygotes sauvages *Kcnj15*^{+/+}, issues des mêmes portées. Les souris invalidées, dont les naissances sont mendéliennes, sont viables, fertiles, n'ont pas de retard de croissance ou d'anomalie morphologique. En fin d'expérimentation, les souris ont été sacrifiées par injection intra-péritonéale d'un mélange de Kétamine (0.12 mg/g de poids corporel) et de Xylazine (0.006 mg/g de poids corporel) dans du sérum physiologique 0.9 % NaCl. Les reins de souris homozygotes *Kcnj16*^{-/-}, dont les allèles *Kcnj16* sont largement délétés de leurs séquences encodant Kir5.1 (D'Adamo *et al.*, 2011) et de souris sauvages *Kcnj16*^{+/+} des mêmes portées sont issus d'une cryoconservation datant d'une étude précédente du laboratoire (Paulais *et al.*, 2011).

2. Modèles cellulaires d'expression transitoire de Kir4.2 et Kir5.1

L'expression hétérologue de sous-unité Kir dans la lignée cellulaire OK a été permise par l'utilisation de plasmides appelés pCDNA3-rKir5.1 et pBF-mKir4.2, qui nous ont été fournis par le Pr. Stephen J. Tucker (Université d'Oxford, Grande Bretagne). Le premier plasmide est un vecteur d'expression de 5.4 kb qui contient la séquence codante de Kir5.1 du rat dans son site de multi-clonage (SMC), situé en aval du promoteur du Cytomégalo virus (CMV), ainsi qu'une cassette de résistance à l'ampicilline (Amp^R) placée en aval d'un promoteur Amp^R [voir Figure 17]. Le plasmide pBF contient la séquence codante de Kir4.2 de souris mais ne permet son expression hétérologue que dans l'ovocyte de Xénope (voir section Matériel et Méthodes n°2 I.1). Avec l'aide du Dr. Olivier Lahuna (Institut Cochin, Paris, France), la séquence codante de Kir4.2 a été sous-clonée entre 2 sites de restriction du SMC d'un plasmide pCDNA3 [voir Figure S5 dans l'article], générant un plasmide d'expression de Kir4.2 de 6.9 kb appelé pCDNA3-mKir4.2 [voir Figure 17]. Les séquences des sous-unités Kir des plasmides pCDNA3 ont été entièrement séquencées avant utilisation (GATC Biotech, Allemagne).

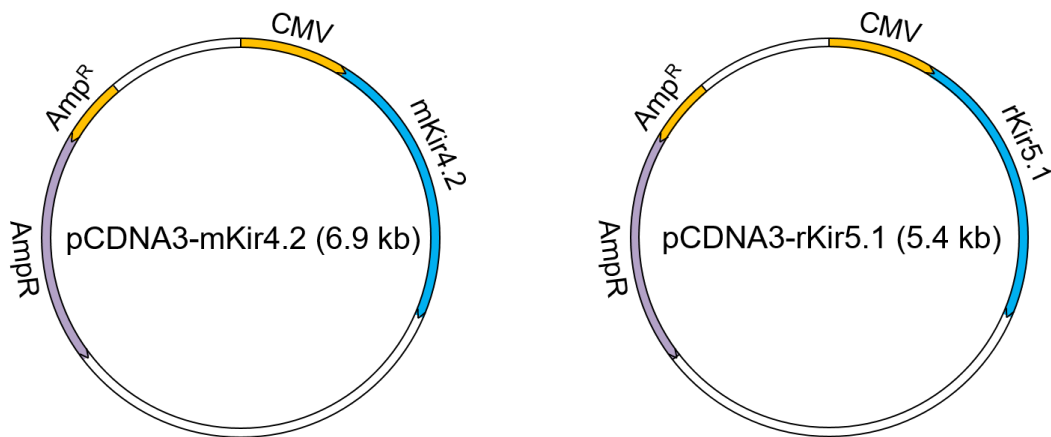


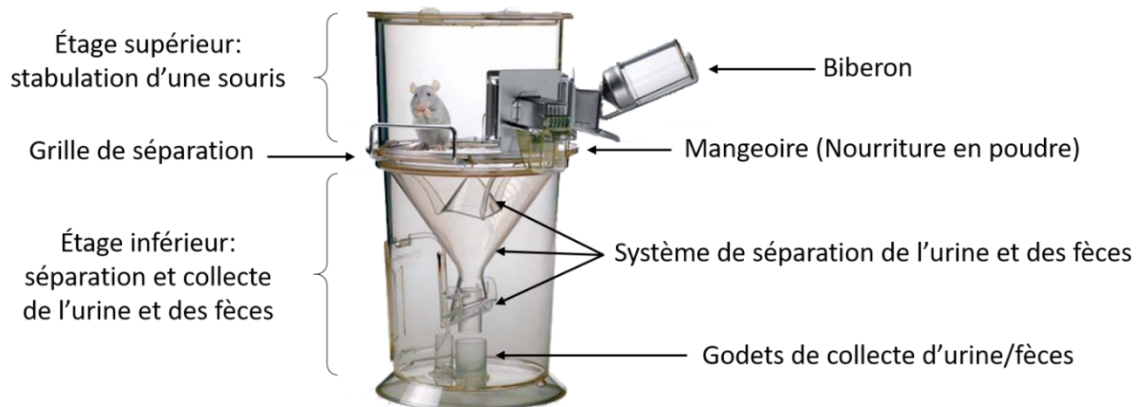
Figure 17: Cartes simplifiées des plasmides d'expression pCDNA3-mKir4.2 (à gauche) et pCDNA3-rKir5.1 (à droite) contenant les séquences codantes de Kir4.2 ou Kir5.1

À l'aide de ces plasmides, Kir4.2 et Kir5.1 ont été exprimées dans la lignée cellulaire proximale d'opossum OK, fournie par le Pr. Olivier Devuyst (Université de Zürich, Suisse). Ces cellules ont été cultivées dans des plaques 6 puits à 37 °C + 5 % CO₂ dans un milieu α MEM (Gibco) supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal (Eurobio) et 1 % d'un mix pénicilline/streptomycine. Elles ont ensuite été transfectées durant 5 heures avec 3 μ g de pCDNA3 (1.5 μ g de pCDNA3-mKir4.2 et/ou 1.5 μ g de pCDNA3-rKir5.1, ajustés si nécessaire à 3 μ g avec un vecteur pCDNA3 vide) et 7 μ l de l'agent de transfection "Lipofectamine 2000" (ThermoFischer). Les cellules ont été utilisées 48 heures après transfection.

II. Analyses métaboliques

1. Phénotypage et analyse de la fonction rénale en cage à métabolisme

L'analyse du phénotype et de la fonction rénale des souris *Kcnj15^{-/-}* a été réalisée à l'aide de cages à métabolisme (Techniplast), dans lesquelles les souris sont placées individuellement. Ces cages contiennent 2 étages: l'étage supérieur, dans lequel se trouvent 2 loges pour un biberon et une mangeoire, est séparé de l'étage inférieur par une grille sur laquelle est posée la souris. Dans cet étage, la souris est libre de ses mouvements et à un accès *ad libitum* aux contenus du biberon et de la mangeoire. Dans l'étage inférieur, un système d'entonnoirs et d'entretoises permet de collecter séparément l'urine et les fèces produits par la souris, dans 2 godets [voir Figure 18]. Le godet de collecte d'urine contient du thymol et de l'huile minérale afin d'éviter la dégradation bactérienne des ions NH_4^+ , le dégazage du CO_2 et le changement du pH de l'urine entre deux relevés métaboliques (Nicar *et al.*, 1987).



*Figure 18: Photographie légendée d'une cage à métabolisme utilisée afin d'évaluer la fonction rénale des souris *Kcnj15^{-/-}* par des recueils urinaires fréquents en régime contrôlé*

Des souris *Kcnj15^{-/-}* et *Kcnj15^{+/+}*, choisies selon des critères précédemment mentionnés, ont été placées durant 8 jours dans ces cages à métabolisme (voir section Matériel et Méthodes n°1 I.1). La nourriture présente dans la mangeoire est le régime standard A04-SAFE utilisé durant l'élevage mais en poudre et l'eau du biberon est déminéralisée. Lors de l'application d'une charge acide élevée, l'eau du biberon est supplémentée avec 0.28M de NH_4Cl et 0.3M de sucrose. Les ions NH_4^+ ingérés ainsi sont métabolisés par le foie en urée, consommant des ions HCO_3^- plasmatiques (Kurtz, 2004; Taylor & Curthoys, 2004). Afin de laisser le temps aux souris de s'habituer à leur environnement et à la nourriture en poudre, donc de stabiliser leur poids, leur prise d'eau et de nourriture, la période expérimentale débute après une période de 4 jours dite d'"habitation", excepté lors des expérimentations de 8 jours en charge acide élevée.

Chaque jour à heure fixe, lors de la période expérimentale, le poids des souris est mesuré, ainsi que le poids de l'eau ou de la nourriture qu'elles ont individuellement ingéré en une journée. L'urine des dernières 24 heures est aussi recueillie, pour analyse de sa composition.

À la fin de la période expérimentale, un prélèvement sanguin rétro-orbital est réalisé sur animal vigile pour analyse de sa composition en gaz du sang, puis les souris sont sacrifiées (voir section Matériel et Méthodes n°1 I.1). Au moment du sacrifice, le sang des souris a été récupéré par ponction intracardiaque en tube hépariné et leurs organes ont été prélevés. Le sang a permis l'extraction par centrifugation de plasma, tandis que les organes ont été cryoconservés avant leur utilisation. Si un suivi régulier de l'état acido-basique des souris était nécessaire, des prélèvements rétro-orbitaux de sang ont été effectués au début, après 48 heures et après 8 jours de stabulation en cage à métabolisme. Le prélèvement sanguin est accompagné d'une injection intra-péritonéale d'un volume équivalent de sérum physiologique stérile (0.9 % NaCl).

2. Analyses des recueils urinaires et des prélèvements sanguins

Les prélèvements de sang veineux rétro-orbitaux ont immédiatement été analysés à l'aide d'un automate *epoc blood system analysis* (Alere) qui permet de mesurer le pH, l'hématocrite, la glycémie, la lactatémie, la pO_2 , la pCO_2 , les concentrations en ions Cl^- , HCO_3^- et en Ca^{2+} ionisé. Le plasma et l'urine ont été analysés à l'aide d'un automate *Konelab 20i Analyzer* (ThermoFischer) qui permet de mesurer les concentrations en créatinine, en protéine, en urée et en ions Mg^{2+} , Ca^{2+} ou phosphates. Leurs contenus en ions Na^+ et K^+ ont été mesurés à l'aide d'un photomètre de flamme *Sherwood 420* (Servilab).

Le pH urinaire a été déterminé à l'aide d'un pH-mètre (Metrohm) relié à une électrode de petit diamètre. Les concentrations urinaires en ions NH_4^+ et en acidité titrable ont été dosées avec un titrateur *DL55* (Mettler Toledo). L'osmolarité urinaire a été mesurée grâce à un osmomètre à point de congélation *Autocal 13DR* (Hermann Røebling) sur des urines diluées 10 fois dans de l'eau déminéralisée. Enfin, l'aldostérone urinaire a été dosée par Geneviève Escher de l'équipe du Pr. Bruno Vogt (Département de Néphrologie et Hypertension, Berne, Suisse).

Toutes ces mesures ont permis de calculer un trou anionique plasmatique ou d'estimer un DFG en $\mu l/min$ selon les formules $[Na^+]+[K^+]-[Cl^-]-[HCO_3^-]$ et $[créatinine\ urinaire(mM)*Débit\ urinaire(\mu l/min)]/(créatinine\ plasmatique(\mu M)*1000$, respectivement.

III. Analyses biochimiques et moléculaires

1. Extractions d'ARNm et RT-qPCR

L'extraction d'ARNm a été réalisée par création d'une phase d'acides nucléiques, à l'aide de 1-bromo-3-chloropropane, dans le surnageant d'un lysat de rein total broyé dans du *TRI Reagent* (ThermoFischer). Cette phase a été précipitée au 2-propanol, lavée à l'éthanol et traitée par une DNase. Enfin, les ARNm ont été purifiés à l'aide du kit "*RNeasy Mini Kit*" (Qiagen). L'extraction d'ARNm depuis des segments du néphron a nécessité l'exsanguination d'un rein d'une souris sacrifiée par injection locale d'un milieu Leibovitz L-15 (ThermoFischer) supplémenté avec 300 U/ml de collagénase. La capsule et les pôles du rein prélevé ont été retirés, puis l'organe a été découpé en tranches de 1 mm dans l'axe cortico-papillaire. La médulla et le cortex ont été séparés et les fragments mis à incuber 45 minutes à 37 °C dans le milieu Leibovitz (Sigma-Aldrich) (Teulon *et al.*, 1987; Lourdel *et al.*, 2002). La collagénase dégrade les membranes basales du néphron, ce qui permet la microdissection manuelle, sous loupe binoculaire, des segments du néphron selon des critères d'identification morphologiques. Pour chaque souris, 50 fragments de chaque segment ont été isolés. Leur longueur totale (en mm) a été déterminée à l'aide d'un logiciel à partir de photographies. Ils ont ensuite été lysés dans un volume précis de tampon, puis une extraction d'ARNm a été réalisée par réaction avec de l'acide guanidinium-thiocyanate, du phénol et du chloroforme (Chabardes *et al.*, 1996).

Les ARNm extraits subissent ensuite une rétro-transcription (RT) à l'aide d'amorces hexamériques aléatoires et de la Reverse Transcriptase du kit "*Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit*" (Roche). Les ADNc obtenus ainsi ont été dilués en gamme puis amplifiés par PCR quantitative (qPCR) à l'aide du kit "*Lightcycler 480 SYBR Green I Master*" (Roche) et d'une machine de PCR en temps réel *LIGHTCYCLER 480* (Roche) selon les recommandations du fabricant. Les qPCR ont été réalisées avec des amorces conçues pour être spécifiques des ADNc désirés [voir Tableau S2 dans l'article]. Par ailleurs, des contrôles négatifs ont été réalisés, sans ADNc ou sur des échantillons rétro-transcrits sans enzyme. L'analyse quantitative en temps réel est basée sur la comparaison du nombre de cycles de PCR nécessaire à la détection de l'ADNc désiré par rapport à celui d'un ADNc contrôle (RPL26), dans chaque échantillon et dans une gamme d'ADNc. Les résultats sur rein total ont été obtenus depuis des ARNm extraits et rétro-transcrits en même temps, chez des souris *Kcnj15^{-/-}* et *Kcnj15^{+/+}* issues des mêmes périodes expérimentales de cage à métabolisme (voir section Matériel et Méthodes n°1 II.1).

2. Extraction et déglycosylation des protéines

L'extraction des protéines totales issues des organes prélevés et cryoconservés ou des cellules OK transfectées a été réalisée par lyse mécanique et incubation à 4 °C dans un tampon de lyse contenant (en mM): 150 NaCl, 50 Tris, 1 EDTA, supplémenté soit par 0.1 % de SDS et 1 % de Triton-X100, soit par 0.2 % de SDS et 1 % de NP-40, respectivement. Les tampons de lyse contenaient également un mix d'inhibiteurs de protéases "*Complete EDTA Free protease inhibitor mix*" (Sigma-Aldrich). Après centrifugation à 5000 g et 4 °C durant 10 minutes, les surnageants protéiques ont été dosés par spectrophotométrie à l'aide du kit "*BCA Protein Assay quantification kit*" (Pierce) et d'une gamme étalon de BSA, puis stockés à -80 °C.

Les déglycosylations ont été réalisées à l'aide des endoglycosidases EndoH ou PNGaseF (New England Biolabs) sur 80 µg de protéines issues d'organes ou 12 µg de protéines issues de cellules OK. La 1^{ère} enzyme clive uniquement les N-glycosylations riches en mannoses qui sont spécifiques d'une étape de maturation dans le RE, tandis que la 2^{nde} enzyme clive ces mêmes glycosylations riches en mannoses et les N-glycosylations complexes ajoutées progressivement dans l'appareil de Golgi et qui subsistent chez la protéine mature [voir Figure 19]. Pour réaliser les déglycosylations, les protéines ont été dénaturées 10 minutes à 50 °C dans une solution contenant 40 mM de DTT et 2 % de SDS, puis incubées durant 1 heure à 37 °C dans une solution contenant un tampon enzymatique et 25 U/µl de PNGaseF + 1 % de NP-40 ou 17 U/µl d'EndoH.

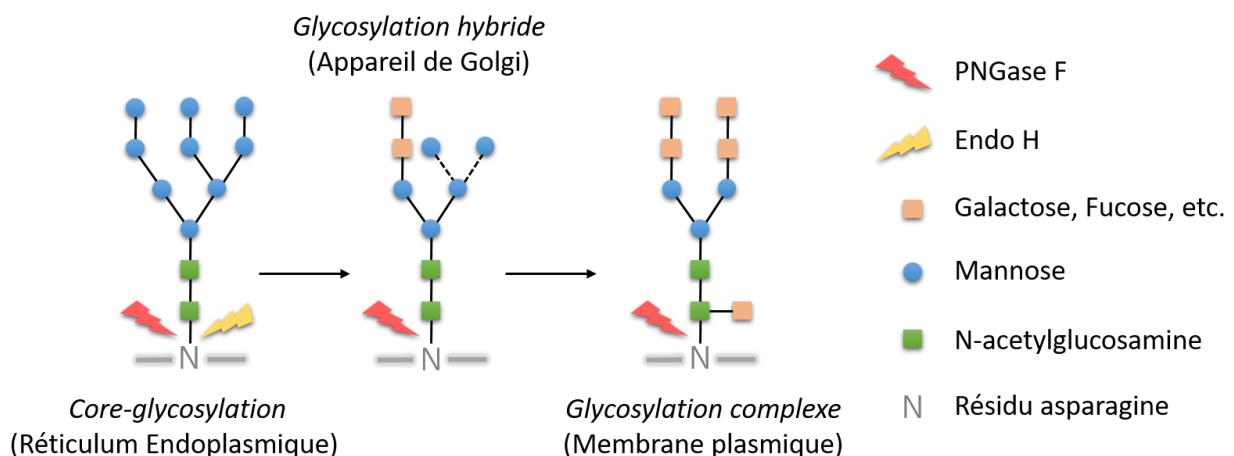


Figure 19: Sites de clivage des endoglycosidases EndoH et PNGaseF sur les formes de N-glycosylation des protéines spécifiques de leur degré de maturation (d'après Nettleship, 2012)

3. Immunomarquage des protéines par Western blot

Les Western blots ont été réalisés comme dans le cadre de la seconde étude (voir section Matériel et Méthodes n°2 III.4), avec des ajustements. Ainsi, 60 ou 10 µg de protéines dénaturées provenant d'extraits protéiques totaux d'organes ou de cellules OK ont été déposés sur gel de polyacrylamide. De plus, lorsque Kir4.2 a été immunomarké, la dénaturation dans le Laemmli L2X a été réalisée en 3 étapes: 15 minutes à 50 °C, 30 minutes à 25 °C et 15 minutes à 50 °C. Ce procédé évite la formation d'agrégats de hauts poids moléculaires de Kir4.2 tout en permettant la séparation des sous-unités Kir associées les unes aux autres en tétramères (Hill *et al.*, 2002). Les étapes de lavage et d'incubation de la membrane ont été réalisées dans un tampon PBS contenant 0.1 % de Tween20. Lorsque cela était possible, la révélation de la β-actine a permis de normaliser l'intensité des bandes immunoréactives observées pour chaque échantillon par rapport à la quantité relative de protéine déposée dans les puits. Sinon, un marquage non-spécifique au rouge Ponceau-S a été utilisé comme marqueur de dépôt des protéines.

Les anticorps primaires utilisés en Western blot et leurs dilutions ont été: APC-058 de lapin anti-Kir4.2 dilué à 0.4 µg/ml (Alomone Labs; 1:1500), dirigé contre les résidus 347-366 de la région C-terminale de la protéine (Hill *et al.*, 2002), SPC-400D de lapin anti-NHE3 (StressMark Biosciences; 1:2000) et A2228 de souris anti-β-Actine (Sigma-Aldrich; 1:20000). Deux anticorps secondaires conjugués à la HRP ont été utilisés: 170-6515 de chèvre anti-lapin (Biorad; 1:2500 ou 1:10000) et sc-2005 de chèvre anti-souris (Santa Cruz; 1:10000).

4. Co-immunoprécipitation des sous-unités Kir depuis le tissu rénal

La co-immunoprécipitation a été réalisée à l'aide du kit "*Pierce Co-immunoprecipitation kit*" (ThermoFisher) selon les recommandations du fabricant, à partir de protéines extraites dans un tampon de lyse contenant 0.02 % de sodium azide et 0.5 % de sodium-deoxycholate (Tanemoto *et al.*, 2000), depuis un rein fraîchement prélevé de souris sauvage. Brièvement, 1.5 mg de protéines rénales ont été incubés durant une nuit à 4 °C avec des billes d'agaroses sur lesquelles 15 µg d'anticorps sc-22434 de chèvre anti-Kir5.1 (Santa Cruz) ont été fixés. Après précipitation par centrifugation, lavage et élution de Kir5.1 et des protéines co-immunoprécipitées avec elle, un quart de l'éluât précipité a permis à la réalisation d'un Western blot révélant Kir5.1 et Kir4.2 avec les anticorps sc-2005 de chèvre anti-souris ou HPA-016702 de lapin anti-Kir4.2 (Sigma-Aldrich). La réaction contrôle a été réalisée par incubation des protéines dans des billes sans anticorps.

5. Marquages fluorescents et histochimiques de coupes de rein

Chez des souris *Kcnj15^{-/-}* ou *Kcnj15^{+/+}* sacrifiées, les reins ont été exsanguinés et fixés par perfusion intracardiaque de PBS + 4 % de paraformaldéhyde, puis prélevés. Les reins ont ensuite été découpés en blocs transversaux de 2 mm d'épaisseur et inclus en paraffine, ou lavés à 4 °C dans du PBS. Afin d'être congelés, les blocs lavés sont collés sur du liège à l'aide du "*Tissue-Tek OCT Compound*" (Sakura). La congélation des blocs ainsi obtenus est réalisée par 20 secondes d'immersion dans de l'isopentane refroidit à l'azote liquide, suivie d'une immersion prolongée dans de l'azote liquide. Les blocs congelés sont finalement conservés à -80 °C.

Les marquages fluorescents ont été effectués sur des coupes transversales de 7 µm d'épaisseur posées sur lame de verre, réalisées au cryostat dans les blocs de rein congelés. Ces coupes ont été incubées 1 heure dans du PBS contenant 10 % de sérum de chèvre (Sigma-Aldrich) afin de bloquer les sites de fixation non-spécifiques des anticorps. Elles ont alors été exposées durant une nuit à 4 °C avec les anticorps APC-058 de lapin anti-Kir4.2 (Alomone Labs; 1:500) ou APC-123 de lapin anti-Kir5.1 (Alomone Labs; 1:250), dilués dans la solution de blocage. Elles ont ensuite été lavées 3 fois 10 minutes au PBS et placées durant 2 heures à température ambiante dans la solution de blocage contenant du DAPI (1 µg/ml), de la Phalloidine-488 (Cytoskeleton; 1:250) et l'anticorps fluorescent A31572 d'âne anti-lapin AlexaFluor555 (ThermoFisher; 1:1000). Le DAPI est un intercalant fluorescent de l'ADN tandis que la phalloidine-488 rends l'actine fluorescente. Sur le tissu rénal, le marquage de l'actine rend fortement fluorescente la bordure en brosse des cellules proximales. Après lavage au PBS, les coupes sont montées sous lamelle dans un milieu "*Glycergel mounting medium*" (DAKO). Des coupes transversales de 7 µm d'épaisseur, réalisées au microtome depuis le tissu inclus en paraffine, ont été colorées durant quelques secondes à l'Hématoxyline. Les résultats ont été photographiés à l'aide d'un microscope confocal LSM710 ou d'un scanner automatique de lame *Axio Scan.Z1* (Zeiss). Les profils d'expression intracellulaire ont été déterminés via l'analyse d'une quinzaine de TP à l'aide du logiciel Zen Blue (Zeiss) et sont exprimés en % de l'intensité maximum observée sur l'axe a-b de 20 µm, auquel est soustrait le bruit de fond.

IV. Présentation et analyse statistique des résultats

Les résultats ont été présentés sous forme de moyenne $\pm$ erreur type ou de photographie représentative, obtenues au cours des n expériences indiquées. Les moyennes ont été comparées par des tests de Student bilatéraux. Une différence significative a été estimée lorsque $p < 0,05$.

RÉSULTATS DE LA 1^{ÈRE} ÉTUDE

I. Article n°1

Kir4.2(*Kcnj15*) deletion in mice mimics autosomal dominant isolated proximal renal tubular acidosis.

Yohan Bignon^{1,2,3,4}, Laurent Pinelli^{1,2,3,4}, Nadia Frachon^{1,2,3,4}, Olivier Lahuna⁵, Marie-Lucile Figueres^{1,2,3,4}, Stéphane Lourdel^{1,2,3,4}, Jacques Teulon^{1,2,3,4} and Marc Paulais^{1,2,3,4}

¹Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR_S 1138, Centre de Recherche des Cordeliers, 15 rue de l'école de médecine, 75006, Paris, France.

²INSERM, UMR_S 1138, Centre de Recherche des Cordeliers, 15 rue de l'école de médecine, 75006, Paris, France.

³Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, UMR_S 1138, Centre de Recherche des Cordeliers, 15 rue de l'école de médecine, 75006, Paris, France.

⁴CNRS ERL 8228, Centre de Recherche des Cordeliers, 15 rue de l'école de médecine, 75006, Paris, France.

⁵INSERM U-1016, Institut Cochin, Paris, France.

Running title: Isolated proximal renal tubular acidosis in Kir4.2(*Kcnj15*)-deleted mice

Key words: Potassium channel; *Kcnj15*; Kir4.2; Proximal Tubule; Isolated proximal acidosis

Corresponding author:

Dr. Marc Paulais,
Centre de Recherche des Cordeliers,
UMR_S 1138 – ERL 8228
15 rue de l'école de médecine
75270 PARIS CEDEX 06
France.
Phone: +33 1 44 27 51 17
E-mail: marc.paulais@inserm.fr

STATEMENT OF COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare that there is no conflict of interest

ABSTRACT

Inwardly rectifying potassium (Kir) channels formed by the heteromeric association of the Kir4.1 channel subunit with the Kir5.1 regulatory subunit are crucial for the renal function, a defect in either subunit perturbing NaCl transport by cells of the distal nephron and whole body acid-base balance. In contrast, the renal role of the closely related Kir4.2 channel subunit, possibly through its interaction with Kir5.1, was undetermined. In this study, we observed that Kir4.2 was present exclusively in proximal tubular cells of the mouse kidney where it coexisted with Kir5.1 at the basolateral membrane. *Kcnj15*(Kir4.2)-deleted mice exhibited a spontaneous hyperchloremic metabolic acidosis and an inappropriately low urinary NH_4^+ excretion rate that were exacerbated by a chronic acid load. Their distal H^+ and NH_3 secretions were intact but the expression of key proteins involved in glutamine uptake and NH_4^+ production were reduced independently of a generalized proximal tubule dysfunction. The renal consequences of the loss of function of heteromeric Kir4.2/Kir5.1 channels upon *Kcnj15* deletion in mice support the proposal of Kir4.2 as a molecular basis for the rare autosomal dominant form of human isolated proximal renal tubular acidosis.

INTRODUCTION

Renal potassium channels play critical roles in tubular ion transport with the goal of whole body homeostasis (1). Studies in mouse models and in rare inherited human disorders accumulated compelling evidence for the prominent involvement of basolateral heteromeric Kir4.1/Kir5.1 inwardly-rectifying potassium channels in the transport of NaCl by distal nephron cells (see (1) and (2) for extensive reviews). Thus, channels loss of function caused by defective Kir4.1 conductive subunits in patients carrying mutations of *KCNJ10* impairs NaCl reuptake by the early distal convoluted tubule (DCT1) and leads to a salt-wasting Gitelman-like renal tubulopathy and a metabolic alkalosis as parts of the SeSAME (for Seizures, Sensorineural deafness, Ataxia, Mental retardation and Electrolyte imbalance) (3) or EAST (for Epilepsy, Ataxia, Sensorineural deafness, and Tubulopathy) syndrome (4). Conversely, the hyperactive remaining Kir4.1 channels upon the loss of the modulatory Kir5.1 subunit in *Kcnj15*-deleted mice lead to an exaggerated NaCl transport by DCT1 cells and metabolic acidosis (5).

The transcellular reabsorption by proximal tubular cells of the bulk of substrates, such as amino-acids, glucose, phosphate and HCO_3^- , and the secretion of NH_4^{+} linked to the regeneration of HCO_3^- , also require basolateral potassium channels (1). Unlike cells of the distal nephron, proximal cells are clearly devoid of Kir4.1 (4) (6) but a high-resolution map of mRNA expression patterns in the human kidney established the presence of Kir4.2, the second member of the Kir4.x subfamily, exclusively in proximal tubules (7). In addition, Kir5.1, which can also coassemble with Kir4.2 in vitro (8), is also expressed in human proximal cells (7). Nothing is currently known about the renal role of Kir4.2 but our previous investigations on acidotic *Kcnj16*(Kir5.1)-deleted mice revealing inappropriately low NH_4^{+} excretions rates hardly explainable by disturbances in cells of the distal nephron (5) suggested that dysfunctional heteromeric Kir4.2/Kir5.1 channels in these mice may have specifically impacted proximal tubular cells.

The results of this study on *Kcnj15*(Kir4.2)- and *Kcnj16*(Kir5.1)-deleted mice point towards a loss of function of heteromeric Kir4.2/Kir5.1 channels in native mouse proximal tubular cells upon a defect in each subunit and support *KCNJ15* as a new candidate gene for the poorly elucidated rare autosomal dominant form of human isolated renal metabolic acidosis. The insertion of Kir4.2/Kir5.1 channels into the intracellular pH-based hypothesis as the mechanism underlying this disease is discussed.

RESULTS

Kir4.2 is present exclusively in mouse proximal tubular cells and may interact with Kir5.1 at the basolateral membrane. Kir4.2 and Kir5.1 are present in proximal cells of the human kidney (7), but their distributions along the rodent nephron is uncertain. We therefore first examined the expression of their mRNAs in isolated tubular segments of mouse kidney. Kir4.2 and Kir5.1 mRNAs were both expressed in proximal tubular cells (Figure 1A), but while Kir5.1 mRNA expression was widespread along the nephron, Kir4.2 was exclusively localized in proximal tubules. Interestingly, Kir4.1 mRNA was distributed in all but proximal segments, highlighting a clear differential intrarenal distribution of Kir4.x subunits.

The intrarenal distributions of Kir4.2 and Kir5.1 were further examined by immunolabelling whole kidneys sections. The use of the anti-Kir4.2 antibody in *Kcnj15^{+/+}* and *Kcnj15^{-/-}* mice established the presence of a Kir4.2-specific signal in the renal cortical and subcortical areas but not in deeper regions (Figure 1B). Using phalloidin as a marker of F-actin densely labelling proximal tubules brush border microvilli, the Kir4.2 signal followed the heavy phalloidin fluorescence tubular distribution exclusively in cortex and outer stripe (Figure 1C), and was absent in the inner stripe, devoid of proximal tubule (Supplemental Figure 1). Consistently with our RT-PCR data, proximal tubular cells were also densely labelled by the anti-Kir5.1 antibody (Figure 1D). Furthermore, analysis of higher magnification images of proximal cells of wild-type mice revealed that both anti-Kir4.2 and anti-Kir5.1 antibodies similarly labelled a region ranging from the finely phalloidin-stained basal side up to ~2/3 of proximal cells height, likely corresponding to the extensive basolateral membrane infoldings, and leaved unstained a shallow subapical region and microvilli (Figure 2 A-B). The quantification of Kir4.2 and Kir5.1 fluorescence intensities across cells height yield comparable roughly bell-shaped curves peaking few micrometers away from the the basal cell region, thus localizing each protein at or near the basolateral membrane of mouse proximal tubular cells.

We next determined whether the Kir4.2-Kir5.1 interaction seen in vitro (8) may occur in native proximal cells by immunoprecipitating solubilized whole kidney lysates of *Kcnj15*^{+/+} mice with the anti-Kir5.1 antibody. Figure 2C shows that the anti-Kir5.1 immunoprecipitants contained immunoreactivity with the anti-Kir4.2 antibody, at bands near the predicted ~40 kDa molecular mass of the monomeric peptide based on Kir4.2 cDNA length, indicating that Kir4.2 and Kir5.1 may interact in mouse native proximal tubular cells.

Kir5.1(*Kcnj16*) deletion impairs Kir4.2 complex N-glycosylation. Western blot analysis of renal extracts with the anti-Kir4.2 antibody produced Kir4.2-specific bands at ~35 and ~39 kDa and between ~46 kDa and 55 kDa, and no band at the expected size of multimers (Figure 3A, left panel). For comparison, several Kir4.2-specific bands were also obtained from lung and stomach extracts (Figure 3A, right panel), where the peptide is known to be present (9) (10), and neither monomeric nor multimeric band was detected in the other tissues tested (Supplemental Figure 2). Kir4.2 is endowed with a canonical acceptor site for N-glycosylation (10) (11) and the 39 kDa and 46-55 kDa bands reflected the glycosylated status of the Kir4.2 monomer. As illustrated in Figure 3B, the treatment of kidney, lung and stomach with Peptide-N-Glycosidase F (PNGase F), which cleaves complex, hybrid, and high-mannose glycosylations, reduced immunoreactivity to the major band at ~35 kDa. Strikingly, kidneys extracts from Kir5.1(*Kcnj16*)-deleted mice revealed a dramatic decrease in the 46-55 kDa bands (Figure 3C), indicating Kir5.1-dependent post-translational modifications of Kir4.2. The question of whether *Kcnj16* deletion altered Kir4.2 processing was further studied in vitro. As shown in Figure 3D, western blot analysis with anti-Kir4.2 antibody of total lysates of OK cells expressing either Kir4.2 alone or in combination with Kir5.1 reproduced the results obtained on native renal tissues from *Kcnj16*^{+/+} and *Kcnj16*^{-/-} mice. Immunoreactive bands were detected at ~ 36 kDa and ~39 kDa in both conditions, while bands in the ~ 48-55 kDa range that were observed with both subunits disappeared in the absence of Kir5.1.

When lysates of cells expressing both subunits were treated with Endoglycosidase H (Endo H), which cleaves high-mannose and some hybrid forms of N-linked glycoproteins, only the ~39 kDa band was sensitive to Endo H (Figure 3D). Therefore, the ~39 kDa protein contains high-mannose glycosylation and is localized in the endoplasmic reticulum, while the ~48-55 kDa protein contains more complex glycosylation. Consistently, the ~48-55 kDa bands were sensitive to PNGase F, the core protein migrating with an apparent molecular size of ~36 kDa. Therefore, Kir5.1 promotes Kir4.2 complex N-glycosylation in both cultured and native renal cells.

***Kcnj15*-deficient mice exhibited spontaneous renal tubular metabolic acidosis and reduced urinary NH₄⁺ excretion ability.** We next observed the impact of Kir4.2 deletion on the renal function. As summarized in Figure 4, *Kcnj15*^{-/-} mice exhibited a mild but significant spontaneous hyperchloremic metabolic acidosis, as attested by their low plasma pH, a low plasma HCO₃⁻ content counterbalanced by an equivalent increase in Cl⁻ concentration, and a normal plasma anion gap (Table 1). Although Kir4.2 is thought to be involved in H⁺ secretion by gastric parietal cells (9) and airway gland serous cells (12), these observations are in clear contrast with the expected severe hypochloremic metabolic alkalosis resulting from a major loss of gastric H⁺ secretion (13) or with an obstructive airway disease eventually leading to perturbations in ventilation (14).

An increased urinary net acid excretion (NAE), mainly under the form of high NH₄⁺ and free H⁺ contents, is the normal renal response to chronic metabolic acidosis. As also shown in Figure 4, acidotic *Kcnj15*^{-/-} mice exhibited no elevation in NH₄⁺ excretion, and an increase in titratable acidity solely accounted for their slightly higher urinary NAE. This is consistent with a renal defect, the unaltered estimated glomerular filtration rate (Table 2) further pointing towards a tubular abnormality.

According to ammonia pKa (~ 9.25), a low NH_4^+ excretion rate could be associated an alkaline urine owing to a reduced capacity to secrete H^+ . However, *Kcnj15*^{-/-} mice not only achieved a low urinary pH but had indeed a ~ 0.5 pH unit more acidic urine than that of *Kcnj15*^{+/+} mice (Figure 4), indicating their intact ability to secrete H^+ .

The ability of *Kcnj15*^{-/-} mice to excrete appropriate amounts of NH_4^+ was further investigated under chronic oral NH_4^+ -induced acid load conditions. After two days, although both *Kcnj15*^{-/-} and *Kcnj15*^{+/+} mice exhibited significant falls in blood pH and bicarbonate content, and an increase in blood chloride level, the degree of acidosis in *Kcnj15*^{-/-} mice was more profound (Figure 5 A-C). Then, while *Kcnj15*^{+/+} mice completely recovered after eight days of acid load, the metabolic acidosis was sustained in *Kcnj15*^{-/-} mice indicating their reduced ability to overcome acidosis. In parallel, although both groups of acid-loaded mice lowered their urinary pH and increased their urinary NH_4^+ excretion rates, the urinary NH_4^+ excretion in *Kcnj15*^{-/-} mice, hence the urinary NAE, remained significantly lower than in *Kcnj15*^{+/+} mice (Figure 5 D-E). Despite their persistent metabolic acidosis and low urinary pH, *Kcnj15*^{-/-} mice clearly did not match distal H^+ secretion by an appropriate NH_4^+ excretion (Figure 5F).

Glutamine uptake and ammoniagenesis are reduced in *Kcnj15*^{-/-} mice. In addition to their intact free acid secretion ability, *Kcnj15*^{-/-} mice did not show hyperkalemia, increased urine aldosterone level, potassium or sodium wasting, and concentrated their urine as much as did *Kcnj15*^{-/-} mice under standard (Table 2) and acid-load (Supplemental Table 1) conditions. The low NH_4^+ content in their final urine was therefore, not related to a reduced transfer rate of NH_3 into the lumen of the collecting duct, as well as to a defective axial NH_3 accumulation into the hypertonic medullary interstitium, but rather to an altered ammonia excretion by proximal tubular cells.

The neutral amino acids transporter SNAT3 is thought to mediate the basolateral uptake by proximal cells of glutamine (15), the primary metabolic source for renal ammoniagenesis (16). Here, the basal expression of SNAT3 mRNA in *Kcnj15*^{-/-} mice was ~ 25% lower than in wild-type littermates and, although a 2-day NH₄Cl-induced acid load significantly increased SNAT3 mRNA expression in both groups, the increase in *Kcnj15*^{-/-} mice was ~threefold less than in *Kcnj15*^{+/+} mice (Figure 6A). In contrast, the basal expressions of the glutamine transporters B⁰AT1 and LAT2 were similar in the two groups and barely modified by the acid load.

Glutamine is then predominantly metabolized by the mitochondrial or cytoplasmic enzymes PDG, GDH and PEPCK (15). As also shown in Figure 6 A, the respective basal expressions of PDG and GDH mRNA in both groups of mice were similar but that of PEPCK in *Kcnj15*^{-/-} mice was dramatically lower than in *Kcnj15*^{+/+} mice. In addition, while all three genes were upregulated by the acid load in *Kcnj15*^{+/+} mice, as expected (15), there was no rise in PDG mRNA expression in acid-loaded *Kcnj15*^{-/-} mice and, although increased, the respective GDH and PEPCK mRNA expressions levels remained significantly lower than in *Kcnj15*^{+/+} mice. In contrast, *Kcnj15* deletion had no influence on the protein expression of NHE-3, the major pathway for NH₄⁺ secretion from proximal tubular cells, both under basal and acid load conditions (Figure 6B).

Altogether, reduced basal and acid load-induced glutamine uptake and metabolism upon Kir4.2 deletion accounted for the reduced proximal NH₄⁺ excretion. Furthermore, this occurred in the absence of proteinuria, glucosuria, phosphaturia or polyuria (Table 2 and Supplemental Table 1), i.e. outside the context of a generalized proximal tubule dysfunction.

DISCUSSION

The ability of the kidney to maintain body homeostasis depends on the activity of inwardly rectifying potassium (Kir) channels belonging to the *Kcnj* gene family in epithelial cells along the distal nephron (1) (2). ROMK (Kir1.1, *Kcnj1*), the founding member of the Kir family, is responsible for the apical K⁺ efflux required for NaCl reabsorption by the thick ascending limb and provides the more distal K⁺ secretory pathway essential for K⁺ homeostasis. Also, distal NaCl reabsorption is under the powerful influence of basolateral Kir4.1/Kir5.1 channels through their control of the membrane voltage of DCT1 cells. This study adds Kir4.2/Kir5.1 channels to the list and expands our current view of the distribution of functionally relevant Kir channels to proximal tubular cells.

Mice lacking the Kir4.2 subunit developed a spontaneous metabolic acidosis of renal origin associated with a reduced ammonia excretion. Clinical and functional studies classified renal tubular acidoses (RTA) into distal (dRTA or type 1), proximal (pRTA or type 2), hyperkalemic distal (type 4), and mixed proximal-distal (type 3) RTAs (17). The normal distal nephron function in *Kcnj15*^{-/-} mice, their ability to maximally acidify their urine, and the absence of true or apparent hypoaldosteronism and of hyperkalemia clearly rule out RTAs of types 1, 3 and 4. Strikingly, invalidated mice exhibited no sign of a generalized proximal tubule dysfunction, a hallmark of the common secondary type 2 RTA as part of Fanconi syndrome (17). However, human pRTA also clinically exists as a rare persistent primary (i.e. isolated or pure) proximal lesion occurring without alteration in the tubular transport of solutes, either as an autosomal recessive or dominant mode of inheritance (17). Autosomal recessive isolated pRTA, the commonest form of isolated pRTA, is classically linked to mutations in SLC4A4 leading to alteration in the structural properties, trafficking and function of the Na⁺/HCO₃⁻ transporter NBCe1-A (18).

Owing to the wide SLC4A4 expression among tissues, acidotic patients also exhibit extrarenal symptoms including severe growth and mental retardation, ocular abnormalities eventually leading to blindness, enamel defects and pancreatitis. Moreover, the renal autosomal recessive isolated pRTA is usually severe, associated with hypokalemia, and maximal NH_4^+ excretion rates were reported to be appropriate to acidosis both under basal (19) (20) (21) and NH_4Cl loading test (21) conditions. Our observations in *Kcnj15*^{-/-} mice clearly contrast with this autosomal recessive form of isolated pRTA but are reminiscent of its very rare autosomal dominant form diagnosed in members of two families originating from Costa Rica and Syria (22) (23). These patients exhibited a normokalemia and intact capabilities to concentrate and distally acidify their urine, spontaneously had a ~ 0.5 pH unit more acidic urine than that of control subjects and inappropriately low NH_4^+ excretion rates (22) (23) (24). Furthermore, a chronic NH_4Cl acid-loading test highlighted their inability to excrete NH_4^+ in amounts appropriate to their more severe and sustained acidosis and to an even lower urine pH (24). However, the restricted number of patients and the unavailability of renal biopsies precluding the use of wide genome, positional cloning or gene expression strategies, the molecular basis for the cause of human autosomal dominant isolated pRTA is currently unknown. Indeed, this question was addressed in only one study using the candidate gene approach and no mutation was detected in the coding regions and splice sites of genes encoding the carbonic anhydrases II, IV and XIV, the $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ cotransporter NBCe1-A, the Na^+/H^+ exchangers NHE3 and NHE8 and their regulatory cofactors NHERF1 and NHERF2 (23). Our results in mice support *KCNJ15* as a new candidate gene of human autosomal dominant isolated pRTA.

A defect in proximal NH_4^+ production and/or excretion in patients with autosomal dominant isolated pRTA was speculated (22) (24), but nothing is currently known on the underlying cellular mechanism. Our results in *Kcnj15*^{-/-} mice clearly demonstrated a major reduction in expressions levels of key proteins involved in glutamine uptake (SNAT3) and in NH_4^+ production (PEPCK, GDH and PDG), but the precise mechanism remains to be fully characterized. Halperin et al proposed that an alteration in the HCO_3^- basolateral exit step should result in an increase in pH_i and account for the impaired NH_4^+ production and excretion in patients (25). Supporting this hypothesis are the reduced ammoniagenesis and the severe metabolic acidosis in mice deleted for NBCe1-A(Slc4a4) (26), which mediates the basolateral exit of HCO_3^- from proximal tubular cells (18), a condition prone to increase pH_i (27) and which decreases the transcription of PEPCK mRNA and the stability of SNAT3, GDH and PDG mRNAs (28) (29). However, as already mentioned, no inactivating mutation in SLC4A4 was found in patients with autosomal dominant isolated pRTA (23). We thus propose here an alternative schema involving an indirect modulation of NBCe1-A transport. With an apparent stoichiometry of 1Na^+ for 3HCO_3^- , the reversal potential of the electrogenic NBCe1-A cotransporter is only slightly more positive than the resting membrane potential of proximal tubular cells (30). This is sufficient to drive HCO_3^- reabsorption across the basolateral membrane under physiological conditions but renders both the magnitude and polarity of HCO_3^- transport sensitive to changes in membrane potential. Accordingly, the exposure of microperfused rat proximal tubules to barium, a wide spectrum blocker of potassium channels, increased pH_i (31). Channels formed by the Kir4.2 subunit likely participate to the maintenance of membrane potential of proximal tubular cells and their loss of function upon *Kcnj15* deletion would depolarize the cell membrane and in turn reduce or even reverse the driving force for the NBCe1-A-dependent exit of HCO_3^- , leading to an intracellular accumulation of HCO_3^- , an increased pH_i and a reduced ammoniagenesis.

N-glycosylation is a major translational step for the proper membrane targeting of many proteins (32). We showed here that Kir4.2 alone indeed does acquire N-linked high mannose glycosylation but also that its complex N-glycosylation, an index of the proper membrane expression of inwardly rectifying potassium channels (33), necessitates the presence of Kir5.1. These observations are reminiscent of original results from in vitro studies suggesting the need for Kir5.1 to overcome the intracellular retention of a large population of Kir4.2 proteins when expressed alone (11) (34) and to target functional channels to the plasma membrane (10). We previously showed that mice lacking the Kir5.1 subunit exhibited a phenotype mirroring the salt-wasting SeSAME/EAST tubulopathy and currently attributed to the membrane expression of homomeric Kir4.1 channels in DCT1 cells (5). That the absence of Kir5.1 also hampers the formation of functional Kir4.2 subunits at the membrane of proximal tubular cells and likely reduces ammoniagenesis, points towards a picture more complex than initially thought and may provide a mechanism for the yet unexplained low NH_4^+ excretion rates in *Kcnj16*^{-/-} mice (5).

Within the recent few years, numerous studies shed light on the prominent role of heteromeric Kir4.1/Kir5.1 channels in the physiology and physiopathology of the distal nephron (1) (2) (4). By setting the membrane potential of DCT1 cells, Kir4.1/Kir5.1 channels are currently viewed as potassium sensors translating potassium homeostasis to WNK-SPAK mediated regulation of the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter NCC, via changes in membrane potential and intracellular chloride (2). We anticipate that Kir4.2/Kir5.1 channels will emerge as a new clinically relevant potassium sensor in proximal tubular cells, intimately linking acid-base balance to potassium intake (35), possibly through changes in membrane potential, intracellular pH and ammonia metabolism.

CONCISE METHODS

Mice. Mice carrying a disrupted *Kcnj15* gene and their wild-type littermates were obtained as described in the Supplemental Methods section. After weaning, mice were fed with pellets of a complete 0.25% Na⁺, 0.6% K⁺, 0.73% Ca²⁺ SAFE-A04 maintenance diet (Usine d'Alimentation Rationnelle, Augy, France) with free access to tap water until the beginning of the experiment. In all experiments, *Kcnj15*^{+/-} littermates of *Kcnj15*^{-/-} mice were used as controls. Kidney samples from *Kcnj16*^{+/+} and *Kcnj16*^{-/-} mice were from a previous study (5). Organs retrievals were performed on mice anesthetized by the intraperitoneal injection of ketamine (0.12 mg/g BW) and xylazine (0.006 mg/g BW).

Opossum kidney (OK) cells culture and transfection. OK cells were kindly provided by Pr O. Devuyst (University of Zurich, Zurich, Switzerland) and grown at 37 °C and 5 % CO₂ in Alpha Modified Eagle's Medium (Invitrogen, Villebon sur Yvette, France) supplemented with 10% fetal bovine serum (Eurobio, Courtaboeuf, France) and a penicillin/streptomycin mix (ThermoFisher Scientific, Villebon sur Yvette, France) at final concentrations of 100 U/ml and 100 mg/ml, respectively. Mycoplasma-free OK cells were then used forty-eight hours after transfection in 6-well plates using 7 µl of Lipofectamine2000[®] Transfection Reagent (ThermoFischer Scientific, Villebon sur Yvette, France) mixed with 1.5 µg of pcDNA3-Kir4.2 and/or 1.5 µg of pcDNA-Kir5.1 plasmids (see Supplemental Methods section). When appropriate, the total amount of transfected DNA-Kir was adjusted to 3 µg per well using an empty pcDNA3 vector.

Metabolic studies. Metabolic studies were performed in metabolic cages on mice fed with SAFE-A04 powder chow with free access to either deionized water alone or deionized water containing 0.28M NH₄Cl and 0.3M sucrose, when appropriate. The methods used for collections and analyses of urine and blood samples were as previously described (5) with the minor modifications listed in the Supplemental Methods section.

Real-time PCR. The procedure used for the extraction of whole kidney mRNAs and real-time PCR are given in the Supplemental Methods section. The amount of PCR product in each sample was calculated as the percentage of a RNA standard curve established with serial dilutions of a mouse whole kidney cDNA stock solution (6) (36), then revised according to the amount of PCR product for mRNA of the housekeeping RPL26 gene. Real-time PCR on microdissected glomeruli or tubular segments and quantification were as previously described (6) (36). The list of all specific primers for mouse genes is given in Supplemental Table 2.

Protein extraction. For western blot experiments, OK cells or mouse tissues snap-frozen into liquid-nitrogen were mechanically homogenized and incubated in a ice-cold lysis buffer containing in mM 150 NaCl, 50 Tris, 1 EDTA supplemented with respectively 0.1 % SDS and 1 % Triton-X100 or 0.2 % SDS and 1 % NP-40. For Co-immunoprecipitation, protein extraction was performed on freshly retrieved kidneys using lysis buffer supplemented with 0.02 % sodium azide and 0.5 % sodium-deoxycholate as previously described (37). All lysis buffers were enriched with 1X cOmplete™ EDTA Free Protease Inhibitor Cocktail (Roche Diagnostics, Meylan, France). After a centrifugation at 5,000 g for 10 minutes, protein contents of supernatants were measured using the Pierce™ BCA Protein Assay Kit (ThermoFischer Scientific, Villebon sur Yvette, France).

Western blotting. Western blots were performed in the conditions given in the Supplemental Methods section. Indirect protein detection was performed by chemiluminescence using the Pierce™ ECL Western Blotting Substrate (ThermoFischer Scientific). The protein signal was quantified using the ImageJ freeware (NIH, Bethesda, USA) and routinely normalized on β -actin signal. Otherwise, a Ponceau-S (Sigma Aldrich Chemie) staining performed on the same membrane after the transfert procedure was used as loading control.

Deglycosylation experiments. Deglycosylation procedures were performed on 80 µg or 12 µg of total protein extracts from mouse renal tissue or OK cells, respectively. Briefly, proteins were denaturated for 10 minutes at 50 °C in a 20 µl solution containing 40 mM DTT and 2 % SDS, then deglycosylated for 1 hour at 37 °C in a 30 µl solution containing the appropriate enzyme buffer and 25 U/µl of PNGase F supplemented with 1 % NP-40 or 17 U/µl of Endo H (New England Biolabs, Evry, France).

Co-immunoprecipitation. The co-immunoprecipitation assay was performed using the Pierce™ Co-immunoprecipitation kit (ThermoFisher Scientific) according to manufacturer's instruction. Briefly, 1.5 mg of whole kidney proteins extract were pre-cleared by incubation with empty agarose beads and then incubated overnight at 4 °C with agarose beads on which 15 µg of anti-Kir5.1 antibody (see the Supplemental Methods section for antibody details) were previously immobilized. The negative control was performed by incubating proteins overnight with agarose beads alone.

Immunohistochemistry. Immunohistochemistry was performed as described in the Supplemental Methods section. Labelled slices were then examined using either a LSM710 laser scanning confocal microscope or an Axio Scan.Z1 digital slide scanner (Carl Zeiss, Marly Le Roy, France) and 16 bits-depth images were analyzed offline with the Zeiss Zen software. Intensity profiles on each fluorescence channel (see Results) were drawn from the corresponding background-subtracted signal, normalized to its maximum value over the measurement distance.

Statistics. Results are given as means ± SEM for the indicated number of experiments. Statistical significance of difference between means was evaluated by bilateral Student's *t* test using Systat SIGMASTAT software (Ritme Informatique, Paris, France). *P* < 0.05 was considered as significant.

Study approval. Mice were housed in the Centre d'Explorations Fonctionnelles (UMRS1138, Paris, France; Permit B75-06-12). All animals used in this study were handled in full compliance with the french government welfare policy. The scientific project and the experimental procedures were favorably evaluated by the Charles Darwin Ethics Committee for animal experimentation (Permit 03-MP/8569/(0)). The confined usage of genetically modified organisms (Class 1) was registered with the french Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

AUTHORS CONTRIBUTIONS

JT, SL and MP conceived, designed, and oversaw the project. YB and MP conceived and designed the experiments. YB, LP, NF, OL, MLF and MP performed the experiments, with the majority done by YB. YB, LP and MP analyzed the data. MP wrote the manuscript and all authors revised the paper.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Nathalie Reveilleau and Stéphanie Baron (Unité d'explorations fonctionnelles métaboliques et rénales in vivo, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France) for their expert technical assistance in the measurement of urine NH_4^+ and titratable acidity in mice. We are also grateful to Christophe Klein and Kévin Garbin (Centre d'Imagerie Cellulaire et de Cytométrie, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France) for their help with microscopy resources, and to the members of the Centre d'Explorations Fonctionnelles and of the Centre de Génotypage et de Biochimie (Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France) for taking care of mice and genotyping. Y.B. and L.P. hold PhD fellowships from the french Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur.

FOOTNOTES

*In this paper, the term “ammonia” refers to the combination of NH_3 and NH_4^+ . The term “ NH_3 ” or “ NH_4^+ ” is used only when referring to a specific molecular form.

REFERENCES

1. Hamilton KL, Devor DC. Basolateral membrane K⁺ channels in renal epithelial cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2012;302(9):F1069-1081.
2. Welling PA. Roles and Regulation of Renal K Channels. *Annu. Rev. Physiol.* 2016;78:415–435.
3. Scholl UI et al. Seizures, sensorineural deafness, ataxia, mental retardation, and electrolyte imbalance (SeSAME syndrome) caused by mutations in KCNJ10. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2009;106(14):5842–5847.
4. Bockenhauer D et al. Epilepsy, ataxia, sensorineural deafness, tubulopathy, and KCNJ10 mutations. *N. Engl. J. Med.* 2009;360(19):1960–1970.
5. Paulais M et al. Renal phenotype in mice lacking the Kir5.1 (Kcnj16) K⁺ channel subunit contrasts with that observed in SeSAME/EAST syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2011;108(25):10361–10366.
6. Lachheb S et al. Kir4.1/Kir5.1 channel forms the major K⁺ channel in the basolateral membrane of mouse renal collecting duct principal cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2008;294(6):F1398-1407.
7. Chabardès-Garonne D et al. A panoramic view of gene expression in the human kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003;100(23):13710–13715.
8. Pessia M, Imbrici P, D’Adamo MC, Salvatore L, Tucker SJ. Differential pH sensitivity of Kir4.1 and Kir4.2 potassium channels and their modulation by heteropolymerisation with Kir5.1. *J. Physiol.* 2001;532(Pt 2):359–367.
9. He W et al. Acid secretion-associated translocation of KCNJ15 in gastric parietal cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2011;301(4):G591-600.
10. Pearson WL, Dourado M, Schreiber M, Salkoff L, Nichols CG. Expression of a functional Kir4 family inward rectifier K⁺ channel from a gene cloned from mouse liver. *J. Physiol.* 1999;514 (Pt 3):639–653.
11. Shuck ME et al. Cloning and characterization of two K⁺ inward rectifier (Kir) 1.1 potassium channel homologs from human kidney (Kir1.2 and Kir1.3). *J. Biol. Chem.* 1997;272(1):586–593.
12. Wu JV, Krouse ME, Rustagi A, Joo NS, Wine JJ. An inwardly rectifying potassium channel in apical membrane of Calu-3 cells. *J. Biol. Chem.* 2004;279(45):46558–46565.
13. Gennari FJ, Weise WJ. Acid-base disturbances in gastrointestinal disease. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2008;3(6):1861–1868.
14. Fischer H, Widdicombe JH. Mechanisms of acid and base secretion by the airway epithelium. *J. Membr. Biol.* 2006;211(3):139–150.
15. Moret C et al. Regulation of renal amino acid transporters during metabolic acidosis. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2007;292(2):F555-566.
16. Weiner ID, Hamm LL. Molecular mechanisms of renal ammonia transport. *Annu. Rev. Physiol.* 2007;69:317–340.
17. Fry AC, Karet FE. Inherited renal acidoses. *Physiol.* 2007;22:202–211.
18. Kurtz I, Zhu Q. Proximal renal tubular acidosis mediated by mutations in NBCe1-A: unraveling the transporter’s structure-functional properties *Front. Physiol.* 2013;4.
19. Igarashi T et al. Persistent isolated proximal renal tubular acidosis--a systemic disease with a distinct clinical entity. *Pediatr. Nephrol.* 1994;8(1):70–71.

20. Winsnes A, Monn E, Stokke O, Feyling T. Congenital persistent proximal type renal tubular acidosis in two brothers. *Acta Paediatr. Scand.* 1979;68(6):861–868.
21. Donckerwolcke RA, van Stekelenburg GJ, Tiddens HA. A case of bicarbonate-losing renal tubular acidosis with defective carboanhydrase activity. *Arch. Dis. Child.* 1970;45(244):769–773.
22. Brenes LG, Brenes JN, Hernandez MM. Familial proximal renal tubular acidosis. A distinct clinical entity. *Am. J. Med.* 1977;63(2):244–252.
23. Katzir Z 'ev, Dinour D, Reznik-Wolf H, Nissenkorn A, Holtzman E. Familial pure proximal renal tubular acidosis--a clinical and genetic study. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2008;23(4):1211–1215.
24. Brenes LG, Sanchez MI. Impaired urinary ammonium excretion in patients with isolated proximal renal tubular acidosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1993;4(4):1073–1078.
25. Halperin ML, Kamel KS, Ethier JH, Magner PO. What is the underlying defect in patients with isolated, proximal renal tubular acidosis? *Am. J. Nephrol.* 1989;9(4):265–268.
26. Handlogten ME et al. NBCe1 expression is required for normal renal ammonia metabolism. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2015;309(7):F658–666.
27. Muto S, Miyata Y, Imai M, Asano Y. Troglitazone stimulates basolateral rheogenic $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ cotransport activity in rabbit proximal straight tubules. *Exp. Nephrol.* 2001;9(3):191–197.
28. Curthoys NP, Gstraunthaler G. Mechanism of increased renal gene expression during metabolic acidosis. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2001;281(3):F381–390.
29. Balkrishna S, Bröer A, Welford SM, Hatzoglou M, Bröer S. Expression of Glutamine Transporter Slc38a3 (SNAT3) During Acidosis is Mediated by a Different Mechanism than Tissue-Specific Expression. *Cell. Physiol. Biochem.* 2014;33(5):1591–1606.
30. Soleimani M, Grassi SM, Aronson PS. Stoichiometry of $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ cotransport in basolateral membrane vesicles isolated from rabbit renal cortex.. *J. Clin. Invest.* 1987;79(4):1276–1280.
31. Alpern RJ. Mechanism of basolateral membrane $\text{H}^+/\text{OH}^-/\text{HCO}_3^-$ transport in the rat proximal convoluted tubule. A sodium-coupled electrogenic process. *J. Gen. Physiol.* 1985;86(5):613–636.
32. Moremen KW, Tiemeyer M, Nairn AV. Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2012;13(7):448–462.
33. Conti LR, Radeke CM, Vandenberg CA. Membrane targeting of ATP-sensitive potassium channel. Effects of glycosylation on surface expression. *J. Biol. Chem.* 2002;277(28):25416–25422.
34. Derst C et al. A hyperprostaglandin E syndrome mutation in Kir1.1 (renal outer medullary potassium) channels reveals a crucial residue for channel function in Kir1.3 channels. *J. Biol. Chem.* 1998;273(37):23884–23891.
35. Karet FE. Mechanisms in hyperkalemic renal tubular acidosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2009;20(2):251–254.
36. Paulais M, Lachheb S, Teulon J. A Na^+ - and Cl^- -activated K^+ channel in the thick ascending limb of mouse kidney. *J. Gen. Physiol.* 2006;127(2):205–215.
37. Tanemoto M, Kittaka N, Inanobe A, Kurachi Y. In vivo formation of a proton-sensitive K^+ channel by heteromeric subunit assembly of Kir5.1 with Kir4.1. *J. Physiol.* 2000;525 Pt 3:587–592.

FIGURES & LEGENDS

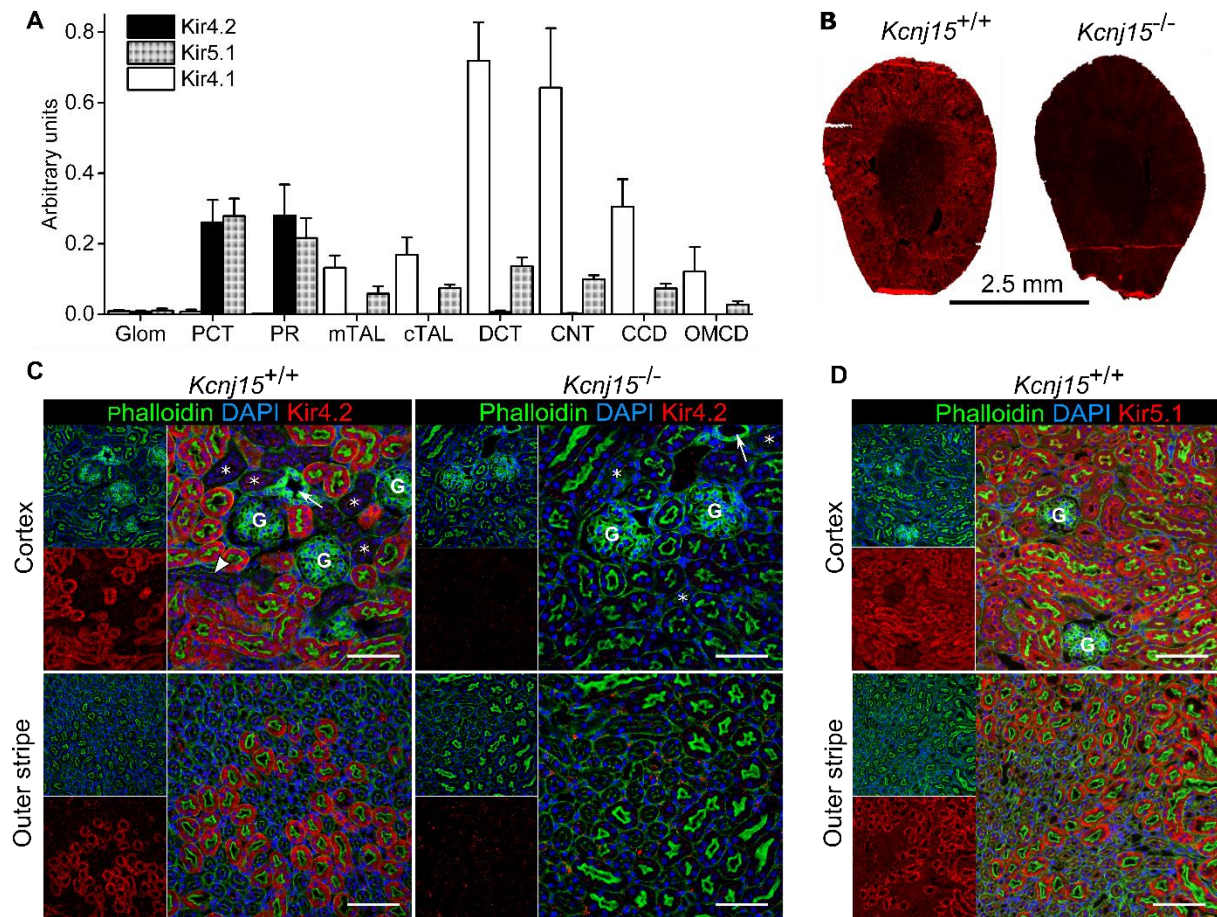


Figure 1. Kir4.2 is exclusively present in mouse proximal tubular cells where it coexists with Kir5.1. (A) Kir4.2 and Kir5.1 mRNAs distribution along the nephron (n = 5 to 10 wild-type mice). Data on Kir4.1 mRNA expression are also given for comparison. *Glom*: Glomerulus; *PCT*: Proximal Convoluted Tubule; *PR*: Pars Recta; *mTAL* and *cTAL* : medullary and cortical Thick Ascending Limbs, respectively; *DCT*: Distal Convoluted Tubule; *CNT*: Connecting Tubule; *CCD*: Cortical Collecting Duct; *OMCD*: Outer Medullary Collecting Duct. (B) Scanned *Kcnj15*^{+/+} (left) and *Kcnj15*^{-/-} (right) mice whole kidneys cross sections probed with rabbit anti-Kir4.2 antibody. (C and D) Confocal images of sections of *Kcnj15*^{+/+} and *Kcnj15*^{-/-} mice kidneys stained with Alexa Fluor® 488 phalloidin (green) and DAPI (blue) and probed with either rabbit anti-Kir4.2 (C) or rabbit anti-Kir5.1 (D) antibody (red). G : Glomerulus; * : DCT; Arrowhead : CNT/CCD; Arrow : blood vessel. Scale bars = 70 µm.

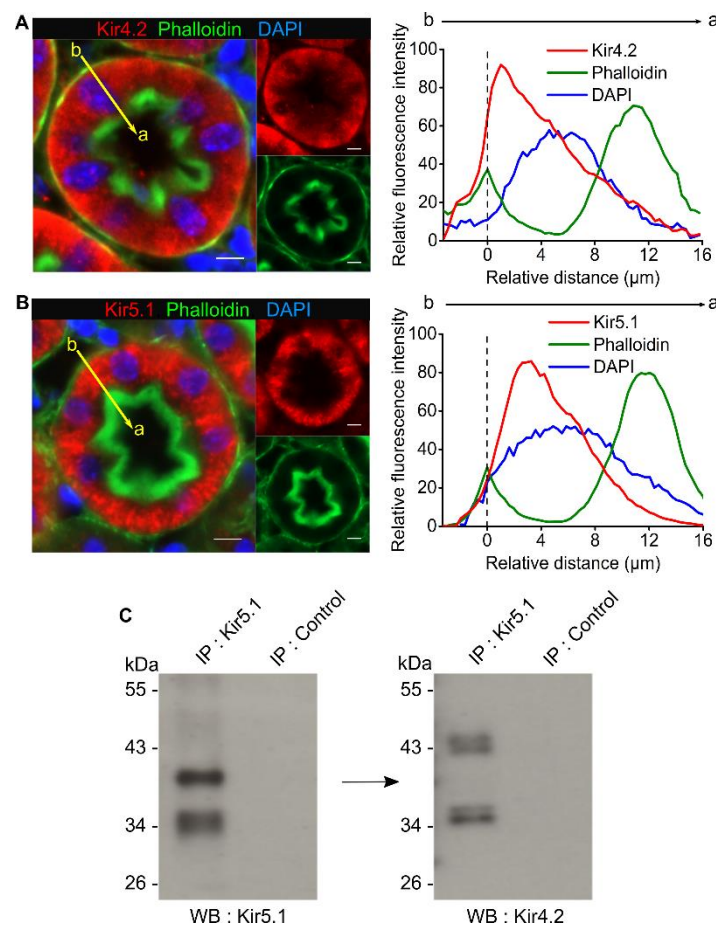
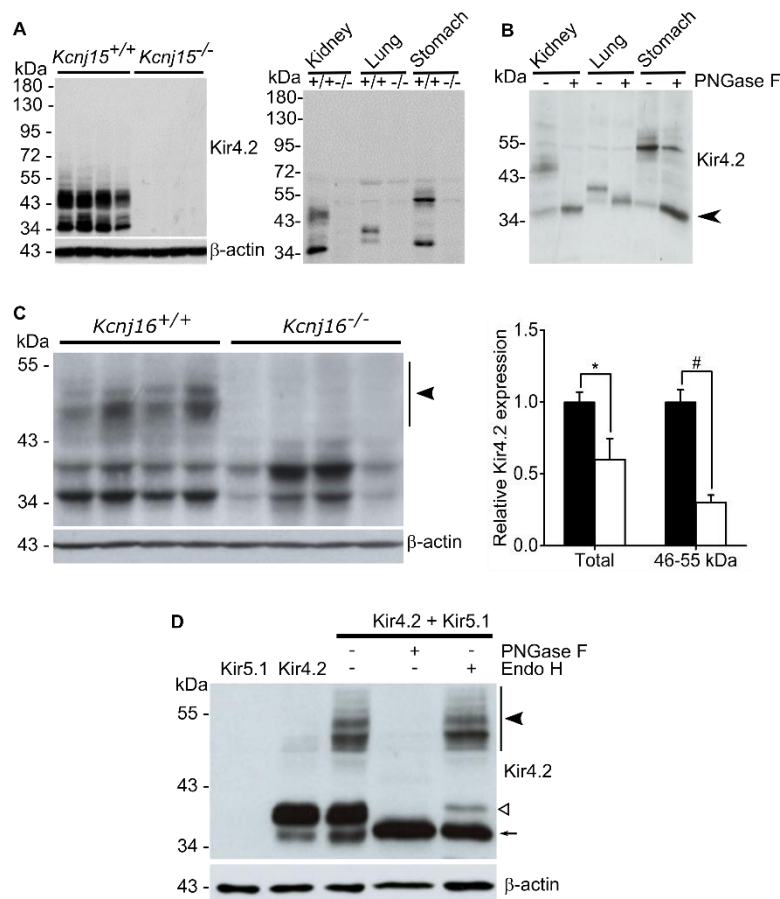


Figure 2. Kir4.2 and Kir5.1 localize and may interact at the basolateral side of proximal tubule cells. (A and B) Fluorescence images (left) and associate intensity profiles (right) of cortical proximal tubular cells of wild-type mice labelled with DAPI, Alexa Fluor® 488 phalloidin and costained with either anti-Kir4.2 (A) or anti-Kir5.1 (B) antibody. For each fluorescence channel, normalized background-subtracted intensity profiles were established along a ~20 μm long yellow line extending from the basal (b) to the apical (a) sides. The maximum phalloidin fluorescence level at the basal cell pole (dotted line) was taken as the abscissa origin. The peaks of intracellular Kir4.2 and Kir5.1 fluorescence were respectively at $1.2 \pm 0.2 \mu\text{m}$ ($n = 12$) and $3.3 \pm 0.3 \mu\text{m}$ ($n = 12$) away from the basal pole. Scale bars = 5 μm . (C) Co-immunoprecipitation of Kir4.2 and Kir5.1. Whole kidney lysates were precipitated with anti-Kir5.1 antibody (left lanes) and the precipitants were probed with anti-Kir5.1 (left panel) or anti-Kir4.2 (right panel) antibody. Immunoprecipitation in the absence of anti-Kir5.1 antibody (right lanes) was used as a negative control.



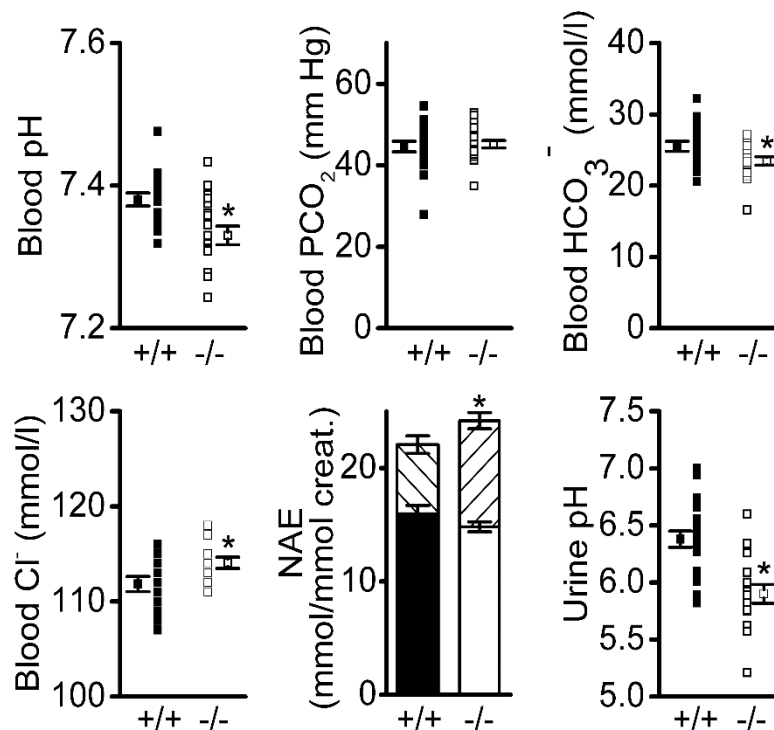


Figure 4. *Kcnj15*^{-/-} mice exhibit hyperchloremic metabolic acidosis and inappropriately low urinary NH₄⁺ excretion. Blood and urine parameters of age-matched *Kcnj15*^{+/+} and *Kcnj15*^{-/-} littermates male mice. Individual values and respective means ± SEM of blood pH, PCO₂, HCO₃⁻ and Cl⁻ and urine pH are from 13-27 *Kcnj15*^{+/+} mice (filled symbols) and from 12-33 *Kcnj15*^{-/-} mice (hollow symbols). NAE data are given as means ± SEM for 9 *Kcnj15*^{+/+} and 11 *Kcnj15*^{-/-} mice. The net acid excretion (NAE) is only slightly increased in *Kcnj15*^{-/-} mice, owing to their higher excretion in titratable acidity (▨) as compared to *Kcnj15*^{+/+} mice (▩) ($P < 0.01$, unpaired Student t test) and to their inappropriately low urinary NH₄⁺ excretion rate (white bar) similar to that of *Kcnj15*^{+/+} mice (black bar) ($P = 0.07$ vs wild-type mice, unpaired Student t test). * $P < 0.05$, unpaired Student t test.

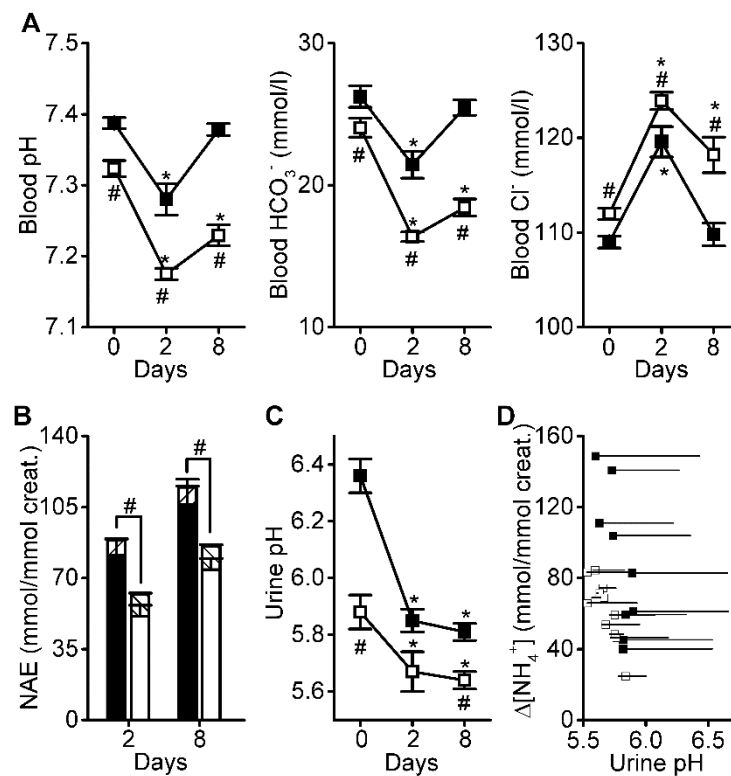


Figure 5. Reduced acid stress handling in *Kcnj15*^{-/-} mice. *Kcnj15*^{+/+} and *Kcnj15*^{-/-} mice were challenged with an oral acid load for 8 days. (A) Measurements of blood pH, HCO₃⁻ and Cl⁻ concentrations before (day 0) and after 2 and 8 days of acid loading showed a more profound and sustained metabolic acidosis in *Kcnj15*^{-/-} mice (□) as compared to *Kcnj15*^{+/+} mice (■). In B, the inappropriately low increase in urinary NH₄⁺ excretion in *Kcnj15*^{-/-} mice (open bars) as compared to *Kcnj15*^{+/+} mice (black bars), associated to the constant rates of TA excretions (hatched bars), impaired their increase in NAE after 2 and 8 days of acid loading. (C) Evolution of urinary pH in *Kcnj15*^{+/+} (■) and *Kcnj15*^{-/-} (□) mice during the acid load test. In A, B and C, data are given as means ± SEM from 11 *Kcnj15*^{+/+} and 12 *Kcnj15*^{-/-} mice. * *P* < 0.05 vs day 0 and # *P* < 0.05 vs wild-type, unpaired Student t test. (D) Urinary pH and NH₄⁺ excretion after an 8-day acid load in individual *Kcnj15*^{+/+} (■) and *Kcnj15*^{-/-} (□) mice. Each symbol reports the increase above baseline in urinary NH₄⁺ (ΔNH₄⁺) as a function of the urinary pH measured at day 8. Lines indicate the change in urinary pH from baseline.

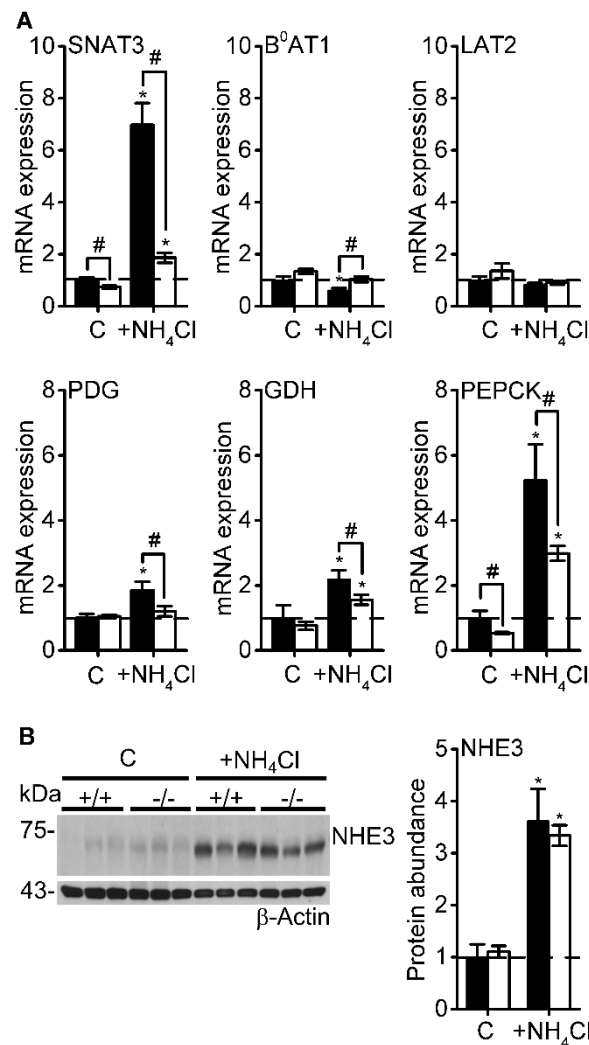


Figure 6. *Kcnj15* deletion reduces the expression of transporters and enzymes relevant for ammoniagenesis in mouse proximal tubular cells. (A) Expressions of system N/A transporter 3 (SNAT3), broad neutral (0) amino acid transporter 1 (B⁰AT1), large neutral amino acids transporter small subunit 2 (LAT2), and of PDG, GDH and PEPCK enzymes mRNAs in whole kidneys from *Kcnj15*^{+/+} (black bars) and *Kcnj15*^{-/-} (white bars), under either basal or NH₄Cl-induced acid load condition. Data were normalized to the respective basal expression in *Kcnj15*^{+/+} mice (dotted line) and are given as means ± SEM, for 4 to 6 mice. * *P* < 0.05 vs basal, # *P* < 0.05 vs *Kcnj15*^{+/+} mice. (B) Left panel : Western-blot for NHE3 using whole kidney extracts from *Kcnj15*^{+/+} (+/+) and *Kcnj15*^{-/-} (-/-) mice under either basal or NH₄Cl-induced acid load condition. To each lane corresponds one animal. Right panel : Quantification of the data after normalization to their respective β-actin expression level then to their basal expression in *Kcnj15*^{+/+} mice (dotted line). Data are given as means ± SEM for 6 mice in each group and condition. * *P* < 0.05 vs basal (unpaired Student t test).

	<i>Kcnj15</i> ^{+/+}	<i>Kcnj15</i> ^{-/-}	Significance
Na ⁺ , mmol/l	159 ± 2 (12)	158 ± 2 (16)	NS
K ⁺ , mmol/l	5.7 ± 0.2 (9)	5.4 ± 0.3 (19)	NS
Ca ²⁺ , mmol/l	1.2 ± 0.01 (23)	1.3 ± 0.01 (21)	<i>P</i> < 0.05
Mg ²⁺ , mmol/l	0.9 ± 0.1 (13)	1 ± 0.1 (13)	NS
Anion gap, mmol/l	31.3 ± 3.6 (6)	32.2 ± 2.1 (6)	NS
Phosphate, mmol/l	2.8 ± 0.4 (13)	3.2 ± 0.2 (14)	NS
Lactate, mmol/l	5.8 ± 0.7 (19)	5.5 ± 0.6 (21)	NS
Glucose, mmol/l	14.9 ± 1.2 (12)	14.9 ± 1.2 (13)	NS
Proteines, g/l	41.6 ± 1.2 (11)	40.8 ± 2.7 (11)	NS
Urea, mmol/l	8.2 ± 0.4 (13)	10.2 ± 0.8 (14)	<i>P</i> < 0.05
Creatinin, µmol/l	12.8 ± 1.2 (17)	14 ± 1.1 (17)	NS
Haematocrit, %	40.2 ± 0.7 (22)	40.8 ± 0.7 (22)	NS

Table 1. Plasma content of *Kcnj15*^{+/+} and *Kcnj15*^{-/-} mice maintained on a standard diet.

Data are given as means ± SEM for the numbers of mice given in brackets. Plasma anion gap was calculated as $[\text{Na}^+] + [\text{K}^+] - [\text{Cl}^-] - [\text{HCO}_3^-]$, with the listed $[\text{Na}^+]$ and $[\text{K}^+]$ values and with the individual $[\text{HCO}_3^-]$ and $[\text{Cl}^-]$ values used in Figure 4. NS : not significant difference between groups (unpaired bilateral t-test).

	<i>Kcnj15</i> ^{+/+}	<i>Kcnj15</i> ^{-/-}	Significance
Uv (μl/g BW/ day)	72.9 ± 4.3 (22)	68.3 ± 7.3 (17)	NS
Osmolality (mOsm./Kg H ₂ O)	2515 ± 180 (22)	2418 ± 131 (17)	NS
Creatinin (mmol/l)	4.1 ± 0.2 (22)	4.6 ± 0.3 (18)	NS
Na ⁺ , mmol/mmol creat.	39.6 ± 1.5 (12)	41.1 ± 2.4 (12)	NS
K ⁺ , mmol/mmol creat.	62.8 ± 2.5 (12)	62.8 ± 5.2 (12)	NS
Cl ⁻ , mmol/mmol creat.	53.7 ± 3.7 (19)	49.1 ± 3.1 (15)	NS
Ca ²⁺ , mmol/mmol creat.	0.25 ± 0.04 (19)	0.36 ± 0.04 (15)	< P 0.05
Mg ²⁺ , mmol/mmol creat.	5.05 ± 0.35 (19)	4.96 ± 0.3 (15)	NS
Proteins, g/mmol creat.	1.15 ± 0.18 (19)	1.16 ± 0.18 (15)	NS
Glucose, mmol/mmol creat.	0.29 ± 0.02 (19)	0.28 ± 0.03 (15)	NS
Phosphate, mmol/mmol creat.	9.3 ± 0.9 (19)	10.3 ± 1.2 (15)	NS
Urea, mmol/mmol creat.	280 ± 19 (19)	277 ± 19 (15)	NS
Aldosterone, pg/g BW/day	100 ± 36 (6)	109 ± 40 (6)	NS
eGFR (μl/min)	450 ± 35 (15)	387 ± 38 (14)	NS

Table 2. Urinary content of *Kcnj15*^{+/+} and *Kcnj15*^{-/-} mice maintained on a standard diet.

Data are given as means ± SEM for the numbers of mice given in brackets. Uv : Urine volume; eGFR : estimated Glomerular Filtration Rate. NS : not significant difference between groups (unpaired bilateral t-test).

SUPPLEMENTAL FIGURES

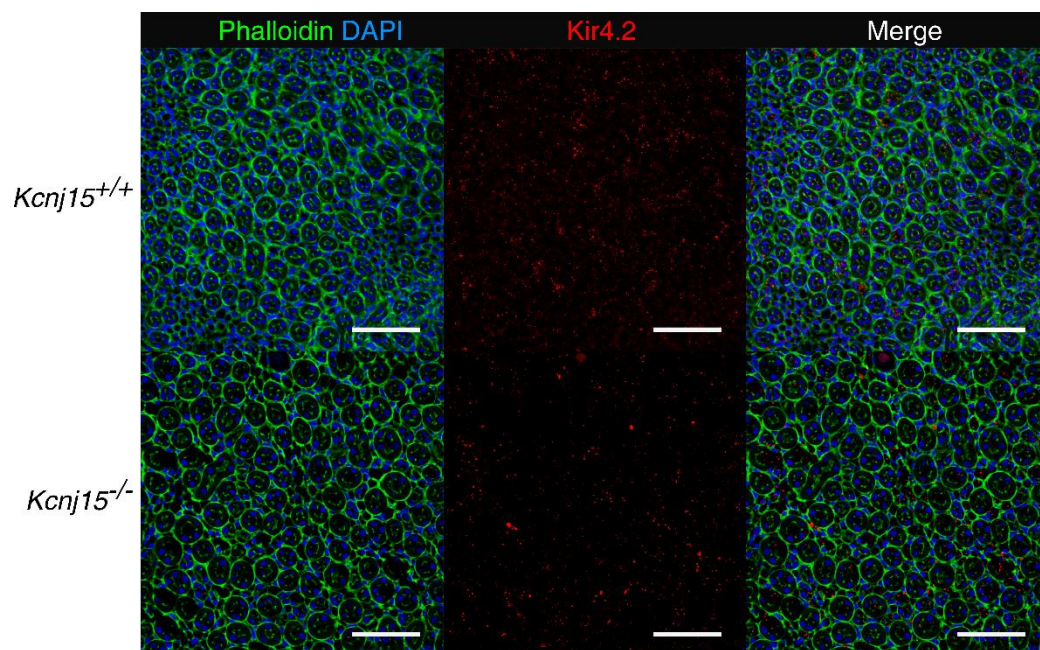


Figure S1. Lack of Kir4.2 expression in cells of the inner stripe of mouse kidney. Confocal images of *Kcnj15*^{+/+} and *Kcnj15*^{-/-} mice renal inner stripe stained with phalloidin (green) and DAPI (blue), then probed with anti-Kir4.2 antibody (red). Scale bars = 70 μ m.

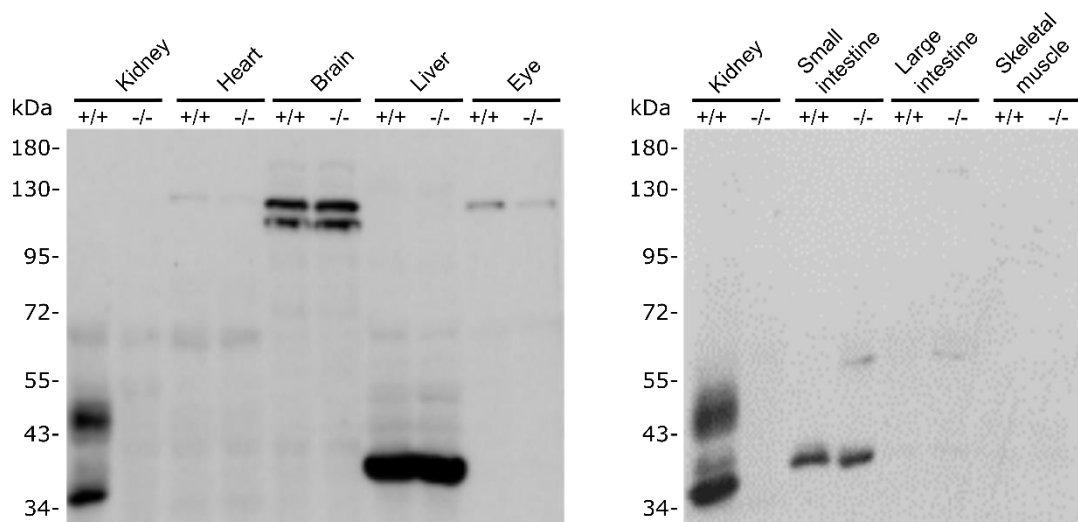


Figure S2. Mouse tissues lacking Kir4.2 protein expression. Western blot analysis of Kir4.2 expression in mouse tissues. For each gel, tissues were removed from the same *Kcnj15*^{+/+} mouse (+/+) and from the same *Kcnj15*^{-/-} mouse (-/-), and renal Kir4.2 expression is given (first lane) for comparison. The same amount of proteins (60 µg) was loaded for each sample and Ponceau-S staining was used as the loading control (not shown).

	<i>Kcnj15</i> ^{+/+}			<i>Kcnj15</i> ^{-/-}		
	Day 0	Day 2	Day 8	Day 0	Day 2	Day 8
Total body weight (g)	24.7 ± 1	24.5 ± 1	24.9 ± 1.2	24.6 ± 0.9	24.3 ± 0.9	24.5 ± 0.9
Water intake (μl/g BW/day)	145 ± 11	143 ± 11	179 ± 20*	150 ± 12	111 ± 7*	152 ± 12
NH ₄ Cl intake (μM/g BW/day)	40.6 ± 3.1	40.1 ± 3.2	50 ± 5.6*	42.1 ± 3.4	31 ± 2.1*	42.6 ± 3.3
Food intake (mg/g BW/day)	158 ± 14	171 ± 5	194 ± 7*	150 ± 13	166 ± 7	180 ± 18*
Uv (μl/g BW/ day)	71.6 ± 6.8	50.4 ± 5.8*	79.9 ± 8	77.6 ± 10.9	37 ± 4.6*	71 ± 3.4
Osmolality (mOsm./Kg H ₂ O)	2462 ± 252	3602 ± 251*	2924 ± 212	2461 ± 184	4348 ± 315*	3506 ± 185*
Na ⁺ (mmol/mmol creat.)	60.5 ± 4.6	61.8 ± 3.7	68.3 ± 6.4*	58.9 ± 7.2	59.2 ± 3.9	66 ± 4.6*
K ⁺ (mmol/mmol creat.)	57.2 ± 5.3	63.5 ± 6.8	66.6 ± 4.1*	55.2 ± 4.8	55.5 ± 5.9	66.8 ± 4.3*
Cl ⁻ (mmol/mmol creat.)	61.3 ± 2.5	162.4 ± 9.9*	216.7 ± 19.4*	53.5 ± 3.4†	126.4 ± 7.6*†	185 ± 7.7*
Ca ²⁺ (mmol/mmol creat.)	0.29 ± 0.03	0.62 ± 0.11*	0.83 ± 0.15*	0.54 ± 0.09†	1.37 ± 0.25*†	2.84 ± 0.43*†
Phosphate (mmol/mmol creat.)	12 ± 0.9	9.8 ± 0.8	10.7 ± 1.3	13.8 ± 1.1	12.2 ± 1.1	14.7 ± 1.2*†
Proteins (g/mmol creat.)	0.99 ± 0.34	0.63 ± 0.19*	0.6 ± 0.17	1.05 ± 0.38	0.71 ± 0.19	0.53 ± 0.08
Glucose (mmol/mmol creat.)	0.43 ± 0.04	0.59 ± 0.09*	0.75 ± 0.12*	0.41 ± 0.04	0.75 ± 0.11*	0.91 ± 0.15*
Mg ²⁺ (mmol/mmol creat.)	5 ± 0.3	4.9 ± 0.5	6.3 ± 0.3*	5.4 ± 0.4	4.6 ± 0.2*	6.1 ± 0.3*
Urea (mmol/mmol creat.)	320 ± 8	352 ± 21	423 ± 21*	320 ± 16	337 ± 8	386 ± 11*

Table S1. Clinical and urine parameters of *Kcnj15*^{+/+} and *Kcnj15*^{-/-} mice under basal conditions (Day 0) and after 2 (Day 2) and 8 (Day 8) an oral NH₄Cl-induced acid load. Results are shown as means ± SEM for 12 *Kcnj15*^{+/+} and 11 *Kcnj15*^{-/-} mice. * P < 0.05 vs Day 0 (paired Student t test), † P < 0.05 vs control mice at the given time (unpaired Student t test).

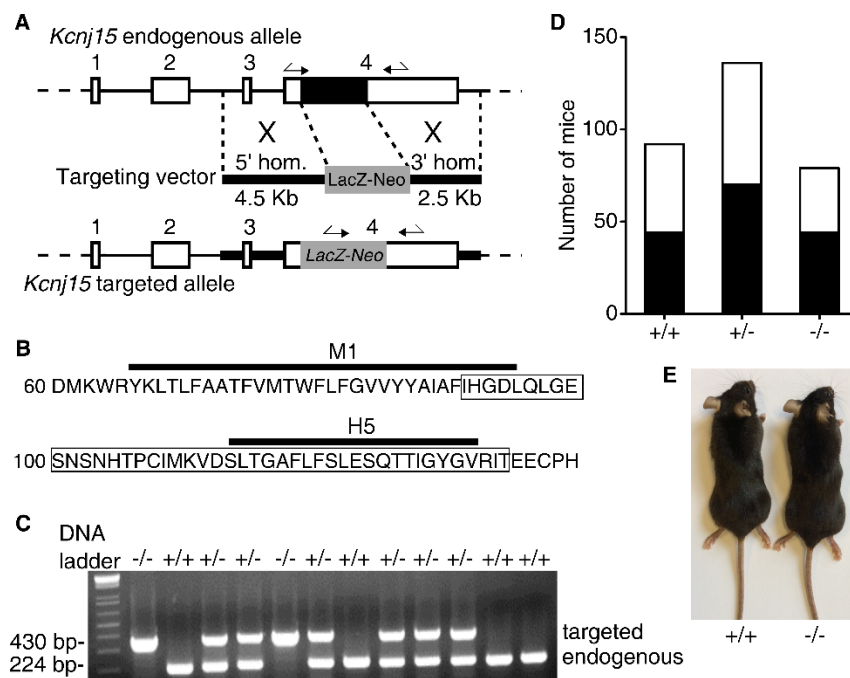


Figure S3. *Kcnj15* knockout mice. (A) *Kcnj15* endogenous allele, targeting vector, and targeted alleles. The 136 bases deleted region in exon 4 of the endogenous allele is shown as a black box. Numbers indicate *Kcnj15* exons (open boxes). The thick lines represent fragments used for constructing the *LacZ-Neo* targeting vector 4.5 Kb (5') and 2.5 Kb (3') homology arms. Arrows indicate the PCR primers used for the genotyping shown in C. (B) The corresponding deleted deduced amino-acids sequence of Kir4.2 protein (hollow box) covers a region from the end of the proposed first membrane-spanning hydrophobic segment (M1) to the pore-forming region domain (H5). (C) Multiplex PCR analysis of tail biopsies cDNA from the offspring of a heterozygous mating identified 224-bp and 430-bp amplicons from wild type (endogenous) and KO (targeted) alleles, respectively. (D) *Kcnj15*^{+/+}, *Kcnj15*^{+/-} and *Kcnj15*^{-/-} offspring genotypes roughly followed mendelian distribution and, for each genotype, male (black bars) to female (open bars) ratios approached 1:1. (E) There was no detectable difference in physical appearance of adult age-matched male *Kcnj15*^{+/+} and *Kcnj15*^{-/-} mice.

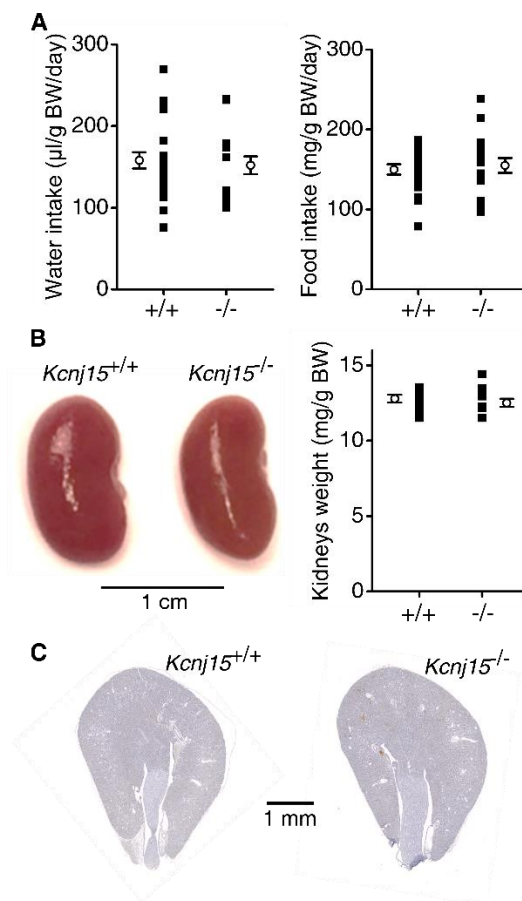


Figure S4. *Kcnj15*^{-/-} mice exhibited normal food and water inputs, and no anatomical and histological renal abnormality (A) Food (left panel) and water (right panel) intakes of age-matched *Kcnj15*^{+/+} and *Kcnj15*^{-/-} male mice were similar ($P = 0.67$ and 0.71 , respectively, unpaired Student t-test). Individual data from 22 *Kcnj15*^{+/+} mice and 18 *Kcnj15*^{-/-} mice are given (black symbols) together with respective means $\pm$ SEM (hollow symbols). (B) Left panel: photomicrographs of left kidneys from age-matched *Kcnj15*^{+/+} and *Kcnj15*^{-/-} male mice showing no detectable difference in organ morphology. Right panel: kidneys weights of *Kcnj15*^{+/+} and *Kcnj15*^{-/-} mice were identical ($P = 0.44$, unpaired Student t-test). Individual data from 11 *Kcnj15*^{+/+} mice and 8 *Kcnj15*^{-/-} mice are given (black symbols) together with respective means $\pm$ SEM (hollow symbols). (D) Haematoxylin–Eosin stained kidney slices from adult *Kcnj15*^{+/+} (left) and *Kcnj15*^{-/-} (right) mice showed no disturbance in renal ultrastructural organization in *Kcnj15*^{-/-} mice.

qRT-PCR : targeted cDNA (gene)	Forward primer	Reverse primer
Kir4.2 (<i>Kcnj15</i>)	5'-GCAGGCCATAGCAGAG-3'	5'-GTGAGCTTGTATCGCCA-3'
Kir4.1 (<i>Kcnj10</i>)	5'-CCGCGATTATCAGAGC-3'	5'-GATCCTTGAGGTAGAGGAA-3'
Kir5.1 (<i>Kcnj16</i>)	5'-ATACGGTTACCGCTGT-3'	5'-TGACGAGTTTGAGGTCTT-3'
Cyclophilin A (<i>Ppia</i>)	5'-ATGCAAAATGCTGGACCAA-3'	5'-GCCCTTCTTTCACCTTCCCAA-3'
L26 ribosomal protein (<i>Rpl26</i>)	5'-GCTAATGCAACAACCGTC-3'	5'-TCTCGATCGTTTCTTCTTGTAT-3'
NHE3 (<i>Slc9a3</i>)	5'-TCCCTGGCCTTCATTTCG-3'	5'-GTCACCCACACACACT-3'
B ⁰ AT1 (<i>Slc6a19</i>)	5'-CATGATCCCATTCCTCATCC-3'	5'-AGTACAGGCCCCACCATGAAG-3'
SNAT3 (<i>Slc38a3</i>)	5'-CTGCTGAGGCCCTTCTGTACC-3'	5'-GCAATGGACAGGTTGGAGAT-3'
LAT2 (<i>Slc7a8</i>)	5'-GGAGAGTGGAGGTGCCATTA-3'	5'-TGGTTCCCTGGAGAATGAAG-3'
PEPCK (<i>Pck1</i>)	5'-AGCCTTGGTCAACAACCTGG-3'	5'-TGCCCTCGGGGTAGTTATG-3'
PDG (<i>Gls2</i>)	5'-GACCCCTCACTACCTGC-3'	5'-GTCCCTGCGTAGGATG-3'
GDH (<i>Gdh</i>)	5'-GTGGCATGGTCCCTCAA-3'	5'-CGCCCCATAGTGCTAC-3'
Genotyping: Targeted DNA	Forward primer	Reverse primer
Endogenous <i>Kcnj15</i>	5'-TTGCTGCCACCTTTGTGATGACCTG-3' ^a	5'-GGAAGATAGCATGGGGACACTCCTC-3' ^b
Inserted <i>LacZ-Neo</i>	5'-GGGTGGGATTAGATAAATGCCCTGCTCT-3' ^c	5'-GGAAGATAGCATGGGGACACTCCTC-3' ^b

Table S2. Primers used for qRT-PCR on whole kidneys and nephron segments extracts and for mice genotyping. Primers used for genotyping were as per Deltagen's instructions. ^a and ^b : codons 70-78 and 137-144 of the endogenous *Kcnj15* mouse gene, respectively. ^c is complementary of the 3' sequence of the inserted Neomycin-resistance (*LacZ-Neo*) gene.

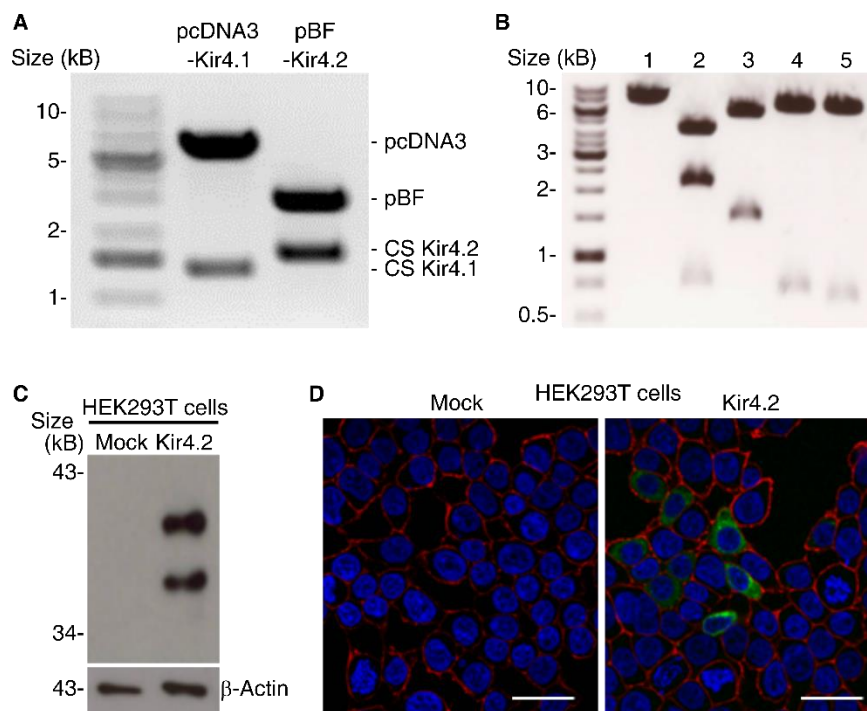


Figure S5: Synthesis of pcDNA3-Kir4.2 plasmid. (A) Subcloning of the Kir4.2 coding sequence from pBF-Kir4.2 plasmid into a pCDNA3 plasmid. Digestion by BamHI and XbaI restriction enzymes of the pCDNA3-Kir4.1 plasmid isolated 5.4 kB and 1.2 kB products, corresponding to insert-free pCDNA3 plasmid and to Kir4.1 coding sequence, respectively (lane 2). Digestion of pBF-Kir4.2 (lane 3) plasmid isolated 3.0 kB and 1.5 kB products corresponding to insert-free pBF plasmid and to Kir4.2 coding sequence, respectively. (B) The digestion by NdeI (1), PstI (2), BamHI/EcoRI (3), MluI/XbaI (4) and SpeI/KpnI (5) restriction enzymes of the ligated 6.9 kB (1.5 kB and 5.4 kB) DNA product led to a migration profile consistent with a pcDNA3-Kir4.2 plasmid. (C) Western blot on lysates from whole HEK293T cells either mock-transfected (insert-free pCDNA3 plasmid) or transfected with the pcDNA3-Kir4.2 plasmid and exposed to primary anti-Kir4.2 antibody. β -actin was used as a internal loading control. (D) Immunofluorescence of biotinylated HEK293T cells either mock-transfected or transfected with pcDNA3-Kir4.2 plasmid and exposed to primary anti-Kir4.2 antibody (green). Biotinylated membranes appear in red and DAPI-stained nuclei appear in blue. Scale bar : 30 μ m.

SUPPLEMENTAL METHODS

Generation of *Kcnj15*^{-/-} mice. SPF breeding nucleus B6;129P2-Kcnf15^{tm1Dgen}/H strain heterozygous mice of mixed 129P2/OlaHsd and C57BL/6J background (Deltagen, San Mateo, CA, USA) were obtained from the MRC Harwell, Mary Lyon Centre (Oxford, GB). Nucleus mice contained a mutant allele generated by the intragenic deletion of 136 bases (267-402) in exon 4 of the *mus musculus Kcnj15* DNA sequence, encoding a 46 amino-acids region ranging from the end of the first membrane-spanning hydrophobic domain (M1) to the pore-forming (H5) domain of the predicted Kir4.2 protein (1), and by the insertion of a promoterless *LacZ* reporter gene and a neomycin-resistant gene cassette (*LacZ-Neo*) flanked by 4.5 Kb (5') and 2.5 Kb (3') *Kcnj15* genomic DNA fragments homology arms (Supplemental Figure 3 A-B). The breeding of nucleus heterozygous (*Kcnj15*^{+/-}) mice with C57Bl/6 mice (Charles River Laboratories, Saint-Germain-sur-l'Arbresle, France) and the backcrossing of their heterozygous offspring onto a pure C57BL/6 background was then done to produce N5 generation of mice. Mice genotype was established by multiplex PCR on ethanol-purified genomic DNA from mice tail biopsies according to Deltagen's instructions. PCR parameters were 94°C for 3 min, 35 cycles at 94°C for 10 sec, 60°C for 30 sec, 72°C for 1.5 min, and 72°C for 7 min and the primers (Eurogentec, Angers, France) used are listed in Supplemental Table 2. PCR products were separated on a 1.4% agarose gel along a Invitrogen™ 100bp DNA ladder (ThermoFisher Scientific, Villebon sur Yvette, France) and visualized using ethidium bromide. Endogenous *Kcnj15* and targeted alleles were identified by amplification of 224-bp and 430-bp fragments, respectively (Supplemental Figure 3C).

N5 male and female *Kcnj15*^{+/-} mice were fertile and their intercrossing resulted in offspring of usual litter sizes. Sex-ratio of *Kcnj15*^{+/+}, *Kcnj15*^{+/-} and *Kcnj15*^{-/-} mice at age of weaning was close to 1:1 (160 males and 149 females) and genotype distribution roughly followed an expected mendelian inheritance pattern with ~30 % *Kcnj15*^{+/+}, ~44 % *Kcnj15*^{+/-} and ~26 % *Kcnj15*^{-/-} mice (Supplemental Figure 3D).

Of the male offspring, ~28 % were homozygous, ~44 % heterozygous and ~28% wild-type mice, while female offspring distribution was ~23% homozygous, ~44% heterozygous and ~32 % wild-type mice. *Kcnj15*^{-/-} mice exhibited no excess mortality. Male *Kcnj15*^{-/-} mice appeared healthy, exhibited no detectable growth retardation and were indeed indistinguishable from their wild-type littermates by gross physical appearance (Supplemental Figure 3E). When maintained under a standard diet, *Kcnj15*^{-/-} and *Kcnj15*^{+/+} mice showed no difference in their daily food and water intakes, and kidneys of *Kcnj15*^{-/-} mice showed no alteration in external appearance, size and weight, and no morphological or ultrastructural abnormality (Supplemental Figure 4).

Urine and blood analyses. NH_4^+ concentration and titratable acidity in 24-hour urine samples collected under water-saturated mineral oil were determined by a DL55 titrator and a ST20 sample changer (Mettler Toledo, Viroflay, France). Venous blood from the retro-orbital plexus of conscious mice was analyzed by a blood gas epoc[®] Reader and Host analyzer (Alere S.A.S., Jouy en Josas, France) for determinations of pH, gas contents and haematocrit, and of HCO_3^- , Cl^- , ionized Ca^{2+} , glucose and lactate concentrations. At the end of the experimental period, mice were sacrificed by terminal bleeding after the peritoneal injection of ketamine and xylazine (0.12 and 0.006 mg/g bodyweight, respectively) and blood samples were collected on heparin. Plasma creatinine was measured by a Konelab 20I analyzer (ThermoFisher Scientific), and Na^+ and K^+ concentrations in urine and plasma samples were measured by a Sherwood 420 flame photometer (Servilab, Le Mans, France).

Real-time PCR on whole kidneys. Whole kidney mRNAs were extracted using the TRI Reagent[®] (ThermoFisher Scientific), treated with the RNase Free DNase Set (Qiagen, Courtaboeuf, France) and purified using the RNeasy Mini Kit (Qiagen). 1 µg of purified mRNA was reverse-transcribed using the first strand cDNA synthesis kit for RT-PCR (Roche Diagnostics, Meylan, France).

Real-time PCR was then performed with a LIGHTCYCLER® 480 using LC 480 SYBR Green 1 Master kit (Roche Diagnostics) in a 10 µl reaction volume, by 45 cycles of 20 seconds temperatures steps at 95°C, 60°C, and 72°C.

Antibodies. Primary antibodies for western blotting and their respective dilutions were as follows : APC-058 rabbit anti-Kir4.2 (Alomone Labs, Jerusalem, Israel; 1:1000) whose immunogen sequence targets the intracellular C-terminal region of the protein (hence outside the deleted part in *Kcnj15*^{-/-} mice), SPC-400D rabbit anti-NHE3 (StressMark Biosciences, Victoria, Canada; 1:2000) and A2228 mouse anti-β-Actin (Sigma Aldrich Chemie; 1:20000). HRP-conjugated secondary antibodies were 170-6515 goat anti-rabbit (Biorad, Marnes-la-Coquette, France; 1:2500 dilution, except 1:10000 dilution for NHE3 detection) and sc-2005 goat anti-mouse (Santa Cruz Biotechnologies; 1:10000 dilution).

Primary antibodies for immunohistochemistry and their respective dilutions were APC-058 rabbit anti-Kir4.2 (Alomone Labs; 1:500) or APC-123 rabbit anti-Kir5.1 (Alomone Labs; 1:250) and the secondary antibody was A31572 donkey anti rabbit AlexaFluor® 555 (ThermoFisher Scientific; 1:1000). For co-immunoprecipitation, the sc-22434 goat anti-Kir5.1 (Santa Cruz Biotechnologies) and the HPA016702 (Sigma Aldrich Chemie, Saint-Quentin Fallavier, France) antibodies were used.

Western blotting. 60 µg of proteins were denaturated in a 2X Laemmli buffer containing 2.5 % β-mercapto-ethanol, 5 % SDS and 13.6 % sucrose. All but Kir4.2 proteins were incubated in this medium for 10 minutes at 95 °C. Kir4.2 proteins were subjected to a mild three-steps procedure (15 min at 50 °C, 30 min at 25 °C and 15 min at 50 °C), as used for SDS-resistant GIRK4 channel (2), and shown to increase mobility and migration of the Kir4.2 protein into the polyacrylamide gel (3).

For co-immunoprecipitation experiments, a quarter of immunoprecipitated proteins was denatured for 10 minutes at 95 °C in a 4X Laemmli buffer containing 0.3 % β -mercapto-ethanol, 2 % SDS and 10 % glycerol. All proteins were then separated on 0.5 % SDS, 10% polyacrylamide gels, transferred onto nitrocellulose membranes, blocked using a TBS buffer supplemented with 5 % non-fat milk proteins and 0.2 % NP-40, then exposed to primary antibody, washed and finally exposed to a HRP-conjugated secondary antibody.

Immunohistochemistry on mouse kidney slices. Kidneys of anesthetized mice were fixed by transcardial perfusion with 4% paraformaldehyde-containing PBS, harvested, washed in ice cold PBS and snap-frozen into liquid-nitrogen-cold isopentane. At the time of the experiment, 7 μ m-thick sagittal sections were cut with a CM3050S cryostat (Leica Biosystems, Nanterre, France), blocked with 10 % normal goat serum, then exposed overnight at 4 °C to primary antibody. After three washings with PBS, sections were exposed for 2 hours at room temperature to secondary antibody, DAPI (1 μ g/ml) and Acti-Stain[®] 488 Fluorescent Phalloidin (Cytoskeleton, Denver, USA; 1:250 dilution), then washed before mounting in Dako Glycergel mounting medium (Agilent Technologies, Les Ulis, France).

Plasmids. Mouse pBF-Kir4.2, rat pcDNA3-Kir4.1 and rat pcDNA-Kir5.1 plasmids were a kind gift from Pr S.J. Tucker (University of Oxford, Oxford, United Kingdom). Plasmids inserts integrity was checked by their sequencing using primers directed upstream the SP6 bacteriophage promoter (5'- TTGCGCGATTCATTAATGCAGCCG-3') in pBF plasmid or upstream the human cytomegalovirus promoter (pCMV) (5'-AGCAGAGCTCTCTGGCT-ACTAGAG-3') in pcDNA3 plasmids, and within the mouse Kir4.2 (5'-GGAGTGTC-CCCATGCTATCTTCCT-3'), rat Kir4.1 (5'-GGAAGCCTTGCCTTATGATCCGGGT-3') or rat Kir5.1 (5'-GAAGCTTTGCCTCATGTGGCGCATA-3') coding sequences.

For future Kir4.2 expression in mammalian cells, the pBF-Kir4.2 plasmid insert isolated from the pBF vector was subcloned into an insert-free pCDNA3 plasmid multiple cloning site (MCS). Respective inserts in MCS of pCDNA3-Kir4.1 and pBF-Kir4.2 plasmids were isolated by BamHI and XbaI enzymes (New England Biolabs, Evry, France) digestion and products were separated by agarose gel electrophoresis. 1.5 Kb and 5.4 Kb DNA bands, corresponding respectively to pBF-Kir4.2 plasmid insert and insert-free pCDNA3 plasmid (Supplemental Figure 5A) were purified using a QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Their 6.9 kb ligation product by Invitrogen™ T4 DNA Ligase Ligation kit (ThermoFisher Scientific) was then cloned in XL10-Gold® Ultracompetent Cells (Agilent Technologies), and bacterial plasmidic DNA was extracted by GeneJET Plasmid Miniprep kit (ThermoFisher Scientific). The successful subcloning was evaluated by digestion of the putative newly formed pCDNA3-Kir4.2 plasmid using NdeI, PstI, BamHI/EcoRI, MluI/XbaI, and SpeI/KpnI (New England Biolabs) (Supplemental Figure 5B) and by the sequencing of the insert using the pCMV and Kir4.2 coding sequence primers (see above). The efficiency of pCDNA3-Kir4.2 subcloning was then checked by performing western blotting and immunocytochemistry experiments on mycoplasma-free HEK293T cells cultured as previously described (4), 24 hours after their transfection by the pCDNA3-Kir4.2, plasmid using the X-tremeGENE 9 DNA transfection reagent (Roche Diagnostics), according to manufacturer's instructions.

For western blotting, transfected cells were mechanically homogenized in ice-cold lysis buffer containing (in mM) 30 NaF, 30 Na-pyrophosphate, 2 EDTA, 20 Tris, and 0.1% SDS and 1% Triton-X100, and enriched with 1X Roche cOmplete™, mini, EDTA-free protease inhibitor cocktail (Sigma Aldrich Chemie). After centrifugation, proteins in the supernatant were measured with Pierce™ BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific) and western blotting were performed by separation of 12 µg proteins on 10% polyacrylamide gels in the presence of SDS.

Proteins were then transferred onto nitrocellulose membranes and exposed to primary HPA016702 anti-Kir4.2 rabbit (1/2000 dilution) and A5441 mouse anti- β -actin (1/200000 dilution) antibodies (Sigma Aldrich Chemie) then to 170-6515 goat anti-rabbit IgG HRP conjugate (Biorad; 1/10000 dilution) secondary antibody. After washing, chemiluminescence was revealed by using either Pierce™ ECL Western Blotting Substrate or SuperSignal™ West Femto Chemiluminescent Substrate (Life Technologies SAS, Courtaboeuf, France).

For Immunocytochemistry, transfected cells were biotinylated at 4°C by incubation in a 1 mg/ml EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotin (ThermoFisher Scientific) containing solution, fixed with 4% paraformaldehyde then permeabilized with 0.3% Triton-X100. Cells were exposed to primary HPA016702 rabbit anti-Kir4.2 (Sigma Aldrich Chemie) at a 1 :20 dilution, then to Invitrogen A21428 anti-rabbit AlexaFluor® 555 (ThermoFisher Scientific; 1:500 dilution) secondary antibody. After washing with PBS-Tween (0.05 %) then with PBS, cells were mounted in Vector Laboratories VECTASHIELD DAPI-containing antifade mounting medium (Eurobio/Abcys, Les Ulis, France) and examined on a LSM710 laser scanning confocal microscope (Carl Zeiss, Marly Le Roy, France).

SUPPLEMENTAL REFERENCES

1. Pearson WL, Dourado M, Schreiber M, Salkoff L, Nichols CG. Expression of a functional Kir4 family inward rectifier K⁺ channel from a gene cloned from mouse liver. *J. Physiol.* 1999;514 (Pt 3):639–653.
2. Corey S, Clapham DE. Identification of native atrial G-protein-regulated inwardly rectifying K⁺ (GIRK4) channel homomultimers. *J. Biol. Chem.* 1998;273(42):27499–27504.
3. Hill CE, Briggs MM, Liu J, Magtanong L. Cloning, expression, and localization of a rat hepatocyte inwardly rectifying potassium channel. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2002;282(2):G233-240.
4. L'Hoste S et al. Characterization of the mouse ClC-K1/Barttin chloride channel. *Biochim. Biophys. Acta* 2013;1828(11):2399–2409.

II. Résumé de l'article n°1

Le profil d'expression et les rôles physiologiques ou physiopathologiques rénaux de Kir4.1, associée à Kir5.1 en un canal Kir4.1/Kir5.1, sont bien décrits (voir Section Introduction B.II). Inversement, ils demeurent méconnus concernant la sous-unité rénale Kir4.2, étroitement liée phylogénétiquement à Kir4.1 (voir Section Introduction B.II.1.d). Cette sous-unité étant capable de former des homotétramères Kir4.2 ou des hétérotétramères Kir4.2/Kir5.1 fonctionnels *in vitro*, nous avons émis l'hypothèse que de tels canaux pouvaient être présents dans le TP, où les conductances potassiques sont mal identifiées et leurs rôles incompris (voir Section Introduction B.III.2.b). Afin de la vérifier et de comprendre leur(s) rôle(s) physiologique(s), nous nous sommes procurés des souris *Kcnj15*^{-/-}, chez qui des séquences ADN encodant des régions cruciales de Kir4.2 sont absentes [voir Figure S3 dans l'article].

1. Kir4.2 et Kir5.1 s'associent du coté basolatéral du tubule proximal

Dans un premier temps, les souris *Kcnj15*^{-/-} et des souris sauvages (*Kcnj15*^{+/+}) nous ont servi à déterminer le profil d'expression tissulaire et intra-rénal de Kir4.2. En effet, Kir4.2 a été immunomarkée dans différents organes, y compris les reins, mais jamais des souris *Kcnj15*^{-/-} n'ont été utilisées comme contrôle négatif lors de ces expériences. Par Western blot, nous avons démontré que Kir4.2 est exprimée dans les reins, les poumons et l'estomac mais est absente des autres organes testés, incluant le pancréas, l'intestin, le foie, le cerveau et le cœur [voir Figures 3A et S2 dans l'article]. Par RT-qPCR amplifiant l'ARNm de Kir4.1, Kir5.1 ou Kir4.2 depuis des segments microdisséqués de néphron de souris *Kcnj15*^{+/+}, nous avons montré que Kir4.2 est exclusivement exprimée dans le TCP et le TPD, alors que Kir5.1 est exprimée dans tous les segments du néphron et Kir4.1 uniquement dans le néphron distal [voir Figure 1A dans l'article]. Enfin, par immunofluorescence sur des coupes fines de rein de souris *Kcnj15*^{-/-} et *Kcnj15*^{+/+}, nous avons observé que Kir5.1 et Kir4.2 sont exprimées du coté basolatéral des cellules du TP. Au niveau protéique, la sous-unité Kir4.2 n'est exprimée dans aucun autre segment du néphron [voir Figures 1B-D et S1 dans l'article]. Les marquages des 2 sous-unités Kir forment dans le TP des rayons latéraux laissant penser que celles-ci sont exprimées dans les profondes membranes latérales des cellules proximales [voir Figure 2A-B dans l'article]. Enfin, nous avons réalisé une immunoprécipitation de Kir5.1 depuis du tissu rénal de souris *Kcnj15*^{+/+}: le processus ayant permis la co-immunoprécipitation de Kir4.2 [voir Figure 2C dans l'article], il permet de conclure que les 2 sous-unités interagissent dans les cellules du TP.

2. Kir5.1 permet la maturation N-glycosidique de Kir4.2

Un élément supplémentaire renforce l'idée que Kir4.2 et Kir5.1 sont associées en un hétérotétramère Kir4.2/Kir5.1 dans le TP de souris. En effet, en Western blot depuis des protéines rénales de souris *Kcnj15*^{+/+}, Kir4.2 est révélée à 3 poids moléculaires différents: 36, 39 et de 48 à 55 kDa [voir Figures 3A-B dans l'article]. La sous-unité est également immunomarquée à ces 3 poids moléculaires lorsqu'elle est surexprimée dans la lignée rénale d'origine proximale OK [voir section Matériel et Méthodes n°1 I.2]. De plus, dans ces cellules la co-expression de Kir5.1 avec Kir4.2 augmente fortement l'expression de la forme 48-55 kDa de Kir4.2 [voir Figure 3D dans l'article]. Inversement, des Western blots réalisés sur des protéines rénales de souris invalidées *Kcnj16*^{-/-} montrent qu'en l'absence de Kir5.1, la forme 48-55 kDa de Kir4.2 n'est pas présente [voir Figure 3C dans l'article]. Or, *via* l'utilisation de la N-glycosidase PNGaseF, nous avons montré que dans les reins, les poumons et l'estomac les bandes de poids moléculaire supérieur à 36 kDa sont des formes N-glycosylées de Kir4.2 [voir Figure 3B dans l'article]. Dans les cellules OK, la bande immunoréactive à 39 kDa est sensible à l'endoglycosidase EndoH qui retire spécifiquement la N-glycosylation riche en mannose, alors que la forme à 48-55 kDa n'est sensible qu'à l'endoglycosidase PNGaseF qui clive aussi les glycosylations complexes des résidus [voir Figure 3D dans l'article]. La bande de 39 kDa correspond donc à la forme *core-glycosylée* de Kir4.2 (présente transitoirement dans le RE) tandis que les bandes de 48-55 kDa correspondent à sa forme *complexe-glycosylée*. Chez les Kir et les protéines de la voie de sécrétion, cette dernière forme est présente dans le compartiment final d'adressage, soit dans notre cas la membrane plasmique [voir Figure 19] (voir section Introduction B.I.2.c). L'ensemble de ces résultats montre que la maturation de Kir4.2, pré-requis et témoin de son adressage à la membrane plasmique, requiert l'expression de Kir5.1 à partir du RE, qui est le compartiment d'hétérotétramérisation des Kir.

3. L'absence de Kir4.2 provoque une acidose tubulaire proximale isolée

Dans un second temps nous avons comparé les phénotypes et les fonctions rénales des souris *Kcnj15*^{-/-} et *Kcnj15*^{+/+}. Pour cela, les souris ont été placées en cage à métabolisme et leurs urines, leurs plasmas et leurs sangs ont été prélevés puis analysés (voir section Matériel et Méthodes n°2 II). L'aspect, l'espérance de vie et le poids des souris *Kcnj15*^{-/-} sont normaux [voir Figure S3 dans l'article]. De même, le poids du rein, la morphologie générale et l'aspect du parenchyme rénal sont inchangés en l'absence de Kir4.2 [voir Figure S4 dans l'article].

De plus, les prises d'eau ou de nourriture, le volume urinaire quotidien et le DFG (estimé par la clairance de la créatinine plasmatique) des souris *Kcnj15*^{-/-} sont équivalents à ceux des souris sauvages. Les concentrations urinaires (normalisées par la créatinine) et plasmatiques des ions Na⁺, K⁺, Mg²⁺, des protéines, de l'aldostérone et du glucose ne sont pas modifiées par l'absence de Kir4.2 [voir Tableaux 1 et 2 dans l'article]. Les souris invalidées génétiquement pour *Kcnj15* n'ont donc pas d'insuffisance rénale, de glomérulopathie ou de tubulopathie entraînant une diurèse ou une natriurèse excessive à l'origine d'une activation du système RAA. L'absence de PiBPM, de glycosurie et de phosphaturie montre que les souris *Kcnj15*^{-/-} ne développent pas non plus de syndrome de Fanconi (voir section Introduction A.II.5.a).

En revanche, l'absence de Kir4.2 modifie l'équilibre acido-basique des souris. En effet, les souris *Kcnj15*^{-/-} développent spontanément une acidose métabolique hyperchlorémique d'origine tubulaire proximale (pRTA) (voir section Introduction A.II.5.a). Celle-ci se traduit par une diminution du pH sanguin, d'une réduction de 2 mmoles/L de la bicarbonatémie et d'une augmentation équivalente de la chlorémie. Dans le même temps, l'ENA des souris *Kcnj15*^{-/-} et l'ammoniurie ne sont pas augmentées malgré l'acidose. Contenant toutefois plus d'ions H⁺ libres ou conjugués à des acides faibles, l'urine des souris *Kcnj15*^{-/-} a un pH inférieur à celui de l'urine des souris sauvages [voir Figure 4 dans l'article]. L'origine métabolique de l'acidose est déduite de l'hyperchlorémie, tandis que le pH urinaire bas des souris *Kcnj15*^{-/-} démontre la capacité de leurs CC à acidifier l'urine en sécrétant des protons dans la lumière tubulaire. Enfin, la pRTA des souris *Kcnj15*^{-/-} est assortie d'une faible augmentation de la calcémie, d'une calciurie doublée et d'une augmentation de 20 % de l'urémie [voir Tableaux 1 et 2 dans l'article].

Afin d'établir si la pRTA des souris *Kcnj15*^{-/-} est liée à une ammoniurie inappropriée, nous avons analysé leur fonction rénale durant une charge acide élevée et chronique. Pour cela, 0.28M de NH₄Cl ont été ajoutées dans l'eau de boisson des souris (voir section Introduction A.II.4.c). En théorie, cette charge est censée provoquer une acidose métabolique, qui peut être compensée en quelques jours par une hausse de l'ammoniogénèse proximale, de l'ammoniurie et *in fine* de l'ENA (Nowik *et al.*, 2010). En pratique, les souris *Kcnj15*^{+/+} ont bien subi une telle acidose, qu'elles ont complètement compensée en 8 jours. En revanche, les souris *Kcnj15*^{-/-} ont vu leur pRTA être durablement accentuée [voir Figure 4A dans l'article]. Dans le même temps, alors qu'elles ont été capables d'acidifier leurs urines, leur ENA et leur ammoniurie étaient plus faibles que celles des souris sauvages [voir Figure 4B-C dans l'article]. Enfin, la charge acide a multiplié par 5 leur calciurie et par 3 celle des souris sauvages [voir Tableau S1 dans l'article].

4. L'absence de Kir4.2 réduit l'ammoniogénèse proximale

Les souris *Kcnj15*^{-/-} excrètent difficilement une charge acide, ce que traduit leur acidose métabolique hyperchlorémique. Cette acidose est accompagnée d'un pH urinaire faible, signe d'une bonne aptitude du néphron distal à acidifier l'urine. Pourtant, l'ENA des souris *Kcnj15*^{-/-} est inappropriée compte tenu de leur acidose, du fait d'une ammoniurie faible [voir Figure 4D dans l'article]. Or, l'ammoniurie nécessite en premier lieu la formation d'ions NH_4^+ ou *ammoniogénèse*, majoritairement par les cellules du TP où est exprimée Kir4.2. Le TP est, de plus, le seul segment du néphron impliqué dans l'augmentation de l'ammoniogénèse lors d'une charge acide élevée. Les données de la littérature montrent que cette augmentation est permise par une surexpression rapide au niveau transcriptionnel du transporteur basolatéral SNAT3 de la glutamine (substrat de l'ammoniogénèse) ainsi que des enzymes PDG, GDH et PEPCK de l'ammoniogénèse dans le TP, en réponse à une diminution du pH intracellulaire (voir section Introduction A.II.4). C'est pourquoi nous avons déterminé l'expression transcriptionnelle de gènes impliqués dans l'ammoniogénèse, par RT-qPCR depuis du tissu rénal de souris sauvages ou *Kcnj15*^{-/-} placées en régime normal ou en charge acide élevée durant 2 jours.

Nos résultats montrent qu'en régime normal, l'expression de SNAT3 est 25 % plus faible chez les souris *Kcnj15*^{-/-} que chez les souris sauvages. De plus, alors que cette expression est fortement stimulée dans les deux groupes par la charge acide élevée, elle reste 60% plus faible chez les souris invalidées [voir Figure 6A dans l'article]. En revanche, les expressions des transporteurs de glutamine B⁰AT1 (apical) et LAT2 (basolatéral) sont à peine stimulées par l'acidose et ne sont pas réduites chez les souris *Kcnj15*^{-/-}. Chez les souris *Kcnj15*^{+/+}, la transcription des ARNm de la PEPCK, de la PDG et de la GDH est augmentée par l'acidose. Toutefois, chez les souris *Kcnj15*^{-/-}, l'ARNm de la PEPCK est 2 fois moins exprimé que chez les souris sauvages, en régime normal ou en charge acide élevée. Chez ces souris invalidées, l'expression de l'ARNm de la PDG n'est pas stimulée lors de la charge acide et celle de la GDH l'est trop faiblement pour atteindre le même niveau que chez les souris sauvages [voir Figure 6A dans l'article]. Enfin, l'expression protéique de NHE3, stimulée dans les 2 groupes de souris en charge acide élevée, n'est pas modifiée par l'absence de Kir4.2 [voir Figure 6B dans l'article].

L'ensemble de ces résultats suggère que l'entrée basolatérale de la glutamine et sa transformation en ions NH_4^+ et HCO_3^- par le TP sont réduites en l'absence de Kir4.2. Une ammoniogénèse faible pourrait donc causer l'ammoniurie inappropriée des souris *Kcnj15*^{-/-}.

DISCUSSION DE LA 1^{ÈRE} ÉTUDE

I. Invalider Kir4.2 ou Kir5.1 affecte l'ammoniurie et la calciurie

L'invalidation de *Kcnj15* provoque une acidose métabolique proximale, ou pRTA. Cette pRTA est accompagnée d'une hypercalciurie et d'une légère augmentation de la calcémie, les deux étant accentuées par une charge acide élevée. La pRTA étant associée chez l'Homme à une ostéopénie (Lemann *et al.*, 2000), l'hypercalciurie pourrait être secondaire à une résorption osseuse qui augmenterait la quantité d'ions Ca^{2+} filtrée. Elle pourrait aussi être secondaire à une diminution de l'activité de TRPV5 dans le TCD (Nijenhuis *et al.*, 2006). La pRTA des souris *Kcnj15*^{-/-} est aussi associée à une baisse de l'expression de protéines impliquées dans l'ammoniogénèse. Parmi elles, le défaut d'expression de SNAT3 pourrait expliquer l'urémie élevée des souris invalidées. En effet, la concentration plasmatique de la glutamine double durant l'acidose avant d'être rapidement normalisée par une consommation proximale accrue de glutamine *via* l'ammoniogénèse (voir section Introduction A.II.4.c). Or, SNAT3 est le principal transporteur impliqué dans l'entrée basolatérale de glutamine dans le TP. S'il n'est pas assez stimulé durant l'acidose, la glutamine plasmatique excédentaire pourrait être métabolisée en urée par le foie (Taylor & Curthoys, 2004). Les souris n'exprimant pas SNAT3 présentent d'ailleurs une ammoniurie faible et une urémie élevée (Chan *et al.*, 2016).

De façon remarquable, les souris *Kcnj16*^{-/-} n'exprimant pas Kir5.1 développent aussi une acidose métabolique hyperchlorémique associée à une hypercalciurie. Initialement, il avait été conclu que l'acidose pouvait être d'origine distale, car en l'absence de Kir5.1 le TCD est trop actif et inhiber pharmacologiquement son activité réduit l'acidose (Paulais *et al.*, 2011). Toutefois, ces souris ont, comme les souris *Kcnj15*^{-/-}, une ammoniurie 20 % plus faible que celle des souris sauvages malgré leur acidose, suggérant que le TP est affecté par l'absence de Kir5.1 (Paulais *et al.*, 2011). Considérant la pRTA des souris *Kcnj15*^{-/-}, l'acidose et *a fortiori* la calciurie des souris *Kcnj16*^{-/-} pourraient être, au moins partiellement, causées par un défaut d'ammoniogénèse proximale. Cependant, Kir4.2 étant en principe capable de former un homotétramère fonctionnel en l'absence de Kir5.1 (voir section Introduction B.I.2.d), sa perte de fonctionnalité chez les souris *Kcnj16*^{-/-} n'est pas évidente. Finalement, si dans l'ovocyte de Xénope Kir4.2 est bien partiellement adressée à la membrane plasmique (voir section Introduction B.I.2.c), nous avons montré que pour être présente *in vivo* sous sa forme mature, elle nécessite Kir5.1. Chez les souris *Kcnj16*^{-/-}, Kir4.2 serait retenue dans le RE.

II. *KCNJ15* est un gène candidat pour l'acidose proximale isolée

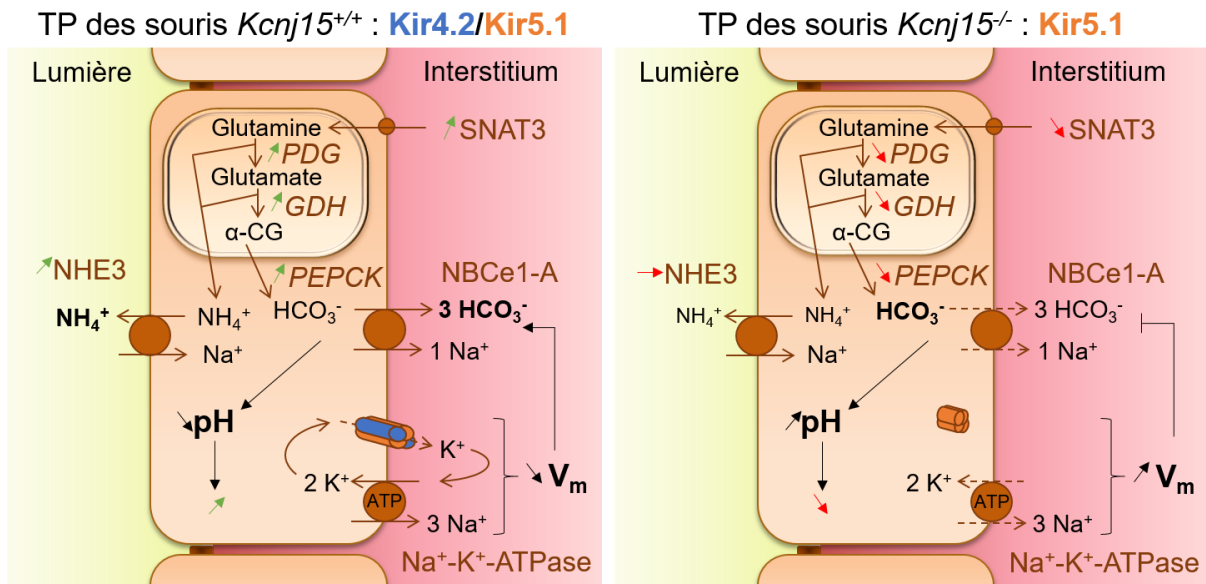
Chez l'Homme, les pRTA existent sous deux formes familiales. La forme autosomale récessive est causée par l'inactivation du gène encodant le co-transporteur NBCe-1A. La perte de fonctionnalité de NBCe-1A entraîne une diminution de la fraction des ions HCO_3^- filtrés qui est réabsorbée dans le TP. Contrairement à la plupart des pRTA acquises, consécutives à la MD ou à la cystinose, la pRTA autosomale récessive est rarement associée à d'autres signes de dysfonctionnement du TP: elle est dite "*isolée*" (Fry & Karet, 2007; Haque *et al.*, 2012). La seconde forme de pRTA familiale est autosomale dominante. Toujours isolée, elle est associée à une faible ammoniurie et à un pH urinaire bas (Brenes *et al.*, 1977; Brenes & Sanchez, 1993; Katzir *et al.*, 2008). Dans cette forme rare de pRTA, le(s) gène(s) en cause sont inconnus: des mutations dans les gènes encodant les anhydrases carboniques ACII, ACIV, ACXIV, les transporteurs NBCe1-A, NHE3, NHE8 et les facteurs de régulation NHERF1 ou NHERF2, ont été recherchées sans succès (Katzir *et al.*, 2008). Or, chez la souris, l'inactivation génétique de *Kcnj15* provoque aussi une pRTA isolée, associée à un pH urinaire bas et une faible ammoniurie. Des mutations inactivatrices de *KCNJ15* pourraient donc être chez l'Homme à l'origine de pRTA isolées à transmission autosomale dominante. De plus, comme attesté par les pathologies génétiques liées aux canaux Kir, l'assemblage des sous-unités Kir en tétramères à 1 pore est propice à un effet dominant négatif de leurs mutants (voir section Introduction B.II.3).

III. Mécanisme physiopathologique et rôle hypothétique de Kir4.2

Il est possible d'élaborer un mécanisme physiopathologique expliquant les observations moléculaires et la pRTA isolée chez les souris *Kcnj15*^{-/-}. Ce mécanisme nécessite de postuler que les canaux potassiques basolatéraux du TP contribuent à maintenir, *via* l'activité de la Na^+/K^+ -ATPase, un potentiel transmembranaire négatif. Or, Kir4.2 et Kir5.1 interagissent et sont exprimées à la membrane basolatérale des cellules du TP: elles y forment probablement un canal Kir4.2/Kir5.1. De plus, en l'absence de l'une ou de l'autre, la sous-unité Kir restante n'est pas capable de former seule un canal potassique. Dans ces conditions, chez les souris *Kcnj15*^{-/-} ou *Kcnj16*^{-/-}, l'absence du canal Kir4.2/Kir5.1 basolatéral provoquerait une dépolarisation membranaire. Plusieurs canaux potassiques étant exprimés à ce pôle des cellules proximales, la dépolarisation serait partielle (voir section Introduction B.III.2.b). De fait, seul le transporteur électrogénique NBCe-1A, dont le potentiel d'inversion est proche du potentiel physiologique de la membrane basolatérale V_m , serait affecté [voir Figure 20] (Soleimani *et al.*, 1987).

Dans le mécanisme proposé, la réabsorption des ions HCO_3^- intracellulaires par NBCe-1A serait donc réduite, provoquant une alcalinisation du cytoplasme. Or, l'acidification du pH intracellulaire est le principal moyen de stimulation de l'expression transcriptionnelle des enzymes de l'ammoniogénèse, de NHE3 et potentiellement de SNAT3 (voir section Introduction A.II.4.c). A terme, réduire l'activité de NBCe-1A serait donc capable de réduire l'ammoniogénèse proximale, nécessaire à la sécrétion luminale d'ions NH_4^+ et à la régénération des ions HCO_3^- plasmatiques [voir Figure 20] (voir section Introduction A.II.4.b).

Plusieurs points soutiennent que NBCe1-A puisse être affecté par l'absence de Kir4.2. Ainsi, il a été montré récemment que les souris n'exprimant pas NBCe-1A présentent non seulement une fuite urinaire d'ions HCO_3^- mais aussi, comme les souris *Kcnj15*^{-/-}, un défaut d'ammoniurie lié à une réduction de l'expression des enzymes PDG et PEPCK (Handlogten *et al.*, 2015). À titre de comparaison, les souris *Kcnj15*^{-/-} développent une pRTA dont l'amplitude est similaire à celle des souris hétérozygotes invalidées pour NBCe-1A, dont l'expression du co-transporteur est réduite (Gawenis *et al.*, 2007). Le pH urinaire et l'ammoniurie des 2 génotypes sont aussi affectés de manières équivalentes (Handlogten *et al.*, 2015).



*Figure 20: Mécanisme physiologique impliquant un canal Kir4.2/Kir5.1 basolatéral dans l'ammoniogénèse proximale (à gauche) et mécanisme physiopathologique hypothétique expliquant la pRTA des souris *Kcnj15*^{-/-} par une inactivité de NBCe-1A (à droite)*

Le mécanisme physiopathologique proposé est indépendant de l'origine de la dépolarisation de la membrane basolatérale du TP. Or, Kir4.2/Kir5.1 n'est pas le seul canal potassique basolatéral du TP (voir section Introduction B.III.2.b). Ainsi, de manière cohérente, invalider génétiquement TASK-2 qui est le seul autre canal potassique basolatéral du TP dont le rôle est reconnu, provoque aussi une pRTA. Chez ces souris, la perfusion intraveineuse d'une solution de NaHCO_3 a révélé l'existence d'une diminution de la réabsorption tubulaire des ions HCO_3^- filtrés (Warth *et al.*, 2004). En revanche, l'ammoniurie des souris n'a pas été mesurée. Les auteurs de cette étude ont proposé un mécanisme physiologique par lequel l'activité de TASK-2 serait couplée à celle de NBCe-1A: le co-transporteur, en alcalinisant le pH interstitiel, activerait le canal potassique qui est sensible au pH extracellulaire. Cependant, si TASK-2 est très sensible au pH extracellulaire à potentiel positif, il l'est beaucoup moins à potentiel négatif (Reyes *et al.*, 1998). Le canal potassique Kir4.2/Kir5.1 lui, est fortement activé par une faible alcalinisation intracellulaire (Pessia *et al.*, 2001). Il serait donc capable d'hyperpolariser la membrane basolatérale des cellules du TP lors d'une élévation de la concentration intracellulaire en ions HCO_3^- . Cela accélérerait la réabsorption des ions HCO_3^- excédentaires par NBCe-1A et assurerait le maintien d'un pH cytoplasmique suffisamment bas pour stimuler l'ammoniogénèse.

En conclusion, cette étude a permis de mettre en évidence que Kir4.2 est uniquement exprimée dans le TP, probablement sous la forme d'un canal potassique hétérotétramérique Kir4.2/Kir5.1 adressé à la membrane basolatérale des cellules. Alors que Kir5.1 n'est pas indispensable à la formation d'un canal potassique impliquant Kir4.1, elle l'est dans la formation d'un canal potassique impliquant Kir4.2. En effet, la maturation de Kir4.2 requiert Kir5.1. L'origine de cette dépendance de Kir4.2 à Kir5.1 n'est pas connue. Il est possible que l'assemblage des deux sous-unités puisse cacher, comme c'est le cas lors de l'association des sous-unités Kir6.x et SUR, des signaux de rétention dans le RE portés par Kir4.2 (voir Section Introduction B.I.2.c). Afin de vérifier si l'association de Kir5.1 à Kir4.2 permet l'adressage de cette dernière, il sera nécessaire d'évaluer *in vitro* et *in vivo* le degré d'expression à la surface cellulaire de Kir4.2 avec ou sans Kir5.1. Les régions impliquées dans cette association pourraient ensuite être recherchées *in vitro* par co-immunoprécipitation de formes tronquées de l'une ou l'autre. Par ailleurs, Kir4.2 étant retenu dans le RE en l'absence de Kir5.1, il serait intéressant de déterminer s'il existe des canaux Kir4.2 fonctionnels dans le RE et s'ils y ont un rôle. Dans ce cas, une expression transcriptionnelle réduite de Kir5.1 baisserait non seulement la quantité de canaux Kir4.2/Kir5.1 présente à la membrane basolatérale des cellules du TP, mais augmenterait aussi la quantité de canaux Kir4.2 exprimée dans le RE.

Quoi qu'il en soit, cette étude a également révélé un rôle de Kir4.2 dans le maintien de l'équilibre acido-basique, certainement *via* la stimulation indirecte de l'ammoniogénèse. Le mécanisme physiopathologique proposé afin d'expliquer l'ammoniurie faible des souris en l'absence de Kir4.2 demande à être vérifié. En particulier, il faudrait établir, par introduction de microélectrodes sélectives dans des cellules proximales de TP microdisséqués de souris sauvages et invalidées, si l'absence de Kir4.2 ou Kir5.1 provoque une alcalinisation cytoplasmique et/ou une dépolarisation. Toujours à l'aide de TP microdisséqués de souris sauvages et invalidées, il serait aussi nécessaire de montrer que l'absence de Kir4.2 ou Kir5.1 conduit à la disparition d'une conductance potassique basolatérale. Une telle démonstration, réalisée par patch-clamp en configuration cellule attachée, est difficile car le TP, très fragile, se prête mal à ce type d'enregistrement électrophysiologique. Elle permettrait toutefois d'identifier clairement la conductance et les propriétés d'un canal Kir4.2/Kir5.1 *in vivo*.

Finalement, l'invalidation de *Kcnj15* provoque chez la souris une atteinte rénale très particulière appelée une *acidose tubulaire rénale proximale isolée* ou pRTA isolée. À long terme, cette acidose pourrait, car elle est accompagnée d'une hypercalciurie, aboutir comme le font d'autres acidoses à l'apparition d'une néphrolithiase ou d'une ostéopénie (Sella *et al.*, 2008). Plus important, la perte de fonctionnalité de Kir4.2 pourraient être à l'origine d'une forme familiale de pRTA isolée à transmission autosomale dominante. Afin de le vérifier, il faudrait déterminer si chez les familles atteintes identifiées, au Costa Rica et en Syrie (Brenes *et al.*, 1977; Katzir *et al.*, 2008), les régions codantes de *KCNJ15* contiennent des variations de séquence. Une autre approche consisterait à rechercher de telles variations chez des patients présentant une pRTA familiale isolée idiopathique, par collaboration avec Rosa Vargas-Poussou du service de Génétique Humaine de l'Hôpital Européen Georges Pompidou, à Paris. *In fine*, les variations génétiques identifiées pourraient être analysées *in vitro* à l'aide des outils d'expression hétérologue des sous-unités Kir développés durant cette étude, afin d'évaluer leur impact sur la fonctionnalité de Kir4.2 et/ou son association à Kir5.1.

A l'avenir, l'importance de Kir4.2 dans les transports transépithéliaux du TP pourrait être reconnue, comme c'est le cas, depuis quelques années seulement, pour Kir4.1 dans le néphron distal.

C. SECONDE ÉTUDE: ANALYSE D'UN MUTANT DE CIC-5 IMPLIQUÉ DANS LA MALADIE DE DENT

INTRODUCTION DE LA 2^{NDE} ÉTUDE

I. La Maladie de Dent

1. Aspects cliniques de la Maladie de Dent

La Maladie de Dent (MD), dont les premières descriptions datent des années 1960, est le nom actuel d'une pathologie génétique rare liée à l'X décrite indépendamment dans différentes régions du monde sous des appellations variées (Dent & Friedman, 1964; Devuyst & Thakker, 2010). Malgré la grande hétérogénéité de la présentation clinique de la MD, ses anciennes dénominations mettaient en avant ses caractéristiques: cette maladie se manifeste systématiquement chez des individus masculins, par une fuite urinaire d'environ 1.28 g/jour de protéines filtrées appelée *protéinurie de bas poids moléculaire* (PiBPM) (voir Section Introduction A.II.3), accompagnée dans 80-90 % des cas d'une hypercalciurie. La MD est aussi inconstamment associée à d'autres signes du syndrome de Fanconi tels qu'une aminoacidurie (50 % des patients testés), une hypophosphatémie et/ou une hypokaliémie rénale (40 %), une glycosurie (40 %) ou une pRTA (10 %) (voir Section Introduction A.II.5.b). Quelques cas de syndrome de Fanconi complet (voir Section Introduction A.II.5.a), de forte polyurie/polydipsie, de défaut de concentration de l'urine ou de cécité nocturne ont été rapportés. Malgré une variabilité consécutive, les patients Dent présentent des concentrations plasmatiques de vitamine D parfois élevées et de PTH légèrement réduites (Scheinman, 1998; Becker-Cohen *et al.*, 2012; Mansour-Hendili *et al.*, 2015; Blanchard *et al.*, 2016).

Généralement diagnostiquée durant l'enfance, la MD progresse ensuite. Elle provoque souvent une atrophie tubulaire et une fibrose interstitielle rénale. Environ 50-60 % des patients Dent présentent une néphrocalcinose, 25 à 30 % une néphrolithiase et 20 à 30 % un rachitisme, un retard de croissance ou une ostéomalacie. *In fine*, selon les cohortes étudiées, elle aboutit à l'apparition d'une insuffisance rénale chronique entre la deuxième et la quatrième décennie de vie chez 30 à 80 % des patients. A l'heure actuelle, il n'existe pas de traitement thérapeutique ou spécifique pour la MD. La prescription de vitamine D afin de limiter le rachitisme est à éviter, car elle pourrait aggraver l'hypercalciurie, facteur de risque de la néphrocalcinose. Au contraire, l'utilisation de diurétiques thiazidiques, en vue de limiter l'hypercalciurie par compensation du néphron distal, peut être envisagée (Raja *et al.*, 2002; Blanchard *et al.*, 2008; Devuyst & Thakker, 2010; Mansour-Hendili *et al.*, 2015; Blanchard *et al.*, 2016).

2. Déterminants génétiques de la Maladie de Dent

La prévalence précise de la MD est inconnue. Elle n'a été diagnostiquée que chez environ 510 patients masculins issus de 430 familles d'origines géographiques très variées. Son mode d'hérédité est révélateur d'une transmission de mère en fils par le chromosome X. Les mères des patients ne sont pas malades, mais 60 % développent une PiBPM, 50 fois inférieure à celle des patients. Cette protéinurie est attribuée à l'inactivation aléatoire d'un chromosome X dans chaque cellule en possédant pourtant deux, générant des TP chimériques (Devuyst & Thakker, 2010; Mansour-Hendili *et al.*, 2015; Guven *et al.*, 2017; Wong *et al.*, 2017).

Au début des années 1990, une région précise du chromosome X fut liée à la MD (Pook *et al.*, 1993; Scheinman *et al.*, 1993; Fisher *et al.*, 1995). Peu après, un lien entre des mutations de cette région situées dans le gène *CLCN5* et la MD fut établi (Lloyd *et al.*, 1996; Akuta *et al.*, 1997; Lloyd *et al.*, 1997). Plus tard, ce sont des mutations dans le gène *OCRL1*, situé dans une autre région du chromosome X, qui ont été mises en évidence chez des patients Dent (Hoopes *et al.*, 2005; Sekine *et al.*, 2007). Depuis, la MD est subdivisée en 2 types: le type 1 se réfère aux patients dont le gène *CLCN5* est muté et le type 2 à ceux dont la mutation se situe sur *OCRL1*. Étonnamment, des mutations du gène *OCRL1* étaient déjà liées à l'apparition du syndrome de Lowe. Ce syndrome provoque un phénotype rénal similaire à celui de la MD, mais plus fréquemment associé à une acidose métabolique et à l'insuffisance rénale. Ces patients ont par ailleurs des symptômes extra-rénaux que n'ont pas les patients Dent type 1 ou 2: une cataracte congénitale et un retard mental sévère. Inversement, les patients Dent type 2 et Lowe sont moins sujets à la néphrocalcinose que les patients Dent type 1 (Bokenkamp *et al.*, 2009).

50 à 60 % des patients Dent sont porteurs d'une mutation de *CLCN5* (dont ~10 % *de novo*) et 15 % d'une mutation sur *OCRL1*. Les 25-35 % restants suggèrent l'implication de gènes non-identifiés dans la MD. Les mutations décrites sont inactivatrices. S'agissant de *CLCN5*, plus de 240 ont été identifiées, parmi lesquelles 5 % de délétions larges, 17 % de mutations non-sens, 29 % de mutations décalant le cadre de lecture, 12 % de mutations dans des régions impliquées dans l'épissage du gène et 33 % de mutation faux-sens. Certaines mutations, partagées par ~20 familles ou plusieurs individus d'une famille, ont montrées qu'il n'existe pas de relation génotype-phénotype: les porteurs d'une même mutation ou d'un même type de mutation ont des atteintes rénales aux degrés de sévérité très variables (Devuyst & Thakker, 2010; Mansour-Hendili *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2016; Guven *et al.*, 2017; Wong *et al.*, 2017).

II. L'échangeur ClC-5 et la famille des ClC

1. Découverte et phylogénie des transporteurs de la famille ClC

Le gène *CLCN5* impliqué dans la MD de type I fait partie de la famille des gènes *CLCN* et code pour une protéine de 746 résidus appelée ClC-5. Le clonage du premier gène *CLCN* fut réalisé peu après celui du canal CFTR impliqué dans la mucoviscidose: dès 1990, le groupe de Thomas Jentsch parvient à purifier l'ARNm du canal chlorure de l'organe électrique de la raie *Torpedo marmorata* et à le sous-cloner afin de l'exprimer dans des ovocytes de Xénope. Le canal chlorure en question fut nommé ClC-0 ("*Cl* Channel 0") (Jentsch *et al.*, 1990). En 5 ans furent ensuite clonés par homologie les 9 gènes *CLCN* humains connus aujourd'hui et partagés par l'ensemble des mammifères. Ces gènes codent pour des canaux chlorure ou des échangeurs chlore/proton phylogénétiquement apparentés et appelés "*transporteurs de la famille ClC*" [Voir Figure 21]. Ces gènes possèdent des orthologues dans l'ensemble du vivant et sont très conservés (Brandt & Jentsch, 1995; Jentsch *et al.*, 1995; Bennetts *et al.*, 2005; Jentsch, 2015).

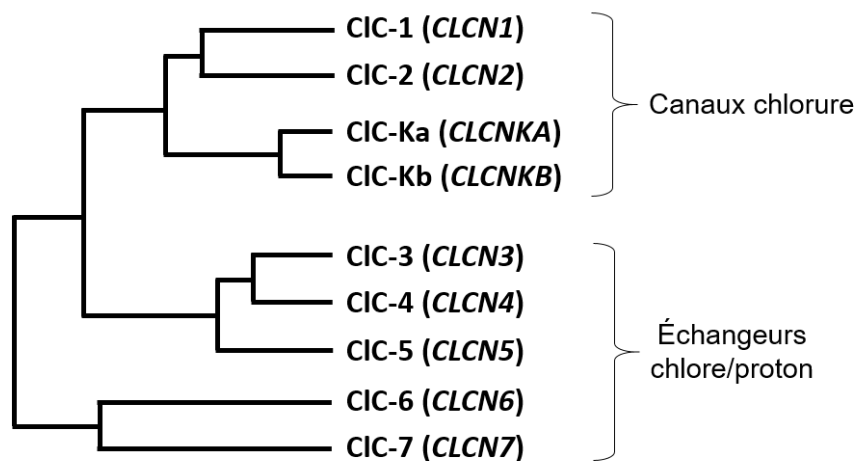
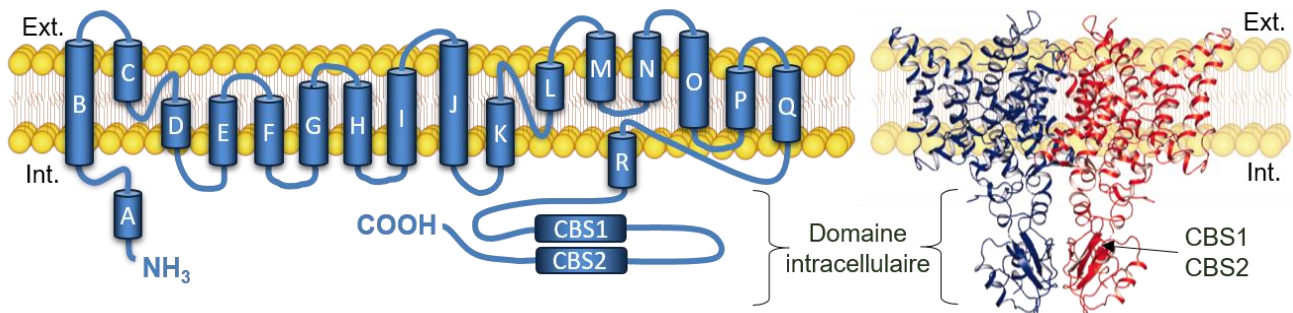


Figure 21: Arbre phylogénétique des transporteurs ClC (d'après Jentsch *et al.*, 2015)

Les 9 ClC homologues des mammifères partagent les uns avec les autres des degrés d'identité allant de 30 à 90 %. Ainsi, ClC-2 partage 50 % de sa séquence codante avec l'orthologue de ClC-0 appelé ClC-1 et 45 % avec les deux ClC-K, identiques entre eux à 90 %. Les échangeurs ClC-3, ClC-4 et ClC-5 sont identiques à 80 % entre eux et à environ 30 % aux autres ClC. Enfin, ClC-6 et ClC-7 sont identiques à 45 % entre eux et à 20-30 % avec les autres ClC (Kieferle *et al.*, 1994; Brandt & Jentsch, 1995; Fisher *et al.*, 1995; Jentsch *et al.*, 1995; Jentsch *et al.*, 1999; Jentsch, 2008). Les ClC connus du reste de l'arbre du vivant (ecClC, cyClC, scClC, stClC, mcClC, *etc.*) partagent entre eux et avec les ClC des mammifères 20 à 30 % d'identité (Hechenberger *et al.*, 1996; Jentsch *et al.*, 1999; Feng *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2017).

2. Structure des transporteurs de la famille ClC

Malgré leurs différences, tous les ClC possèdent une structure équivalente. Cette structure conservée des ClC fut d'abord supputée par l'analyse de leurs séquences primaires (Jentsch *et al.*, 1990), puis examinée par des méthodes biochimiques (Schmidt-Rose & Jentsch, 1997). Elle fut finalement déterminée avec précision par la cristallographie des échangeurs ClC de *Escherichia coli* (ecClC) et *Salmonella enterica* serotype *thyphimurium* (stClC), de la cyanobactérie *Synechocystic sp.* (cyClC), puis de l'algue rouge *Cyanidioschyzon merolae* (cmClC) et d'un canal ClC-K bovin. Une protéine ClC se compose de 18 hélices α à l'insertion membranaire variable nommées de A à R et d'extrémités N-terminale et C-terminale intracellulaires. Les hélices B à I et J à Q constituent deux motifs anti-parallèles répétés (Dutzler *et al.*, 2002; Feng *et al.*, 2010; Jayaram *et al.*, 2011; Accardi, 2015; Park *et al.*, 2017). Chez les ClC des eucaryotes la région C-terminale contient 2 domaines cystathionine- β -synthase appelés CBS1 et CBS2 [Voir Figure 22]. Généralement absents chez les ClC de procaryotes, ils furent cristallographiés ou modélisés seuls, chez quelques ClC dont le ClC-5 (Wu *et al.*, 2003; Bennetts *et al.*, 2005; Meyer & Dutzler, 2006; Markovic & Dutzler, 2007; Meyer *et al.*, 2007).



*Figure 22: Structure secondaire (à gauche, d'après Wang *et al.*, 2003) et structure tridimensionnelle d'un ClC (à droite, d'après le cristal de cmClC par Feng *et al.*, 2010)*

La cristallographie des ClC à également permis d'identifier leur structure tridimensionnelle. Les extrémités des ClC se joignent en un domaine intracellulaire sous-membranaire qui comprend les domaines CBS, associés en tandem. Cette méthode a également confirmé ce que l'analyse des courants ClC (voir Section Introduction C.II.3.a) et des observations biochimiques (Middleton *et al.*, 1996) avaient supposé: les transporteurs ClC sont des homodimères de protéines ClC reliées par leurs domaines membranaires et intracellulaires [Voir Figure 22]. Chez l'échangeur ClC-5, les hélices α O, P, Q, H et dans une moindre mesure I et B sont situées à l'interface des 2 monomères et impliquées dans la stabilité de la dimérisation (Jentsch *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2003; Lourdel *et al.*, 2012; Jentsch, 2015).

3. Propriétés électrophysiologiques et régulations des ClC

a. Le *slow gating* et le *fast gating* de ClC

Les premiers enregistrements électrophysiologiques d'un transporteur ClC sont antérieurs aux clonages des protéines ClC. En effet, entre 1982 et 1984, Miller et al. ont observé les courants produits par le canal chlorure ClC-0 purifié depuis l'organe électrique de *Torpedo marmorata* puis inséré dans une bicouche lipidique (Miller, 1982; Miller & White, 1984). Leurs premières analyses électrophysiologiques et celles qui ont suivies le clonage des gènes *CLCN* ont permis de mettre en évidence les propriétés de "*gating*" des ClC: par patch-clamp en configuration canal unitaire, ils ont montré que ces canaux présentent des phases d'ouverture plus ou moins complètes entrecoupées de phases de fermeture totale de quelques secondes. Cette propriété est appelée le "*Slow gating*" des ClC. Durant les phases d'ouverture, il coexiste deux niveaux de courants O1 et O2 de mêmes amplitudes qui s'enchaînent en quelques millisecondes depuis le niveau de fermeture total F du transporteur. Cette seconde propriété, appelée le "*Fast gating*" des ClC, a rapidement fait émerger l'idée que ces transporteurs fonctionnent en dimères: les deux niveaux de courants correspondent à l'ouverture d'un ou deux pores du canal qui en contient deux [Voir Figure 23]. Pour expliquer les longues fermetures des ClC, l'hypothèse d'une "*porte commune*" à ces deux pores a été avancée (Miller & White, 1984; Jentsch *et al.*, 1990; Ludewig *et al.*, 1996; Middleton *et al.*, 1996) (Weinreich & Jentsch, 2001). Une nouvelle fois, la cristallographie des ClC a confirmé ces hypothèses: chaque protéine ClC possède bien son propre pore appelé "*protopore*", qui est indépendant du protopore de l'autre protéine ClC du dimère. Les ouvertures/fermetures des protopores lors du *Fast gating* des ClC se font rapidement et sans modifier la structure générale du transporteur, au contraire du *Slow gating*, qui est causé par la fermeture des protopores suite à un changement conséquent de la conformation du dimère (Dutzler *et al.*, 2003; Accardi, 2015; Jentsch, 2015).

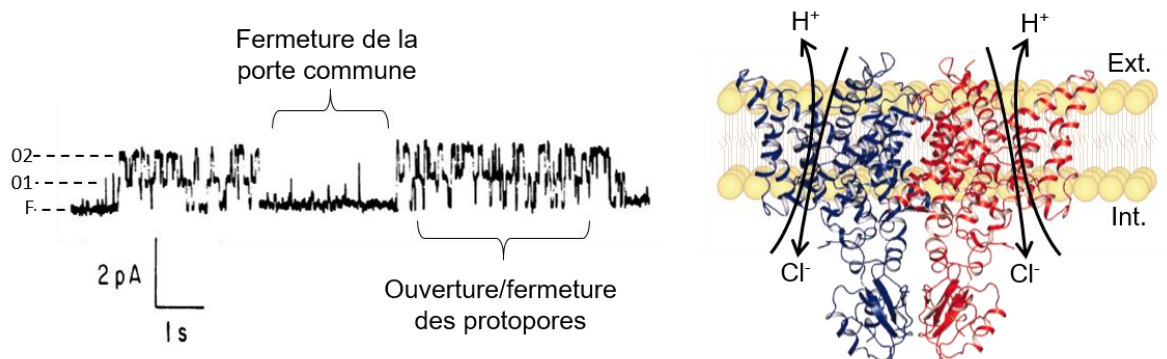


Figure 23: Courants illustrant le Slow et le Fast gating des ClC (à gauche, d'après Miller & White, 1984) et localisation des pores d'un échangeur ClC (à droite, d'après Feng *et al.*, 2010)

b. Le couplage du transport des ions Cl^- et H^+ chez les échangeurs ClC

Lors de leur clonage, il fut démontré que ClC-0, ClC-1, ClC-2 et les deux ClC-K étaient des canaux chlorure. C'est pourquoi au moment de leurs descriptions, il fut admis que les autres ClC perméables aux ions Cl^- étaient des canaux. Mais en 2004, Accardi et Miller ont démontrés *in vitro*, de manière très surprenante, que ecClC était en réalité un échangeur $2\text{Cl}^-/\text{H}^+$ (Accardi & Miller, 2004). Rapidement, il fut alors démontré que les ClC-3 à ClC-7 étaient également des échangeurs $2\text{Cl}^-/\text{H}^+$ (Picollo & Pusch, 2005; Scheel *et al.*, 2005; Graves *et al.*, 2008; Matsuda *et al.*, 2010; Neagoe *et al.*, 2010). Les ClC sont donc des canaux ou des transporteurs secondairement actifs. Pourtant, à l'inverse des ClC, les échangeurs changent généralement fortement de conformation au cours de leur cycle de transport. Afin de mieux comprendre le cycle de transport des échangeurs ClC, des analyses fonctionnelles de mutants artificiels ont été réalisées, assistées par de la cristallographie (Basilio *et al.*, 2014; Accardi, 2015).

Trois sites majeurs concernant le pore des ClC ont ainsi été découverts. Le premier fait appel à un résidu glutamate extracellulaire conservé, appelé le "*gating glutamate*" (G_{Glu}): sa chaîne latérale située dans le pore obstrue le passage des ions chlorure vers un de leurs sites de fixation. Lorsque le G_{Glu} fixe un proton, sa chaîne latérale se déplace, le côté extracellulaire du pore s'ouvre et deux ions Cl^- s'y engouffrent. Selon le sens des flux, soit le G_{Glu} se déprotone vers le milieu extracellulaire et reprend ensuite sa place dans le pore, soit il reprend place dans le pore puis se déprotone vers un résidu intracellulaire qui permettra le transport de l'ion H^+ jusqu'au cytosol [Voir Figure 24] (Dutzler *et al.*, 2003; Accardi & Miller, 2004; Feng *et al.*, 2010). Le second site identifié, situé en fin d'hélice H, contribue au passage des ions H^+ dans le pore depuis et vers le G_{Glu} : il s'agit d'un glutamate intracellulaire appelé "*proton glutamate*" (P_{Glu}), absent chez les canaux chlorure ClC (Accardi *et al.*, 2005; Zdebik *et al.*, 2008; Neagoe *et al.*, 2010). Le dernier site forme une porte interne située dans le pore, contenant une "*tyrosine centrale*" (C_{Tyr}). Cette porte, déterminante pour la sélectivité des ClC, permet le déplacement des ions Cl^- vers le milieu intracellulaire (Accardi, 2015). L'arrivée d'ions Cl^- dans le pore par le côté intracellulaire déplace le G_{Glu} et rend alors possible sa protonation ou sa déprotonation dans le milieu extracellulaire. L'ouverture ou la fermeture du côté extracellulaire du pore modifierait la conformation de l'hélice O et actionnerait la porte interne de manière opposée. Ce phénomène couplerait le transport des ions H^+ et l'accès des ions Cl^- au pore [Voir Figure 24] (Feng *et al.*, 2010; Feng *et al.*, 2012; Basilio *et al.*, 2014; Accardi, 2015; Zifarelli, 2015; Khantwal *et al.*, 2016; Park *et al.*, 2017).

L'ensemble produit un modèle de cycle de transport des ions H^+ et Cl^- qui serait à l'origine du *Fast gating* des ClC et qui peut expliquer plusieurs des caractéristiques des échangeurs, comme leur stœchiométrie 2:1 indépendante du pH ou l'existence d'une phase de transport durant laquelle le pore contient simultanément 2 ions Cl^- et 1 ion H^+ (Basilio *et al.*, 2014; Accardi, 2015). Ce modèle permet aussi de comprendre les courants générés par les mutants artificiels des G_{Glu} et P_{Glu} de ClC-5 et des autres échangeurs ClC: lorsque le G_{Glu} de ClC-5, situé en position 211 est muté en alanine (E211A), un résidu dont la chaîne latérale est courte, il s'ensuit une ouverture constitutive du côté extracellulaire du pore aux ions Cl^- . Le passage des ions H^+ n'étant en revanche plus possible, l'échangeur ClC-5 devient donc un canal chlorure (Scheel *et al.*, 2005). Ce phénomène a aussi été démontré chez d'autres échangeurs ClC (Li *et al.*, 2002; Accardi & Miller, 2004; Picollo & Pusch, 2005; Matsuda *et al.*, 2010; Neagoe *et al.*, 2010). Lorsque le P_{Glu} de ClC-5, situé en position 268 (E268), est muté en acide aminé neutre ne pouvant pas être protoné, ClC-5 ne peut alors plus transporter de protons vers ou depuis le G_{Glu} . En effet, sa porte interne (possiblement formée par une C_{Tyr} en position 558 et une Sérine en position 168) serait alors bloquée en position fermée, empêchant également le transport d'ions chlorure [Voir Figure 24] (Zdebik *et al.*, 2008; Grieschat & Alekov, 2012; Satoh *et al.*, 2016). Muter le P_{Glu} rend non-fonctionnels d'autres échangeurs ClC (Zdebik *et al.*, 2008; Neagoe *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2012; Guzman *et al.*, 2013).

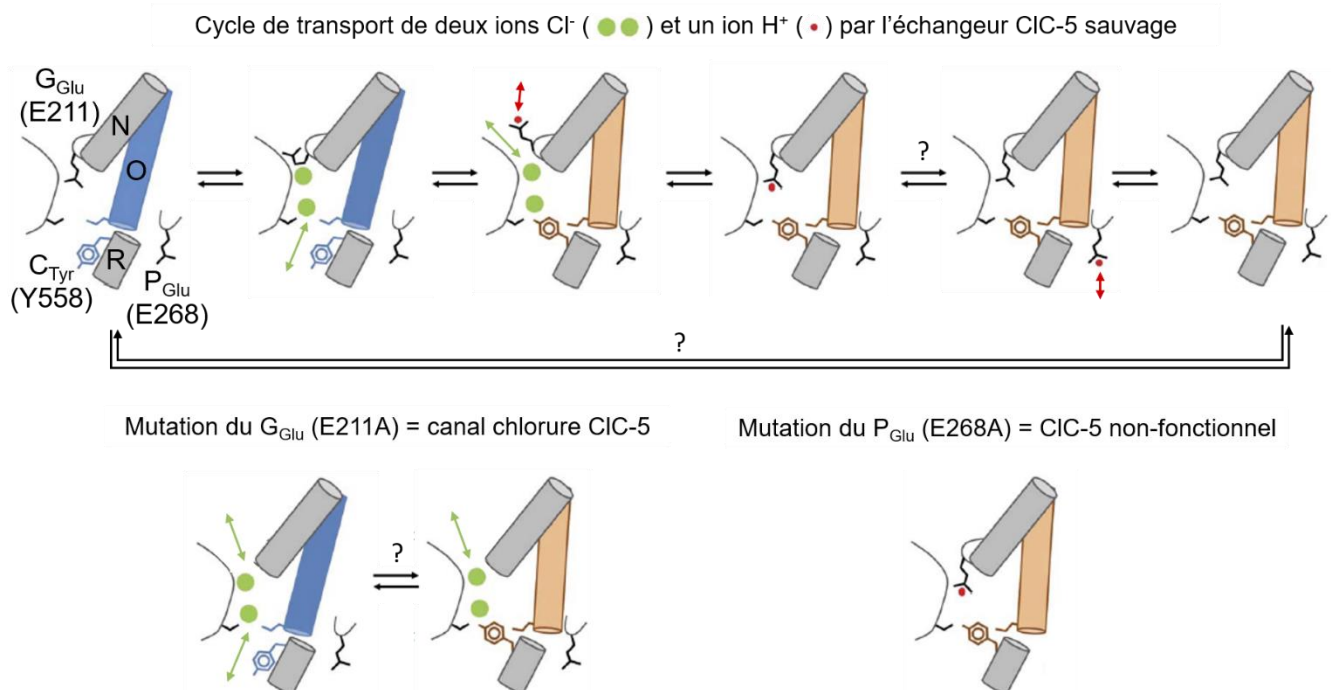


Figure 24: Modèle explicatif du couplage des transports d'ions Cl^- et H^+ dans le pore de ClC-5 et effet des mutations de ses G_{Glu} et P_{Glu} (modifié depuis Basilio *et al.*, 2010)

Selon ce modèle, les canaux ClC seraient des échangeurs $2\text{Cl}^-/\text{H}^+$ dont la porte interne ne ferme pas correctement le pore, dans lequel les ions Cl^- entrent sans contrainte. Cette hypothèse est appuyée par la transformation presque complète en canal chlorure d'un ecClC dont la C_{Tyr} est mutée (Accardi *et al.*, 2006). Chez les canaux ClC, de nombreux ions Cl^- circuleraient donc librement et rapidement à travers leur pore en l'absence de G_{glu} (chez les deux ClC-K) ou lors du cycle de transport d'un seul proton (Feng *et al.*, 2010; Basilio *et al.*, 2014; Khantwal *et al.*, 2016; Park *et al.*, 2017). Un tel découplage concorde avec l'observation d'un flux faible d'ions H^+ , dont l'importance physiologique est négligeable, chez les canaux ClC-0 et ClC-1 qui possèdent un G_{glu} . Ces canaux seraient en fait des échangeurs $2\text{Cl}^-/\text{H}^+$ transportant presque uniquement des ions Cl^- (Picollo & Pusch, 2005; Lisal & Maduke, 2008).

Cependant, il subsiste des incompréhensions concernant le fonctionnement du pore des ClC. Premièrement, chez les ClC-K la présence d'un *Fast gating* en l'absence d'un *gating glutamate* et d'une porte interne étanche aux ions Cl^- suggère que les ouvertures/fermetures rapides des protopores dépendent chez eux d'autres sites (Zdebik *et al.*, 2008; Stolting *et al.*, 2015; Park *et al.*, 2017). Deuxièmement, le mécanisme qui déclenche l'ouverture de la porte interne sans mouvement du G_{Glu} n'est pas connu. Il est indépendant du pH, dissocié de la déprotonation du P_{Glu} et nécessite un G_{Glu} déprotoné (Basilio *et al.*, 2014; Accardi, 2015). Plusieurs études suggèrent que la porte interne est impliquée dans les phases de *Slow gating* et la fermeture synchronisée des protopores (Lisal & Maduke, 2008; Bennetts & Parker, 2013). La porte interne pourrait donc être impliquée à la fois dans le *Slow gating* et le *Fast gating* des ClC. Enfin, le déplacement des protons entre le P_{glu} et le G_{glu} , distants d'environ 15 Å, reste incompris. Ce transfert passerait partiellement par le pore des ions Cl^- et pourrait nécessiter la présence d'eau dans le domaine membranaire du transporteur (Zifarelli, 2015). Par ailleurs, insérer un P_{Glu} en fin d'hélice H chez les canaux ClC possédant un G_{glu} n'est pas suffisant pour en faire des échangeurs de stœchiométrie 2:1 (Accardi *et al.*, 2005; Zdebik *et al.*, 2008; Neagoe *et al.*, 2010). Cela suggère l'existence de sites de fixation des ions H^+ inconnus entre le P_{glu} et le G_{glu} . En outre, le P_{Glu} n'est pas nécessaire à la fonctionnalité de tous les ClC. En effet, contrairement aux observations réalisées sur ClC-5, ClC-3 et ClC-4 (Zdebik *et al.*, 2008; Grieschat & Alekov, 2012; Guzman *et al.*, 2013) muter le P_{Glu} de l'échangeur ecClC n'abolit pas ses courants mais le transforme en un canal chlorure. Cela suggère que ce transporteur muté est capable de protoner et déprotoner son G_{glu} sans transport net d'ions H^+ à travers la membrane (Accardi *et al.*, 2005; Zifarelli, 2015). Enfin, quelques ClC non-humains tels que cmClC transportent des ions H^+ mais ne possèdent pas de P_{glu} (Feng *et al.*, 2010; Phillips *et al.*, 2012).

c. Principales régulations électrophysiologiques des transporteurs ClC

Malgré leurs structures semblables, les ClC ont des propriétés électrophysiologiques hétérogènes. Ainsi, les canaux ClC-0, ClC-1 et ClC-2 sont plus actifs aux potentiels inférieurs que supérieurs à leur potentiel d'inversion: ils sont "*rectifiants entrants*" (Jentsch *et al.*, 1990; Accardi & Pusch, 2000; Niemeyer *et al.*, 2009). Les 5 échangeurs ClC sont, quant à eux, "*rectifiants sortants*" (Steinmeyer *et al.*, 1995; Scheel *et al.*, 2005; Zdebik *et al.*, 2008; Matsuda *et al.*, 2010; Neagoe *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2012). Chez ClC-5, la rectification est forte: de fait, ses courants entrants sont quasiment nuls [Voir Figure 25] (Steinmeyer *et al.*, 1995; Friedrich *et al.*, 1999; Zifarelli & Pusch, 2009a; Smith & Lippiat, 2010; Leisle *et al.*, 2011).

Il est bien établi que cette dépendance au voltage des ClC est liée à la présence du G_{Glu} dans le pore (voir Section Introduction C.II.3.b). En effet, la mutation de ce résidu rend les ClC indépendants du voltage membranaire (Friedrich *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2002; Dutzler *et al.*, 2003; Traverso *et al.*, 2003; Accardi & Miller, 2004; Picollo & Pusch, 2005; Scheel *et al.*, 2005; Bergsdorf *et al.*, 2009; Matsuda *et al.*, 2010). De plus, les ClC-K qui ne possèdent pas de G_{Glu} ne présentent pas distinctement de dépendance au voltage (Gradogna *et al.*, 2010; Keck *et al.*, 2013). Le ClC-Ka de rat (appelé rClC-K1) fait exception: il montre une rectification entrante, qui est affectée par l'introduction artificielle d'un G_{Glu} (Fischer *et al.*, 2010). La rectification des ClC proviendrait d'étapes du cycle de transport des ions dans le pore, impliquant le G_{Glu} , dont l'efficacité dépend du voltage (Jentsch, 2008). Ainsi, il fut proposé que la rectification de ClC-5 soit la conséquence d'une plus grande facilité des protons à se déplacer du P_{Glu} au G_{Glu} et du G_{Glu} vers le milieu extracellulaire aux potentiels membranaires élevés (Zdebik *et al.*, 2008). Cependant, il fut ensuite démontré que la capacité du G_{Glu} à fixer les ions H^+ est indépendante du potentiel (Zifarelli & Pusch, 2009a). Par ailleurs, la dépendance au voltage de ClC-5 est décalée vers des potentiels plus positifs lorsque la concentration intracellulaire en ions chlorure augmente, mais n'est pas affectée par le pH intracellulaire (Smith & Lippiat, 2010). L'origine moléculaire de la rectification des courants chez les ClC n'est donc pas clairement définie. À première vue ils ne contiennent pas, comme les canaux K_v , de résidus capteurs du voltage modifiant leur conformation (Jentsch, 2008). Cependant le *Slow gating* et le *Fast gating* de certains ClC, consécutifs à des changements de conformation (voir Section Introduction C.II.3.a) sont dépendants du potentiel (Jentsch *et al.*, 1990; Fischer *et al.*, 2010). Des changements de conformation des ClC selon le potentiel pourraient donc expliquer leur rectification (Leisle *et al.*, 2011; Ludwig *et al.*, 2013).

L'activité des ClC peut aussi dépendre du pH et/ou de la concentration en chlorure de part et d'autre de la membrane. Ces propriétés varient d'un ClC à l'autre indépendamment de la nature de leurs transports (Accardi, 2015). Ainsi ClC-1, ClC-2, ClC-6, ClC-3 et ClC-7 sont activés par les ions H^+ externes (Jentsch *et al.*, 1999; Jentsch, 2008; Matsuda *et al.*, 2010; Neagoe *et al.*, 2010) alors que les ClC-K (Gradogna *et al.*, 2010; Andrini *et al.*, 2015), ClC-4 et ClC-5 (Friedrich *et al.*, 1999; Picollo & Pusch, 2005; Scheel *et al.*, 2005; Picollo *et al.*, 2010; Smith & Lippiat, 2010) sont inhibés par les ions H^+ extracellulaires [Voir Figure 25].

L'inhibition des courants de ClC-5 par l'acidification extracellulaire pourrait être expliquée par la réduction du gradient en ions H^+ , mais ce phénomène est accentué lorsque les ions chlorure extracellulaires sont moins concentrés. L'inhibition de ClC5 par les protons externes pourrait donc être liée à une compétition des ions Cl^- et du G_{Glu} pour l'entrée dans le pore. Plus la protonation du G_{Glu} par les protons externes est forte, plus cela favoriserait son blocage dans le pore de l'échangeur (Picollo *et al.*, 2010). D'ailleurs, une mutation du G_{Glu} de ClC-4 ou de ClC-5 (E211A) fait disparaître leur sensibilité au pH extracellulaire [Voir Figure 25] (Picollo & Pusch, 2005; Scheel *et al.*, 2005; Satoh *et al.*, 2016).

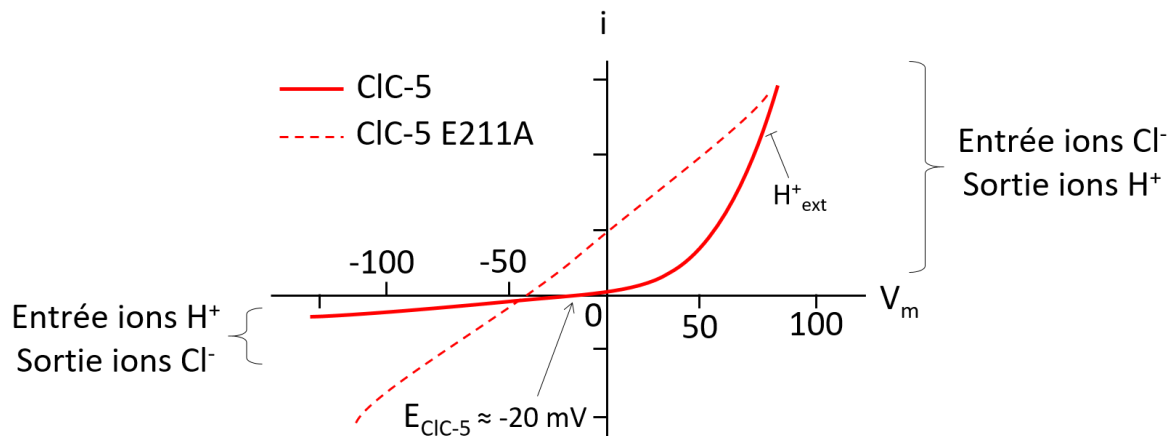


Figure 25: Schéma de la dépendance au voltage des courants de l'échangeur $2Cl^-/H^+$ ClC-5 sauvage et du canal chlorure ClC-5 dont le G_{Glu} est muté (d'après Scheel *et al.*, 2005)

Chez ClC-2, l'activation par les H^+ externes varie aussi selon la concentration intracellulaire en ion Cl^- et elle nécessite la présence du G_{Glu} (Jentsch *et al.*, 1999; Niemeyer *et al.*, 2009). Mais la possibilité que les protons exercent une inhibition sur certains ClC par un effet allostérique direct n'est pas écartée (Picollo *et al.*, 2010). En fait, les ClC-K sont inhibés par les protons et activés par les ions Ca^{2+} externes *via* leur fixation sur des résidus précis, qui provoque un changement de leur conformation (Gradogna *et al.*, 2010; Andrini *et al.*, 2015). De même, la conformation de régions précises du cristal de ecClC dépend de l'environnement du transporteur en termes de pH et d'ions chlorure (Elvington *et al.*, 2009; Basilio *et al.*, 2014).

d. La régulation des ClC par des sous-unités β et les domaines CBS

À l'heure actuelle, 3 sous-unités β , associées à des dimères de ClC, ont été décrites. La première fut la Barttine: cette sous-unité β permet la maturation et l'adressage à la membrane plasmique des deux ClC-K, un élément qui fut nécessaire à leur caractérisation électrophysiologique. Elle modifie également les propriétés des ClC-K et augmente leur stabilité (Estevez *et al.*, 2001; Waldegger *et al.*, 2002; Hayama *et al.*, 2003; Scholl *et al.*, 2006; Janssen *et al.*, 2009; Stolting *et al.*, 2015). Pour cela, 4 exemplaires de cette protéine, constituée de 320 résidus et deux domaines transmembranaires, interagiraient avec les hélices B et J d'un dimère de ClC-Ka ou de ClC-Kb (Tajima *et al.*, 2007). Chez les bovins, la Barttine pourrait n'être impliquée que dans l'adressage des ClC-K (Park *et al.*, 2017). La seconde sous-unité β d'un ClC découverte fut Ostm1: il s'agit d'une protéine constituée de 338 résidus, possédant un domaine transmembranaire et une longue extrémité N-terminale extracellulaire. Elle permet à l'échangeur ClC-7 de rester stable et actif dans les lysosomes où il est exprimé (voir Section Introduction C.II.4.a). Alors que les protéines lysosomales sont généralement hautement glycosylées afin d'être protégées des protéases qu'elles côtoient, ClC-7 est le seul ClC dont la maturation et l'adressage n'entraîne pas de N-glycosylation (voir Section Introduction B.I.2.c). Ostm1, au contraire très glycosylée, serait clivée à son extrémité N-terminale dans les lysosomes, se lierait par son domaine membranaire à ClC-7 et le protégerait de la protéolyse (Lange *et al.*, 2006; Leisle *et al.*, 2011). Contrairement aux deux précédentes, GlialCAM n'est pas obligatoire à son partenaire et ne fait que le réguler: en s'associant *via* ses 8 domaines transmembranaires à ClC-2, elle réduit sa rectification entrante, ses courants et l'adresse dans des zones de contact cellule-cellule (Jeworutzki *et al.*, 2012; Capdevila-Nortes *et al.*, 2015).

L'adressage à la surface cellulaire et la maturation N-glycosidique de ClC-5 ne requièrent pas de sous-unité β (Grand *et al.*, 2009). Cependant ClC-5 lie systématiquement par ses 2 domaines CBS des nucléotides comme l'ADP et l'ATP. Le rôle de cette liaison (présente chez d'autres ClC) n'est pas connu, mais l'empêcher réduit les courants produits par ClC-5 et font subsister sa dépendance au voltage lorsque l'on mute son G_{Glu} (Meyer *et al.*, 2007; Zifarelli & Pusch, 2009b; Accardi, 2015). Globalement, les CBS et l'extrémité C-terminale des ClC pourraient être impliqués dans la régulation de leur *gating* et de leur adressage (Estevez *et al.*, 2004; Bennetts *et al.*, 2005; Leisle *et al.*, 2011; Ludwig *et al.*, 2013; Stolting *et al.*, 2015). Chez ClC-5 ils pourraient aussi contribuer à l'ubiquitylation et la dégradation par Nedd4.2 (voir Section Introduction C.IV.3.b) (Schwake *et al.*, 2001; Carr *et al.*, 2003; Hryciw *et al.*, 2004).

4. Revue des rôles physiologiques et physiopathologiques des ClC

a. Profil d'expression et rôles connus des transporteurs ClC

L'invalidation du gène *Clcn1* encodant ClC-1 fut, peu après son clonage, associée à l'apparition d'une myotonie chez la souris (Steinmeyer *et al.*, 1991). Puis, des mutations inactivatrices dominantes (Koch *et al.*, 1992) et récessives (Koch *et al.*, 1993) de *CLCN1* ont été décrites chez des patients atteints de myotonie congénitale. Finalement, des mutations de ce type ont été associées aux myotonies congénitales chez la chèvre et le chien. Les mutations dominantes de *CLCN1* aboutissent à une *myotonie de type Thomsen*, plus sévère que la forme récessive appelée *myotonie de type Becker* (Jentsch, 2008). A l'heure actuelle, plus de 130 mutations de *CLCN1* ont été identifiées chez des patients myotoniques. Par ailleurs, l'invalidation de *CLCN1* contribuerait à l'apparition de myotonies dans la maladie de Huntington et les dystrophies myotoniques (Jentsch, 2015; Poroca *et al.*, 2017). Les myotonies liées à *CLCN1* sont expliquées par le niveau d'expression élevé de ClC-1 dans le muscle squelettique, seul tissu où il a initialement été rapporté chez la souris (Steinmeyer *et al.*, 1991). ClC-1 est un canal chlorure activé par la dépolarisation qui possède une conductance unitaire de 1-2 pS. Dans le muscle, ce canal est exprimé au niveau des sarcolemmes et est à l'origine de 80 % de la conductance de repos des cellules. Il y stabilise le potentiel musculaire de repos et permet la repolarisation des cellules musculaires après un potentiel d'action. Sa perte de fonctionnalité provoque donc une hyperexcitabilité et des contractions musculaires involontaires définissant la myotonie (Jentsch, 2008; Jentsch, 2015). Plus récemment, des polymorphismes de *CLCN1* et son expression dans le cerveau ont été associés à des cas d'épilepsie (Chen *et al.*, 2013). Ce fait est actuellement accueilli avec scepticisme du fait de l'expression faible ou débattue de ClC-1 dans le cerveau et de l'absence d'épilepsie chez les patients et modèles animaux invalidés pour *CLCN1*. Toutefois, il est utile de rappeler que les conséquences des polymorphismes de *CLCN1* rapportés ici sur sont inconnus: ils pourraient s'agir de mutations activatrices de ClC-1 (Jentsch, 2015; Peddareddygar *et al.*, 2016).

Au contraire de ClC-1, le canal chlorure ClC-2 est exprimé à la membrane plasmique de nombreux épithéliums, dans le cœur et le système nerveux central. Il possède une conductance unitaire de 3 pS et est activé lentement par l'hyperpolarisation (Thiemann *et al.*, 1992; Jentsch, 2008; Jentsch, 2015).

L'étude du phénotype des souris invalidées génétiquement pour *Clcn2* a dans un premier temps mis en évidence l'importance de ClC-2 dans le fonctionnement de la rétine et des testicules. En effet, ces souris présentent une dégénérescence rétinienne et testiculaire qui apparaît en période post-natale et conduit à une cécité associée à une infertilité masculine (Bosl *et al.*, 2001; Bi *et al.*, 2013; Jentsch, 2015). La dégénérescence testiculaire des souris est attribuée à l'expression de ClC-2 dans les cellules de Sertoli, qui sont nécessaires à la formation d'une barrière nourricière entre le compartiment sanguin et les spermatogonies. En l'absence de ClC-2, l'environnement ionique des cellules testiculaires est affecté par l'absence de courants chlorure normalement stimulés par la dépolarisation. Un phénomène similaire a lieu dans la rétine, du fait de l'expression de ClC-2 dans la barrière sang/photorécepteurs que constitue l'épithélium pigmentaire rétinien (Bosl *et al.*, 2001; Jentsch, 2008; Jentsch, 2015; Poroca *et al.*, 2017). Chez l'homme, un cas d'azoospermie consécutive à l'inactivation génétique de *CLCN2* à été récemment rapporté (Di Bella *et al.*, 2014; Poroca *et al.*, 2017). Dans un second temps, la présence d'une leucodystrophie progressive, caractérisée par une vacuolisation des zones myélinisées du cerveau et de la moelle épinière, a été décrite chez les souris invalidées pour *Clcn2*. Cet aspect du phénotype est lié à l'expression de ClC-2 dans les cellules gliales (astrocytes, oligodendrocytes) entourant les neurones. Dans ces cellules, le canal ClC-2 est associé à sa sous-unité GlialCAM (voir Section Introduction C.II.3.d) (Blanz *et al.*, 2007; Jentsch, 2008; Jentsch, 2015). Les 2 contribueraient à un phénomène de "*Cl⁻ Buffering*" durant l'activité neuronale, similaire au rôle de Kir4.1/Kir5.1 dans le système nerveux (voir Section Introduction B.II.1.b). Dans cette fonction, GlialCAM est nécessaire à ClC-2 car elle l'adresse aux jonctions astrocytes/neurones ou astrocytes/capillaires et rend ses courants sortants (entrée d'ions Cl⁻) rapidement activables par l'hyperpolarisation (Jeworutzki *et al.*, 2012; Jentsch, 2015; Poroca *et al.*, 2017). En support de cette hypothèse, l'inactivation génétique de GlialCAM ou de ClC-2 provoque chez l'homme une leucodystrophie (Lopez-Hernandez *et al.*, 2011; Depienne *et al.*, 2013). Un temps, l'implication de *CLCN2* dans certaines épilepsies fut envisagée, mais a finalement été écartée (Niemeyer *et al.*, 2010; Jentsch, 2015). Les souris comme les patients ne disposant pas de ClC-2 ne montrent aucune susceptibilité à l'épilepsie, quelle soit spontanée ou provoquée (Blanz *et al.*, 2007; Jentsch, 2008; Depienne *et al.*, 2013).

Les canaux ClC-Ka et ClC-Kb, dont les orthologues murins sont appelés ClC-K1 et ClC-K2, ont été clonés depuis du tissu rénal du rat puis humain (Kieferle *et al.*, 1994; Uchida *et al.*, 1994). Leur expression à la membrane basolatérale des cellules nécessite leur association avec une sous-unité β , la Barttine (voir Section Introduction C.II.3.d) (Estevez *et al.*, 2001).

Les études sur des souris invalidées pour *Clcnk1*, et plus récemment pour *Clcnk2*, ont permis de montrer que ClC-K1 et ClC-K2 sont à l'origine de conductances chlorures de 45 et 10 pS respectivement, présentes dans les cellules épithéliales tubulaires du néphron distal. ClC-K1 est exprimé dans les membranes apicales et basolatérales de la branche fine de l'anse de Henle et à la membrane basolatérale de cellules de la BAL et des CI α . ClC-K2 est exprimé à la membrane basolatérale des cellules de la BAL, du TCD et des CI (voir Section Introduction A.III.1) (Uchida *et al.*, 1995; Kobayashi *et al.*, 2001; Hennings *et al.*, 2017). En l'absence de ClC-K1, les souris présentent un diabète insipide néphrogénique résistant à la vasopressine. Ce phénotype est expliqué par le rôle porté par ClC-K1 dans la circulation du chlorure dans la médulla interne et la constitution du gradient cortico-médullaire (Matsumura *et al.*, 1999; Kramer *et al.*, 2008; Andrini *et al.*, 2015). Le rôle de ClC-Kb est apparu lors de la découverte de mutations inactivatrices récessives de *CLCNKB* chez des patients atteints d'un syndrome de Bartter, conséquence d'un dysfonctionnement de la BAL (voir Section Introduction B.III.2.b) (Simon *et al.*, 1997). Par ailleurs, un syndrome de Bartter sévère est également présent chez les souris invalidées pour *Clcnk2* (Grill *et al.*, 2016; Hennings *et al.*, 2017). La physiopathologie émergente de ce syndrome de Bartter de type III met en avant le rôle indispensable de ClC-Kb dans la BAL et le TCD (potentiellement aussi dans le CC) dans la réabsorption du NaCl et des cations divalents filtrés (Andrini *et al.*, 2015; Pinelli *et al.*, 2016). L'absence d'un ClC-K ayant pour conséquence une augmentation du volume urinaire et des polymorphismes activateurs des deux ClC-K ayant été à de nombreuses reprises reliées à l'apparition d'une hypertension, la recherche de diurétiques inhibant les canaux ClC-K est un axe de recherche actuellement en développement (Liantonio *et al.*, 2016). Enfin, la découverte de syndromes de Bartter accompagnés d'une surdité, causés soit par l'inactivation récessives du gène encodant la Barttine (type IVa) soit, chez un patient, par l'inactivation récessive digéniques de *CLCNKA* et *CLCNKB* (type IVb), a mis à jour le rôle conjoint des homodimères de ClC-K dans le fonctionnement de l'oreille interne. En effet, exprimés à la membrane basolatérale des cellules de la *stria vascularis*, l'un ou l'autre contribuent à l'apparition du potentiel endocochléaire (Birkenhager *et al.*, 2001; Estevez *et al.*, 2001; Schlingmann *et al.*, 2004).

L' changeur ClC-3 est exprimé dans de nombreux tissus et organes incluant le cerveau, la rétine, le pancréas, l'intestin, le rein, le foie, le cœur et le muscle squelettique (Jentsch, 2015; Poroca *et al.*, 2017). Il y est exprimé exclusivement dans les endosomes de recyclage, tardifs, les lysosomes et les vésicules synaptiques. Son site d'adressage varie selon laquelle de ses 4 isoformes (appelées ClC-3a   ClC-3d) est exprimée (Guzman *et al.*, 2013; Poroca *et al.*, 2017).

Les 3 lignées de souris invalidées pour *Clcn3* étudiées présentent un retard de croissance sévère accompagné d'une dégénérescence progressive de la rétine et de l'hippocampe. Chez l'une des 3, il existe une surcharge lysosomale rétinienne semblable à celle des lipofuscinoses céroïdes (Stobrawa *et al.*, 2001; Jentsch, 2015; Poroca *et al.*, 2017). Cependant, les dégénérescences observées sont attribuées à la disparition d'une protéine co-localisée avec ClC-3 plutôt qu'à l'absence de ClC-3 lui-même (Jentsch, 2015). Dans les hépatocytes ou les vésicules synaptiques de ces souris, l'acidification et l'accumulation de chlore dans les endosomes est réduite (Stobrawa *et al.*, 2001; Hara-Chikuma *et al.*, 2005b). De plus, la sécrétion pancréatique d'insuline, qui requiert une accumulation de chlorure et une acidification des vésicules d'exocytose, pourrait nécessiter la présence de ClC-3 (Stauber & Jentsch, 2013). Enfin, les isoformes ClC-3a, ClC-3b et ClC-3c, adressées en principe aux endosomes tardifs, aux lysosomes et dans les endosomes de recyclage, sont exprimées dans le rein (Guzman *et al.*, 2013). ClC-3 pourrait donc contribuer, comme ClC-5, au fonctionnement du TP (voir Section Introduction C.III.2). Cependant la fonction rénale des souris invalidées pour *Clcn3* est intacte (Rickheit *et al.*, 2010). Par ailleurs, le côlon des patients souffrant d'une maladie inflammatoire chronique de l'intestin expriment moins de ClC-3 et les souris invalidées pour *Clcn3* sont sensibles à l'inflammation intestinales (Huang *et al.*, 2014; Poroca *et al.*, 2017).

Le rôle de l'échangeur ClC-4 est encore moins clair. Son expression, liée à la position variable de *CLCN4* dans le génome, est étendue mais variable: chez l'homme, il est exprimé dans les muscles, le cerveau et le cœur, alors qu'il se trouve également dans le foie, l'intestin et le rein des rongeurs. ClC-4 est exprimé au niveau des membranes endosomales des cellules, où il pourrait favoriser leur acidification, mais sa localisation précise reste indéterminée (Mohammad-Panah *et al.*, 2009; Jentsch, 2015; Poroca *et al.*, 2017). ClC-4 fut ainsi rapporté chez la souris au niveau des endosomes du TP et l'hypothèse de sa contribution au phénotype de la MD fut proposée (Mohammad-Panah *et al.*, 2003). Cependant l'absence lors de ces marquages de contrôles négatifs utilisant des souris invalidées et l'absence de PiBPM chez les souris invalidées pour *Clcn4* a écarté cette hypothèse (Mohammad-Panah *et al.*, 2009; Rickheit *et al.*, 2010; Jentsch, 2015). Récemment, des études ont montré que des mutations inactivatrices du gène *CLCN4* provoquaient un retard intellectuel sévère, accompagné ou non d'épilepsie. Pour cause, *in vitro* l'absence de *Clcn4* réduit la formation des neurites (Veeramah *et al.*, 2013; Jentsch, 2015; Hu *et al.*, 2016; Palmer *et al.*, 2016; Poroca *et al.*, 2017).

La localisation et les rôles de ClC-5 sont discutés en Section Introduction C.III.

L'ARNm de *CLCN6* est présent dans beaucoup de tissus, mais ClC-6 n'est exprimé chez la souris que dans les endosomes tardifs des cellules de l'hippocampe et du cortex (Brandt & Jentsch, 1995; Poet *et al.*, 2006). Les souris invalidées pour *Clcn6* ont une espérance de vie normale et ne présentent pas de retard de croissance, de problèmes oculaires ou de locomotion. Cependant, après 3 mois de vie elles commencent à accumuler anormalement, dans les dendrites de leurs neurones périphériques et centraux, des gouttelettes lipidiques de lipofuscine. Ce stockage, typique des surcharges lysosomales observées dans les lipofuscinoses céréoïdes, augmente lentement avec le temps et n'est pas associé à une mort neuronale accrue. Dans ce contexte, les souris invalidées pour *Clcn6* présentent une réduction de la sensibilité à la douleur attribuée à une atteinte de la fonction endo-lysosomale du ganglion spinal. Pour autant, l'invalidation de *Clcn6* ne semble pas affecter le pH lysosomal (Poet *et al.*, 2006; Pressey *et al.*, 2010). Bien que *CLCN6* soit considéré par Thomas Jentsch comme un gène candidat des lipofuscinoses céréoïdes idiopathiques, seulement 2 porteurs hétérozygotes de mutations ponctuelles de ce gène ont été trouvés dans une cohorte de 75 patients, soulignant la rareté et le caractère dominant négatif de telles mutations (Poet *et al.*, 2006; Jentsch, 2015; Poroca *et al.*, 2017). Il est notable que le terme de mutation employé est discutable, les 2 variants n'ayant pas été analysés *in vitro*. Récemment, sans que des mécanismes physiopathologiques n'aient été proposés, des variants potentiellement inactivateurs de *CLCN6* ont été liés génétiquement à l'hypotension et à l'épilepsie (Yamamoto *et al.*, 2015; Yu *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017).

Lors du clonage de *CLCN7*, son ARNm a été observé dans de nombreux tissus, chez la souris et l'Homme (Brandt & Jentsch, 1995). L'utilisation de souris invalidées pour *Clcn7* a montré que ClC-7 est exprimé dans les ostéoclastes ainsi que dans les neurones ou astrocytes du système nerveux central, dont ceux de l'hippocampe, du cortex et du cervelet. ClC-7 est aussi exprimé dans les hépatocytes et les cellules du TP où il est exclusivement exprimé dans les lysosomes et au niveau des lacunes de résorption osseuses (Kasper *et al.*, 2005; Lange *et al.*, 2006; Poet *et al.*, 2006; Wartosch *et al.*, 2009). Les souris invalidées pour *Clcn7* meurent à 6 semaines, ont une ostéopétrose sévère (densité osseuse multipliée par 7), une dégénérescence rétinienne (cécité à 4 semaines de vie), une neurodégénération et un pelage gris. Le décès prématuré des souris invalidées est attribué à une disparition progressive des neurones de l'hippocampe (Kornak *et al.*, 2001; Kasper *et al.*, 2005; Lange *et al.*, 2006; Jentsch, 2015). Ce phénotype est le même que celui de la lignée de souris "*Lethal grey*": son étude a abouti à la découverte de la sous-unité β Ostm1 de ClC-7 (voir Section Introduction C.II.3.d), absente dans la souche *Lethal grey* (Lange *et al.*, 2006; Pressey *et al.*, 2010).

Le groupe de Thomas Jentsch a étudié et comparé les phénotypes de lignées de souris invalidées pour *Clcn7* dans tout l'organisme, uniquement dans le cerveau ou uniquement dans les reins, n'exprimant pas ClC-7, exprimant un ClC-7 adressé mais non fonctionnel ou exprimant un ClC-7 muté en canal chlorure *via* son G_{Glu} (voir Section Introduction C.II.3.b). L'ensemble a permis d'apporter de nombreuses informations concernant le rôle de ClC-7. Premièrement, les lysosomes n'exprimant pas d'échangeur ClC-7 fonctionnel s'acidifient normalement mais accumulent moins d'ions Cl⁻, défaut partiellement compensé par un ClC-7 muté en canal chlorure. Deuxièmement, l'absence d'un ClC-7 fonctionnel aboutit à une dégradation lente des protéines dans les lysosomes (notamment du TP), qui s'hypertrophient. Troisièmement, l'absence de ClC-7 n'affecte pas l'endocytose proximale, mais l'hypertrophie des lysosomes n'est pas le fait d'une accumulation de protéines endocytées. Quatrièmement, le stockage lysosomal des neurones, à l'origine de la dégénérescence neuronale, est accentué lorsque ClC-7 est un canal chlorure. Cinquièmement, l'ostéopétrose est causée par un défaut de formation et d'acidification des lacunes de résorption qui s'explique par un défaut d'exocytose des lysosomes, phénomène moins sévère lorsque ClC-7 conserve sa conductance aux ions Cl⁻. Sixièmement, la dégénérescence rétinienne est causée indépendamment par une compression du nerf optique par le crâne et l'apoptose des photorécepteurs; Septièmement, la couleur normale du pelage est rétablie par l'expression d'un ClC-7 correctement adressé dans les mélanocytes (Kornak *et al.*, 2001; Kasper *et al.*, 2005; Lange *et al.*, 2006; Wartosch *et al.*, 2009; Weinert *et al.*, 2010; Weinert *et al.*, 2014).

Quoi qu'il en soit, depuis l'étude des premières souris invalidées pour *Clcn7*, environ 50 mutations récessives ou dominantes, inactivatrices ou activatrices, ont été découvertes chez des patients atteints d'ostéopétrose maligne infantile au sein du gène *CLCN7*. D'autres patients portent des mutations dans le gène encodant *Ostm1*. Dans tous les cas, la pathologie reprends les aspects principaux du phénotype des souris invalidées pour ClC-7 ou *Lethal grey* (Kornak *et al.*, 2001; Leisle *et al.*, 2011; Jentsch, 2015). Les formes dominantes sont moins sévères, ne sont pas accompagnées de dégénérescence neuronale (Jentsch, 2015; Poroca *et al.*, 2017) et les forment activatrices affectent la vitesse d'activation de ClC-7 par la dépolarisation, normalement lente (Leisle *et al.*, 2011). Le rôle de ClC-7 est donc éminemment complexe: il permet l'accumulation de chlorure dans les lysosomes par "*shunt électrique*" de l'activité de la pompe H⁺-ATPase lysosomale. Cette fonction, nécessaire au déplacement et à l'activité des lysosomes, n'est pas efficacement portée par un ClC-7 transformé en canal chlorure. Parfois, ClC-7 est une protéine d'ancrage pour d'autres protéines (Weinert *et al.*, 2014; Jentsch, 2015).

b. Récapitulatif des rôle physiologiques et physiopathologiques des CIC

	Compartiment profil d'expression	Fonctions contrôlées	Phénotype du modèle murin invalidé	Pathologies humaines (type de mutation)
CIC-1 (<i>CLCN1</i>)	Membranaire	Excitabilité musculaire; excitabilité neuronale ?	Myotonie congénitale	Myotonies congénitales type Thompsen ou Becker (Inactivatrice, dominante ou récessive). Épilepsie ?
	Muscle squelettique (Cerveau ?)			
CIC-2 (<i>CLCN2</i>) +/- GlialCAM	Membranaire	Excitabilité neuronale, Transports de l'épithélium pigmentaire rétinien, testiculaire et intestinal	Leucodystrophie, infertilité masculine, cécité	Leucodystrophie +/- azoospermie (Inactivatrice, Récessive)
	Épithéliums variés, cerveau, cœur			
CIC-Ka (<i>CLCNKA</i>) + Barttine	Membranaire	Formation du gradient cortico-papillaire, formation du potentiel endocochléaire	Diabète insipide néphrogénique	Facteur de risque ou de résistance à l'hypertension (polymorphismes activateurs ou inactivateurs)
	Rein, oreille interne			
CIC-Kb (<i>CLCNKB</i>) + Barttine	Membranaire	Transports de la BAL, formation du potentiel endocochléaire	Syndrome de Bartter Type III	Syndrome de Bartter Type III (Inactivatrice Récessive) Résistance à l'hypertension (polymorphisme inactivateur)
	Rein, oreille interne			
CIC-3 (<i>CLCN3</i>)	Endosomes de recyclage, tardifs et lysosomes	Acidification et accumulation de chlore dans les endosomes	Retard de croissance, dégénérescence rétinienne et de l'hippocampe de type lipofuscinose céréoïde	Impliqué dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin ?
	Cerveau, rétine, foie, intestin, etc.			
CIC-4 (<i>CLCN4</i>)	Endosomes	Acidification des endosomes, formation des neurites	Aucun phénotype net	Retard intellectuel +/- épilepsie (Inactivatrice, liée à l'X)
	Muscle squelettique, cœur, cerveau, etc.			
CIC-5 (<i>CLCN5</i>)	Endosomes précoces et de recyclage	Acidification/accumulation de chlore dans les endosomes précoces, endocytose du TP	Maladie de Dent	Maladie de Dent (Inactivatrice, liée à l'X)
	Rein, intestin, etc.			
CIC-6 (<i>CLCN6</i>)	Endosomes tardifs	Acidification des endosomes ?	Sensibilité réduite à la douleur, surcharge lysosomale des neurones, de type lipofuscinose céréoïde	Lipofuscinose céréoïde ? (Inactivatrice et dominante ?)
	Cerveau, moelle épinière			
CIC-7 (<i>CLCN7</i>) + Ostm1	Lysosomes	Trafic des lysosomes, accumulation lysosomale de chlore, formation et acidification des lacunes de résorption ostéoclastiques	Ostéopétrose, cécité, neurodégénérescence, dépigmentation	Ostéopétrose infantile maligne (Inactivatrice/activatrice, récessive/dominante)
	Os, cerveau, foie, rein			

Tableau 2: Résumé des rôles physiologiques et physiopathologiques attribués aux CIC via l'étude de leurs profils d'expression, du phénotype de modèle animaux génétiquement invalidés et la découverte de pathologies humaines (voir Section Introduction C.II.4.a)

III. Physiopathologie de la Maladie de Dent de type I

1. Profil d'expression physiologique et pathologique de ClC-5

a. Profil d'expression tissulaire de l'échangeur ClC-5

Le profil d'expression tissulaire de ClC-5 a été établi chez l'homme, le rat et la souris. Chez l'homme l'ARNm de ClC-5 n'a initialement été rapporté que dans le tissu rénal, avant d'être observé dans des cultures de cellules musculaires lisses ou endothéliales de l'aorte et des coronaires (Fisher *et al.*, 1994; Lamb *et al.*, 1999). Par la suite, la présence de l'ARNm de ClC-5 a été montrée dans le rein, les glandes surrénales, le placenta, les cellules gliales et les leucocytes (Ludwig *et al.*, 2003). D'après les études transcriptomiques du "*Human Protein Atlas*", son ARNm pourrait avoir une expression plus étendue: fortement présent dans le rein, il serait aussi dans le tube digestif, le pancréas, le muscle lisse, la peau, le foie, le placenta, la vésicule biliaire, les poumons, les ovaires et les testicules (Fagerberg *et al.*, 2014). Cependant au niveau protéique, ClC-5 n'a été observé que dans le rein, le placenta et plus faiblement dans le pancréas (Devuyst *et al.*, 1999). Chez la souris, l'ARNm de ClC-5 a pu être amplifié chez le fœtus et depuis certaines lignées dérivées d'odontoblastes (Steinmeyer *et al.*, 1995; Duan *et al.*, 2009). Au niveau protéique, ClC-5 est surtout exprimé dans le tissu rénal, mais est également présent dans le foie, l'intestin, la thyroïde, l'estomac et les testicules de souris (Piwon *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000; Maritzen *et al.*, 2006a; van den Hove *et al.*, 2006; Takahashi *et al.*, 2014). Chez le rat, l'ARNm de ClC-5 a été observé dans le rein où il est très exprimé, dans les segments de l'intestin, le cerveau, les poumons, le foie et plus inconstamment dans le cœur et les testicules (Steinmeyer *et al.*, 1995; Sakamoto *et al.*, 1996; Vandewalle *et al.*, 2001; Edmonds *et al.*, 2002). Au niveau protéique, ClC-5 y est exprimé dans le rein ainsi que dans les segments de l'intestin, les poumons, la trachée, le cerveau, le foie et les testicules. L'échangeur serait aussi présent dans les os, la peau et le cartilage mandibulaire au cours de l'odontogenèse (Gunther *et al.*, 1998; Vandewalle *et al.*, 2001; Edmonds *et al.*, 2002; Duan *et al.*, 2004). Au niveau rénal, ClC-5 est exprimé chez les 3 espèces dans l'appareil vacuolaire ainsi qu'à la membrane apicale des cellules du TP, de la BAL et des CI- α . Il y co-localise avec la H⁺-ATPase, les marqueurs des endosomes précoces et les protéines endocytées (voir Section Introduction A.II). Chez le rat, néanmoins, l'expression de ClC-5 dans le TCP est faible (Steinmeyer *et al.*, 1995; Gunther *et al.*, 1998; Luyckx *et al.*, 1998; Obermuller *et al.*, 1998; Devuyst *et al.*, 1999; Sakamoto *et al.*, 1999; Piwon *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000; Christensen *et al.*, 2003; Pham *et al.*, 2004).

b. Classification des mutants de ClC-5 par leur adressage et leur activité *in vitro*

La découverte de délétions du gène *CLCN5* chez des patients Dent a démontré que l'absence de ClC-5 était à l'origine de la pathologie (Lloyd *et al.*, 1996). De plus, jusqu'à présent tous les mutants de ClC-5 étudiés présentent un défaut de fonctionnalité (Mansour-Hendili *et al.*, 2015). En mettant de côté les mutants artificiels dont l'étude a permis de comprendre le fonctionnement de ClC-5 (Scheel *et al.*, 2005; Zdebik *et al.*, 2008), à ce jour environ 43 mutants ponctuels pathogènes de ClC-5 ont été analysées *in vitro*, généralement exprimés dans les ovocytes de *Xenopus laevis* et la lignée cellulaire HEK293T (Mansour-Hendili *et al.*, 2015; Satoh *et al.*, 2016; Tang *et al.*, 2016). Certains d'entre eux ont été suffisamment caractérisés pour être inclus dans l'une des 3 classes de mutation de *CLCN5*, qui ont été définies en fonction du défaut moléculaire à l'origine de la perte de fonctionnalité du ClC-5 muté (Lourdel *et al.*, 2012; Mansour-Hendili *et al.*, 2015). Ainsi, les mutants de classe 1 présentent un défaut de maturation N-glycosidique et sont retenus dans le RE au lieu d'être exprimés à la membrane plasmique et aux endosomes précoces. Les mutants de classe 2 sont glycosylés et adressés mais leur forme mature, instable, est rapidement dégradée par le protéasome. Enfin, les mutants de classe 3 présentent uniquement une altération de leur activité de transport ionique [Voir Figure 26] (Carr *et al.*, 2003; Mo *et al.*, 2004; Ludwig *et al.*, 2005; Grand *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2009; Grand *et al.*, 2011; D'Antonio *et al.*, 2013; Tang *et al.*, 2016).

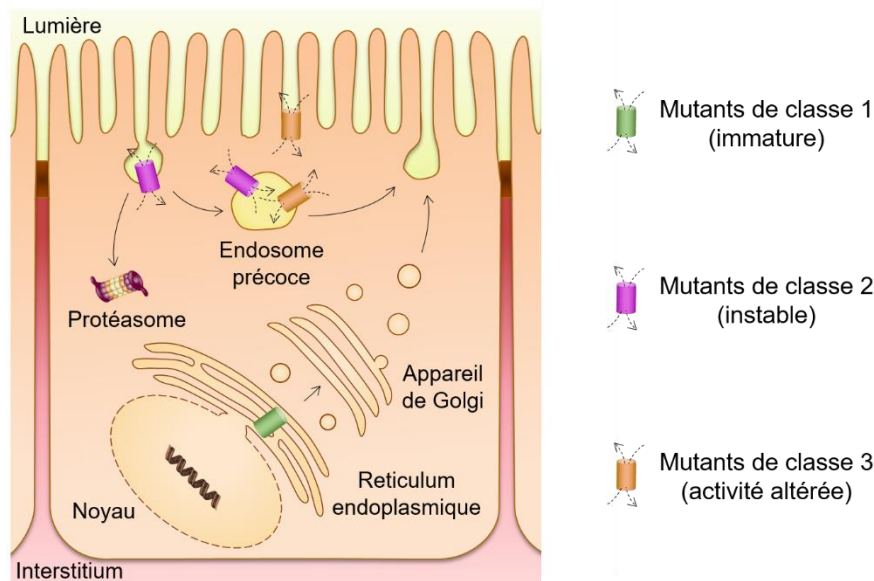


Figure 26: Schéma des mécanismes moléculaires impliqués dans la perte de fonctionnalité des classes de mutants pathogènes de ClC-5 (d'après Lourdel *et al.*, 2012)

Les 240 mutations aujourd'hui décrites de *CLCN5* affectent sont réparties sur toute sa séquence nucléotidique. Lorsque seules quelques mutations faux-sens de *CLCN5* étaient décrites, il fut remarqué qu'elle se trouvaient très majoritairement dans les régions de ClC-5 impliquées dans sa dimérisation (voir Section Introduction C.II.2) (Wu *et al.*, 2003). En conséquence, fut soulevée l'hypothèse que ces mutations puissent affecter la maturation, l'adressage ou la stabilité des homodimères et aboutir aux mutants de classe 1 et 2. Cependant, même s'il est vrai que les mutations faux-sens de ces régions aboutissent généralement à des mutants de classe 1, ce type de mutant est également rencontré très fréquemment dans toutes les régions de ClC-5 (Mansour-Hendili *et al.*, 2015). De plus, ces régions situées à l'interface entre les monomères présentent également la plupart des mutations ponctuelles de classe 3 n'affectant que l'activité de ClC-5 [Voir Figure 27] (Lourdé *et al.*, 2012). En réalité, il semblerait que les régions situées entre les hélices α O-R et E-H (sur les exons 6-7 et 9-10) qui comprennent des zones à l'interface entre les monomères, soient seulement des "hotspots" de mutations ponctuelles (Mansour-Hendili *et al.*, 2015). Il est donc difficile d'anticiper le défaut moléculaire et la localisation intracellulaire d'un mutant de ClC-5 sur la base de sa mutation. De plus, bien que cela soit rapide, anticiper *in silico* les conséquences d'une mutation de ClC-5 sur sa structure, sa fonction et sa maturation à l'aide de modèles tri-dimensionnels reste une pratique incertaine (Sethi *et al.*, 2009; Mansour-Hendili *et al.*, 2015). A ce jour, 32 mutants ont été classés après analyse en systèmes d'expression hétérologues: 62 % sont de classe 1, 16 % de classe 2 et 22 % de classe 3 [Voir Figure 27].

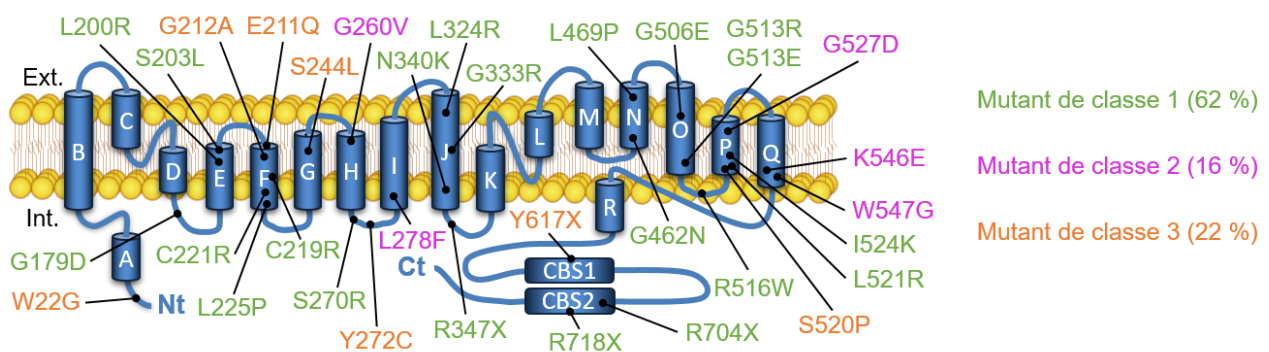


Figure 27: Répartition sur la structure secondaire de ClC-5 et classification des mutations ponctuelles pathogènes de *CLCN5* analysées *in vitro* (d'après Mansour-Hendili *et al.*, 2015)

Caractériser les mutations de *CLCN5* permet d'orienter les stratégies thérapeutiques qu'il faudra établir pour restaurer la fonction de ClC-5 chez les patients Dent, telles que l'utilisation de molécules chaperonnes et/ou activatrices. A ce jour, il n'est toujours pas établi si la classe du mutant exprimé affecte la sévérité ou l'évolution de la MD (Mansour-Hendili *et al.*, 2015).

2. Physiopathologie de la Maladie de Dent de Type I

a. Phénotype des modèles murins invalidés pour *Clcn5*

Après la publication d'une lignée de souris exprimant moins CLC-5 et dont la seule caractéristique fut l'hypercalciurie (Luyckx *et al.*, 1999), les phénotypes de deux lignées de souris entièrement invalidées génétiquement pour *Clcn5* ont été décrits simultanément par les groupes de W. Guggino et de T. Jentsch. Les mâles invalidés des lignées "*Guggino*" et "*Jentsch*" ont une espérance de vie normale. Ils sont fertiles, ils ne présentent ni ostéopénie ni retard de croissance, leurs concentrations plasmatiques en ions (calcium, phosphates), leurs glycémies et leurs protéinémies sont normales. En revanche, ces mâles présentent une atteinte rénale: leur DFG estimé par la clairance de la créatinine est normal mais leur diurèse comme leur phosphaturie sont augmentées (+35 %) et leur pH urinaire est bas (6.1 *versus* 6.6). De plus, ils exhibent une forte PiBPM, présente sous une forme modérée chez les femelles hétérozygotes porteuses d'un seul allèle invalidé (Piwon *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000; Cebotaru *et al.*, 2005).

Par des tests d'endocytose *in vivo* de la β 2-microglobuline, de la peroxydase de Raifort ou de la transferrine (3 ligands des récepteurs Mégaline/Cubiline) et d'un Dextran fluorescent endocyté par la phase fluide (voir Section Introduction A.II.3), les deux groupes ont démontré que la PiBPM de leurs souris était liée à un défaut de l'endocytose dépendante des récepteurs du TP, qui est réduite de plus de 90 % (Piwon *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000; Christensen *et al.*, 2003). Ce défaut, absent du foie, est conservé sur des cultures primaires de cellules issues du TP des souris invalidées (Reed *et al.*, 2010), n'est présent que dans les cellules invalidées des femelles hétérozygotes (dont les TP sont chimériques) et s'accompagne d'une réduction de 50-70 % de l'endocytose en phase fluide (Piwon *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2005). De fait, l'urine des mâles invalidés des deux modèles contient des protéines filtrées, comme l'albumine et la protéine de transport de la Vitamine D appelée DBP. Dans l'urine du modèle *Guggino* se trouve aussi de l'insuline, de la cathepsine B, de la pro-Cathepsine B, de la transferrine et 100 fois plus de la protéine de 16 kDa appelée *CC16*. Dans l'urine du modèle *Jentsch* se trouve plus de PTH (+70 %), la Protéine de transport du rétinol (RBP) et près de 15 fois plus de la forme inactive de la vitamine D (25-OH VitD) (Piwon *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000; Christensen *et al.*, 2003; Nielsen *et al.*, 2007; Souza-Menezes *et al.*, 2007). Enfin, chez les souris de la lignée *Guggino* la protéinurie est accompagnée d'une glycosurie élevée (+75 %) ainsi que d'une aminoacidurie généralisée mais plus prononcée pour les acides aminés neutres (Wang *et al.*, 2000).

Bien que et que les deux modèles aient été réalisés à partir de la lignée C57Bl6/j avec des stratégies d'inactivation équivalentes (Devuyst & Luciani, 2015), ils diffèrent dans leur phénotype sur un point important du phénotype de la MD. En effet, les souris invalidées du modèle *Guggino* sont hypercalciuriques (+135 %) alors que les souris du modèle *Jentsch* ne le sont pas (Piwon *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000). Dans le même temps, la concentration plasmatique de la PTH est normale chez les mâles invalidés *Guggino* et tend à l'augmentation chez ceux du modèle *Jentsch* (Piwon *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2003). Inversement, la concentration plasmatique de la vitamine D active (1,25-OH vitD) est réduite par 2 dans le modèle *Jentsch* alors qu'elle est multipliée par 2 dans le modèle *Guggino*. Les souris invalidées *Jentsch* voient de plus leur concentration plasmatique de 25-OH vitD être réduite d'un facteur 4, amenant le ratio Vitamine D active/Vitamine D inactive être multiplié par 3 en comparaison de leur congénères sauvages (Piwon *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2003; Maritzen *et al.*, 2006b). Les souris invalidées du modèle *Guggino* voient leur DFG diminuer progressivement, jusqu'à l'insuffisance rénale vers 9 mois. Par l'ajout de citrate dans leur régime alimentaire, ces souris n'atteignent l'insuffisance rénale qu'entre leur 12^{ème} et leur 17^{ème} mois (Cebotaru *et al.*, 2005).

Le degré d'implication d'autres organes dans le phénotype rénal du modèle *Guggino* a été explorée. Il s'avère que malgré l'augmentation de leur concentration plasmatique en 1,25-OH vitD, les souris invalidées pour *Clcn5* ont une absorption intestinale de calcium normale. En revanche, ces souris présentent une élévation de plusieurs marqueurs plasmatique de la résorption osseuse (Silva *et al.*, 2003). De plus, durant un test de tolérance au glucose le pic glycémique des souris invalidées est plus élevé et le pic insulinique plus faible, alors qu'elles ne présentent ni diabète ni résistance périphérique à l'insuline (Souza-Menezes *et al.*, 2007). Suite à la découverte d'un goitre thyroïdien dans le modèle *Guggino*, absent du modèle *Jentsch*, les concentrations plasmatiques des hormones thyroïdiennes T₄ et TSH ont été dosées dans les deux modèles: elles se sont avérées normales (Maritzen *et al.*, 2006a; van den Hove *et al.*, 2006). Enfin, 7 % des souris invalidées pour *Clcn5* du modèle *Guggino* montrent une denture imparfaite et possèdent une colonne vertébrale bossue (Wang *et al.*, 2000; Duan *et al.*, 2009).

En somme, l'invalidation génétique de *Clcn5* chez la souris mime l'aspect principal de la MD qu'est la PiBPM: elle conduit comme chez les patients à une fuite urinaire d'albumine, de DBP et de RBP. Comme chez les patients elle génère chez les deux modèles murins une variabilité phénotypique, concernant notamment la calciurie et la concentration en 1,25-OH vitD plasmatique (Scheinman, 1998; Becker-Cohen *et al.*, 2012).

b. Modifications structurelles et moléculaires en l'absence de ClC-5

Des descriptions histologiques rénales ont été réalisées chez les modèles murins et des patients Dent porteurs de délétions de *CLCN5*: chez eux, l'anatomie rénale, du glomérule et des segments du néphron est conservée. Par microscopie électronique, l'ultrastructure de la cellule proximale n'est pas affectée: la bordure en brosse, les jonctions serrées et l'appareil vacuolaire des cellules du TP sont normaux. Toutefois avec le temps, des lésions rénales apparaissent chez les patients Dent et le modèle murin *Guggino* uniquement: une atrophie et/ou une dilatation des TP, une fibrose interstitielle avec infiltrations de cellules inflammatoires et une néphrocalcinose de la jonction cortico-médullaire (Piwon *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000; Moulin *et al.*, 2003; Devuyst & Thakker, 2010; Mansour-Hendili *et al.*, 2015). Chez la souris, ces lésions sont moins fréquentes lors d'un régime riche en citrate (Cebotaru *et al.*, 2005).

Dans le même temps, l'absence de ClC-5 réduit l'expression de la Mégaline rénale chez les modèles murins invalidés. Son adressage n'est pourtant altéré ni chez ces souris ni chez les patients Dent (Piwon *et al.*, 2000; Christensen *et al.*, 2003; Moulin *et al.*, 2003). Dans le modèle *Guggino*, la Cubiline est également moins présente à la membrane apicale et dans l'appareil vacuolaire proximal, alors que les marqueurs endosomaux Rab4 et Rab5 sont normalement exprimés (Christensen *et al.*, 2003). La pompe à proton V-ATPase (voir Section Introduction A.II.2.a) pourrait aussi être affectée par l'absence de ClC-5 chez les patients Dent: chez eux, alors que d'autres protéines apicales (Aminopeptidase N) ou basolatérales (Na^+/K^+ -ATPase) sont correctement exprimées, la V-ATPase disparaît des $\text{Cl}\alpha$ et est basolatérale dans les cellules du TP (Moulin *et al.*, 2003). Cette particularité n'est toutefois pas retrouvée chez les modèles murins de la MD (Piwon *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000). En parallèle de ces modifications, le transporteur Napi-IIa est moins membranaire (plus endosomal) et moins exprimé dans les segments S2/S3 du TP des souris invalidées. Correctement adressé à la membrane apicale du TP lors de faibles apports alimentaires en phosphates, il est très lentement internalisé en réponse à la liaison de la PTH sur ses récepteurs proximaux. Ce dernier phénomène concerne aussi le transporteur NHE3 et est étonnamment présent dans les cellules exprimant ClC-5 au sein des TP chimériques des femelles hétérozygotes (Piwon *et al.*, 2000). Enfin, l'invalidation de *Clcn5* réduit l'expression et l'activité des enzymes lysosomales Cathepsine B (-50 %) et β -Hexoaminidase (-65 %) dans le modèle *Guggino* (Christensen *et al.*, 2003), tandis que la 24-OH vitD Hydroxylase et la 1α -25-OH vitD Hydroxylase sont respectivement 10 fois moins et 4 fois plus exprimées au niveau transcriptionnel dans le TP (Maritzen *et al.*, 2006b).

Au niveau rénal, l'absence de ClC-5 conduit aussi à la réduction transcriptionnelle et protéique du transporteur GLUT2, sans affecter SGLT-1, SGLT-2 ou GLUT-1 (Souza-Menezes *et al.*, 2007). Enfin, comme l'absence de ClC-4 dans les fibroblastes ou de ClC-3 dans les hépatocytes (voir Section Introduction C.II.4.a), l'invalidation de *Clcn5* conduit chez la souris à une diminution de la capacité des endosomes du TP à s'acidifier en présence d'ATP et d'un gradient de protons (Gunther *et al.*, 2003; Hara-Chikuma *et al.*, 2005a; Novarino *et al.*, 2010).

Au niveau extra-rénal, dans le modèle *Guggino* l'absence de ClC-5 réduit l'expression de la Pendrine à la membrane apicale des thyrocytes et cause une hyperplasie de la thyroïde sans affecter l'expression ou l'adressage de la Mégaline (van den Hove *et al.*, 2006), augmente le risque de colite *via* une surexpression intestinale d'interleukines pro-inflammatoires (Alex *et al.*, 2010; Ruhe *et al.*, 2017) et altère le développement de la dentine par l'activation d'une voie impliquant le TGF- β 1 (Duan *et al.*, 2009). Par ailleurs, l'expression transcriptionnelle de marqueurs du remodelage osseux (ostéocalcine et ostéopontine) n'est pas modifiée chez les souris invalidées du modèle *Jentsch* (Maritzen *et al.*, 2006b).

c. Mécanismes physiopathologiques impliqués dans la Maladie de Dent

L'ensemble des modifications décrites précédemment *in vivo* permis de faire émerger une physiopathologie de la MD. Celle-ci explique l'apparition de plusieurs symptômes de la MD, notamment la PiBPM. Cette dernière est provoquée par un défaut d'endocytose médiée par les récepteurs du TP, qui fait intervenir les endosomes précoces et de recyclage dans lesquels ClC-5 est exprimé (voir Section Introduction A.II.3). Une hypothèse parcimonieuse consiste donc à proposer que l'absence de ClC-5 altère les étapes de l'endocytose ayant lieu dans l'endosome précoce, telles que la libération ligand/récepteur, le transport, le bourgeonnement et/ou la fusion vésiculaire. Cette hypothèse est confortée par le défaut d'acidification des endosomes en l'absence de ClC-5. En effet, l'acidification endosomale est un prérequis à ces étapes, car il promeut la séparation ligand/récepteur (Eshbach & Weisz, 2017) et aboutit au recrutement de protéines endosomales s'associant au PIP₂ afin d'engager le trafic vésiculaire (Weisz, 2003; Hurtado-Lorenzo *et al.*, 2006; Santarius *et al.*, 2006). En l'absence de ClC-5, l'alcalinisation endosomale est en mesure de provoquer une diminution de la vitesse du trafic endosomal (Clague *et al.*, 1994) et de la vitesse de recyclage membranaire des récepteurs Mégaline et Cubiline. *A fortiori*, l'endocytose réalisée par le TP serait réduite et conduirait à la PiBPM observée (Gekle *et al.*, 1995; Gunther *et al.*, 1998; Christensen *et al.*, 2003).

Les autres symptômes de la MD seraient secondaires au défaut d'endocytose dû à l'altération de la voie endo-lysosomale. Cette possibilité est confortée par la présence de la PiBPM chez tous les patients Dent malgré l'hétérogénéité clinique de la MD (voir Section Introduction C.I.1). Elle est aussi soutenue par le fait que la MD de type 2, dont la présentation rénale est équivalente au type I (voir Section Introduction C.I.2), soit causée par l'absence d'une phosphatase de PIP₂ appelée OCRL1 qui provoque un défaut de trafic endosomal accompagné d'un recyclage apical insuffisant de la Mégaline (Bokenkamp & Ludwig, 2016).

Ainsi, l'hyperphosphaturie en l'absence de ClC-5 serait expliquée par la réduction de l'endocytose proximale. La réabsorption du phosphate au niveau du TP nécessite l'expression membranaire du transporteur Napi-IIa (voir Section Introduction A.II.2.a), qui est internalisé dans les segments S2 et S3 du TP chez le modèle *Jentsch*. Cette internalisation, étant également observée dans les cellules du TPD exprimant ClC-5 chez les souris femelles chimériques, suggère l'implication d'un facteur commun à toutes les cellules du TPD. Or, la PTH est une hormone peptique phosphaturiante normalement endocytée par la Mégaline, qui provoque dans le TP l'internalisation de Napi-IIa et sa dégradation dans le lysosome (Piwon *et al.*, 2000; Bacic *et al.*, 2006). Une faible endocytose proximale de la PTH (attestée par sa présence dans l'urine), en parallèle d'une réabsorption peu altérée de l'eau et du NaCl, provoquerait une forte augmentation de la concentration luminale de la PTH dans les segments S2 et S3 du TP (même si sa concentration plasmatique est réduite). Cette augmentation luminale provoquerait une stimulation excessive de ses récepteurs sur les membranes apicales des cellules du TPD, qui y serait à l'origine d'une internalisation et d'une dégradation accrue de Napi-IIa [Voir Figure 28]. Cette internalisation par la PTH, valable pour NHE3, est effectuée lentement car elle emprunte la voie endo-lysosomale qui est défectueuse. L'expression rénale de ClC-5 étant stimulée par la PTH, un couplage des deux dans le processus physiologique d'internalisation par endocytose de Napi-IIa et NHE3 est envisageable (Silva *et al.*, 2000).

D'autres symptômes de la MD seraient expliqués par le défaut d'endocytose du TP. Ainsi, l'excrétion urinaire de la RBP diminuerait le taux plasmatique de rétinol et causerait les cécités nocturnes. Ce serait pourquoi celles-ci disparaissent suite à un apport alimentaire élevé en rétinol (Sethi *et al.*, 2009; Becker-Cohen *et al.*, 2012). Un recyclage lent des transporteurs d'acides aminés causerait l'aminocidurie et enfin la polyurie serait secondaire à la PiBPM, la réduction de l'expression membranaire de NHE3 et la glycosurie (Piwon *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000; Souza-Menezes *et al.*, 2007).

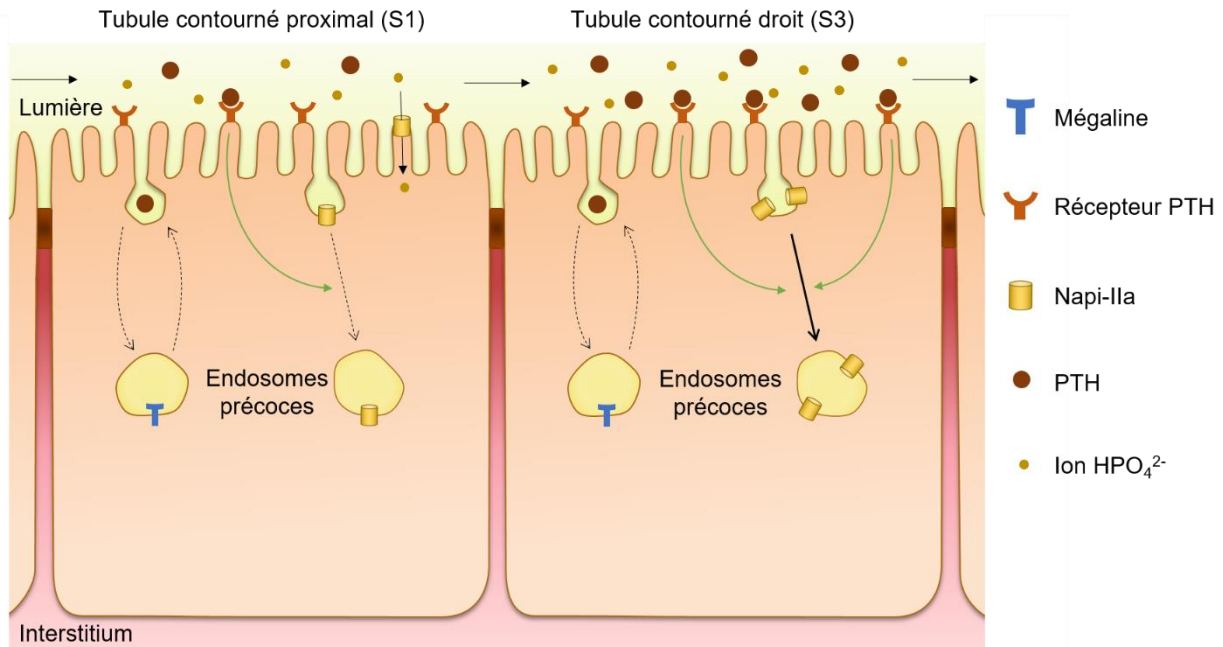


Figure 28: Mécanisme physiopathologique expliquant l'hyperphosphaturie présent dans la Maladie de Dent par le défaut d'endocytose proximale de la PTH (d'après Plans *et al.*, 2009)

L'hypercalciurie est considérée comme un facteur de risque (avec la phosphaturie) pour le rachitisme, l'ostéopénie et la néphrolithiase, observés chez les patients Dent. Elle est aussi considérée comme un facteur de risque pour la néphrocalcinose (qui n'est observée que chez le modèle *Guggino* hypercalciurique) sans toutefois qu'il n'y ait de relation de proportionnalité entre le degré d'hypercalciurie et l'apparition ou l'évolution de la néphrocalcinose. Il n'y a pas non plus de proportionnalité entre calciurie et insuffisance rénale, ce qui pourrait être expliqué par la disparition de l'hypercalciurie lors de la réduction du DFG (Blanchard *et al.*, 2016).

Très tôt, il fut proposé que la fuite urinaire de calcium dans la MD, exagérée en réponse à une diète riche en calcium, ne soit pas le fait d'une diminution directe de la réabsorption tubulaire de calcium (Reinhart *et al.*, 1995; Scheinman, 1998; Blanchard *et al.*, 2016). De manière intéressante, le mécanisme physiopathologique actuellement admis pour expliquer l'hypercalciurie variable chez les patients Dent confirme cette idée et fait plutôt intervenir le métabolisme proximal de la Vitamine D (Maritzen *et al.*, 2006b; Plans *et al.*, 2009). En effet, les travaux du groupe de T. Jentsch sur son modèle invalidé pour *Clcn5* permettent non-seulement d'expliquer l'hypercalciurie ayant généralement lieu durant la MD, mais aussi son absence dans leur modèle murin et chez certains patients (Blanchard *et al.*, 2016). Leur modèle explicatif intègre à la fois l'augmentation de la concentration lumineuse de PTH le long du tubule décrite précédemment, mais aussi une augmentation variable mais d'origine similaire de la concentration lumineuse de la Vitamine D et de son précurseur inactif [Voir Figure 29].

Ce modèle repose sur l'activation rénale du précurseur inactif de la Vitamine D (25-OH vitD) en sa forme active (1,25-OH vitD) *via* l'activité dans la cellule proximale de l'enzyme mitochondriale 1α -25-OH vitD Hydroxylase. Cette maturation est contrebalancée par une autre enzyme proximale, la 24-OH vitD Hydroxylase, qui transforme la 1,25-OH vitD et son précurseur en un métabolite inactif. La PTH intervient dans ce processus car, en activant ses récepteurs, elle stimule la transcription de la 1α -25-OH vitD Hydroxylase et réduit la stabilité de l'ARNm de la 24-OH vitD Hydroxylase (Maritzen *et al.*, 2006b; Plans *et al.*, 2009; Bikle, 2014). Une endocytose proximale défectueuse doit alors provoquer, du fait d'une forte concentration luminale en PTH en fin de TP, à un excès de formation de 1,25-OH vitD [Voir Figure 29]. L'élévation de la 1,25-OH vitD plasmatique provoquerait chez les patients Dent et le modèle *Guggino* une réduction modérée de la concentration plasmatique de PTH et augmenterait la calcémie qui serait normalisée par l'hypercalciurie (Plans *et al.*, 2009).

Cependant, ce déséquilibre dans l'expression des hydroxylases rénales, en faveur de la maturation du précurseur 25-OH vitD, n'est pas suffisant pour augmenter la concentration plasmatique de la 1,25-OH vitD et provoquer une hypercalciurie dans le modèle *Jentsch* où il a été observé. L'explication avancée par T. Jentsch s'appliquerait à son modèle animal comme aux patients dont la vitamine D active plasmatique est faible et la calciurie normale (Blanchard *et al.*, 2016). Elle tient au fait que le précurseur de la Vitamine D lui-même entre dans la cellule proximale avec sa protéine de transport DBP, par endocytose médiée par la Mégaline (Nykjaer *et al.*, 1999). La diminution de leur endocytose (attestée par la présence du précurseur et de la DBP dans l'urine en l'absence de ClC-5) si elle est trop importante, aboutirait à une diminution de l'entrée apicale du substrat de la 1α -25-OH vitD Hydroxylase surexprimée. Il en résultera une diminution nette de la formation de la 1,25-OH vitD. Par ailleurs, la 1,25-OH vitD entre elle-même dans la cellule proximale par endocytose, où elle a des effets opposés à ceux de la PTH sur les Hydrolases rénales [Voir Figure 29] (Maritzen *et al.*, 2006b; Plans *et al.*, 2009; Bikle, 2014). En conséquence, si l'endocytose de cette forme active est également trop faible, cela stimulera la formation de 1,25-OH vitD. Cependant, l'augmentation de la concentration luminale de la 1,25-OH vitD dans le néphron distal peut augmenter la réabsorption du calcium dans le TCD en surexprimant au niveau transcriptionnel le canal TRPV5 et des calbindines. Ce dernier phénomène, effectivement observé dans le modèle *Jentsch*, contribuerait à l'absence de calciurie (Maritzen *et al.*, 2006b; Plans *et al.*, 2009). De manière intéressante, les souris n'exprimant pas la Mégaline ont une PiBPM (contenant la DBP), une concentration plasmatique en 1,25-OH vitD très faible, une ostéopénie, mais pas d'hypercalciurie (Nykjaer *et al.*, 1999).

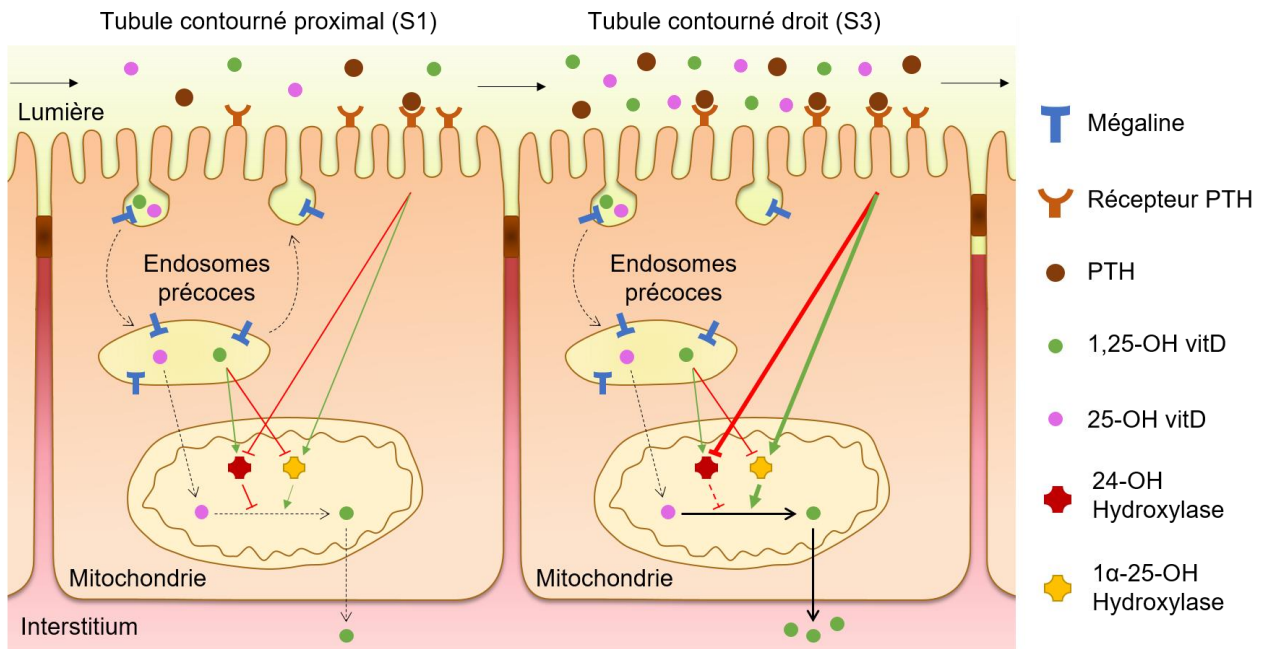


Figure 29: Mécanisme expliquant la concentration sérique en Vitamine D et l'hypercalciurie dans la Maladie de Dent par le défaut d'endocytose proximale (d'après Plans *et al.*, 2009)

En somme, les fuites urinaires de la Vitamine D, de son précurseur et de la PTH, causées par le défaut d'endocytose proximal, ont des effets opposés sur la maturation proximale de la Vitamine D. La balance pencherait en faveur ou en défaveur d'une création nette de 1,25-OH vitD selon le régime alimentaire en calcium, en 1,25-OH vitD (modèle *Jentsch*: 1 UI/g ; modèle *Guggino*: 4,5-3,3 UI/g), selon la phosphaturie, la fonctionnalité de la Cubiline (qui participe à l'endocytose de la DBP) ou encore le ratio luminal 1,25-OH vitD/25-OH vitD (Beck *et al.*, 1998; Maritzen *et al.*, 2006b; Plans *et al.*, 2009; Bikle, 2014; Eshbach & Weisz, 2017). Chez les patients Dent, la mutation de *CLCN5* ou le fond génétique pourrait intervenir. L'ensemble déterminerait la concentration plasmatique de 1,25-OH vitD, donc la calcémie et *in fine* le degré de calciurie (Plans *et al.*, 2009; Jentsch, 2015).

Toutefois, il subsiste des interrogations concernant l'origine de l'hypercalciurie dans la MD. En effet, dans le modèle *Guggino*, malgré l'élévation de la concentration plasmatique de la 1,25-OH vitD, l'hypercalciurie ne serait pas causée par une absorption excessive de calcium par l'intestin, mais par une résorption osseuse (Silva *et al.*, 2003). Le mécanisme indéterminé qui conduit à cela pourrait être à l'origine de l'ostéomalacie de certains patients, mais ne semble pas directement liée à l'absence de *CLC-5* puisque le remodelage osseux est inchangé dans le modèle *Jentsch* (Maritzen *et al.*, 2006b). Par ailleurs, l'absence de *CLC-5* dans la BAL, la concentration luminaire de PTH dans la BAL et le TCD (Jeon, 2008) ou les PBPM dans le CC (Carr *et al.*, 2006) pourraient moduler le bilan rénal du calcium dans la MD.

3. Fonctions intracellulaires attribuées à ClC-5 dans le tubule proximal

a. Rôles des transports de ClC-5 dans l'acidification des endosomes précoces

Lors du clonage de *CLCN5* et des premières descriptions des souris invalidées pour *Clcn5*, l'échangeur $2\text{ Cl}^-/\text{H}^+$ ClC-5 était considéré comme un canal chlorure (voir Section Introduction C.II.3b). Initialement, le rôle prêté à ClC-5 dans les endosomes précoces du TP où il est majoritairement exprimé fut donc construit sur cette conviction (Zifarelli, 2015).

ClC-5 étant uniquement exprimé aux mêmes endroits que la H^+ -ATPase vacuolaire (V-ATPase), il fut proposé que les deux protéines aient des activités électriques interdépendantes, avant même la description du phénotype des modèles invalidés murins. Selon l'hypothèse formulée, ClC-5 interviendrait dans l'acidification des endosomes en créant un "*shunt électrique*" neutralisant la différence de potentiel positive créée dans l'endosome par le flux entrant d'ions H^+ , lui-même causé par l'activité de la V-ATPase (Gunther *et al.*, 1998; Jentsch *et al.*, 1999; Sakamoto *et al.*, 1999; Waldegger & Jentsch, 2000). Pour cela, ClC-5 ferait entrer des ions Cl^- dans l'endosome précoce. Un tel transfert de charges négatives a, comme une sortie de cations, la capacité de dissiper le potentiel positif à l'intérieur de l'endosome et de faciliter en retour l'entrée d'ions H^+ par la V-ATPase (Faundez & Hartzell, 2004). Un canal chlorure est un candidat de choix pour un tel rôle. En effet, malgré la forte concentration extracellulaire des ions Cl^- , leur concentration dans les endosomes au moment de leur fermeture serait très basse et générerait un gradient favorable à leur entrée depuis le cytosol (Sonawane *et al.*, 2002).

Cette hypothèse du "*shunt électrique*" fut renforcée par plusieurs découvertes. D'abord, en parallèle de l'acidification endo-lysosomale, du chlorure s'accumule dans la vésicule et cette accumulation est utile à l'acidification (Sonawane *et al.*, 2002; Faundez & Hartzell, 2004). Le potentiel endosomal, quoi qu'incertain, serait négatif et activerait les courants entrants de ClC-5 (Sonawane *et al.*, 2002). Ensuite, les endosomes proximaux fraîchement extraits ou issus de cultures primaires, lorsqu'ils proviennent de souris invalidées pour ClC-5, s'acidifient moins et accumulent moins d'ions Cl^- (Gunther *et al.*, 2003; Hara-Chikuma *et al.*, 2005a; Novarino *et al.*, 2010). Inversement, la surexpression de ClC-5 dans des lignées cellulaires permet d'acidifier le contenu endosomal (Smith *et al.*, 2009; Alekov, 2015). L'ensemble a consolidé l'idée que le défaut d'acidification endosomale était le point de départ de la MD (voir Section Introduction C.III.2.c). Cependant, une fois le gradient d'ions Cl^- dissipé, un tel canal ClC-5 ne devrait pas permettre l'accumulation de chlore dans l'endosome.

Or il est désormais démontré que ClC-5 est un échangeur $2\text{Cl}^-/1\text{H}^+$ (Picollo & Pusch, 2005; Scheel *et al.*, 2005). Cette découverte inattendue a fait naître une seconde hypothèse concernant le fonctionnement de ClC-5 dans l'endosome. Cette nouvelle hypothèse propose que ClC-5 soit impliqué directement dans l'accumulation de protons dans l'endosome (Smith & Lippiat, 2010; Lippiat & Smith, 2012; Pusch & Zifarelli, 2015). Cette théorie de l'"acidification directe" repose sur quelques constatations. Premièrement, la dépendance au voltage de ClC-5 rends quasi-nuls ses courants entrants mais optimise ses courants sortants (voir Section Introduction C.II.3.c). Deuxièmement, l'effet Gibbs-Donnan évoqué pour expliquer la faible concentration en ions Cl^- observées lors de la fermeture des endosomes n'est pas démontré et les mesures de chlore les plus précoces sont faites sur des endosomes déjà légèrement acidifiés à un pH de 7.0 au lieu de 7.4 (Sonawane *et al.*, 2002; Hara-Chikuma *et al.*, 2005a). Considérant une concentration intra-vesiculaire en chlorure théorique de 120 mM et un pH de 7.4 à la formation de l'endosome, un important gradient en ions Cl^- permettrait la sortie de ces derniers par ClC-5 en échange de protons. Le gradient d'ion chlorure disparaîtrait donc très vite de l'endosome néoformé pour laisser place à un endosome acidifié. D'après les auteurs de cette hypothèse de l'*acidification directe*, la présence de canaux tels que le CFTR dans l'endosome précoce participerait à cette sortie d'ions Cl^- de l'endosome et n'est pas compatible avec une accumulation de chlore dans la vésicule (Lippiat & Smith, 2012). Cette hypothèse n'est appuyée expérimentalement que par l'existence dans l'endosome précoce d'une acidification ne dépendant pas de la V-ATPase mais de l'expression de ClC-5 (Smith & Lippiat, 2010).

L'*acidification directe* des endosomes par ClC-5 est vivement critiquée par les tenants de la théorie du *shunt électrique* qui estiment, aidés de simulations mathématiques, qu'un tel sens de fonctionnement de ClC-5 n'est pas en mesure d'accumuler assez d'ions H^+ et Cl^- dans l'endosome précoce (Stauber *et al.*, 2012). D'après ces auteurs, le rôle de ClC-5 serait alors trop transitoire et les ions H^+ dans l'endosomes inhiberaient rapidement ClC-5 (Plans *et al.*, 2009). L'acidification quasi-immédiate des endosomes néo-formés serait assurée par l'activité transitoire de NHE3 plutôt que de ClC-5. NHE3 utiliserait le fort gradient d'ions Na^+ initial de part et d'autre de l'endosome pour acidifier l'endosome. Ce point est appuyé par la réduction de l'endocytose de lignées proximales en l'absence de NHE3 (Gekle *et al.*, 2001). Que ClC-5 soit nécessaire à NHE3 (voir Section Introduction C.III.2.c) explique l'acidification directe de l'endosome observée qui ne dépend que de ClC-5 (Stauber *et al.*, 2012). Enfin, un rôle de *shunt électrique* et d'accumulation d'ions Cl^- dans l'endosome de ClC-5 justifie que son absence impacte plus l'endocytose proximale que l'absence de NHE3 seule (Gunther *et al.*, 2003).

Finalement, l'hypothèse du *shunt* électrique fut renforcée par la découverte du transport de H^+ par ClC-5 (Stauber *et al.*, 2012). À première vue, recycler vers le cytosol une partie des protons transportés par la V-ATPase paraît contre-productif d'un point de vue énergétique. Mais pour 3 charges négatives retirées de la lumière de l'endosome par cycle de transport de ClC-5, seul 1 proton transporté par la V-ATPase quitte la lumière de la vésicule. D'après certains auteurs, les protons extrudés de l'endosome y retourneraient par recyclage cytosolique (Wellhauser *et al.*, 2010). Ce modèle consommerait certes plus d'ATP pour un même transport net d'ions H^+ , mais permet d'expliquer l'accumulation vésiculaire d'ions Cl^- contre leur gradient électrochimique le long de la voie endo-lysosomale. La présence du canal CFTR dans les endosomes précoces est aussi conciliable avec ce modèle. En effet, il servirait à faire passivement entrer du chlore dans l'endosome (qui en contiendrait initialement peu) parallèlement à ClC-5, jusqu'à un équilibre électrochimique vers 10-40 mM. Cela expliquerait la PiBPM causée par l'absence de CFTR dans la mucoviscidose (Devuyst & Luciani, 2015). Au dessus de l'équilibre électrochimique, l'accumulation de chlore serait possible *via* ClC-5. Dans les endosomes tardifs du TP, ClC-3a et ClC-4 pourraient intervenir. Dans les lysosomes, le *shunt* provoqué par ClC-7 est démontré. Cependant, ces 3 ClC sont situés trop en aval de la voie endo-lysosomale pour affecter l'endocytose proximale (voir Section Introduction C.II.4.a).

Au total, le rôle de ClC-5 dans l'acidification des endosomes reste controversé. Cependant il est possible d'imaginer un processus d'endocytose bénéficiant de son *acidification directe* et de son *shunt électrique*. Dans ce modèle, l'acidification débute par un rôle direct de NHE3, de la V-ATPase et de ClC-5 (sans considérer l'effet Gibbs-Donnan). Cela permettrait d'atteindre rapidement le pH seuil de libération ligand/récepteur et de recyclage des récepteurs. Ensuite l'acidification serait lente, effectuée par la V-ATPase seule et en partie *shuntée* par les ClC, mais serait persistante grâce l'accumulation d'ions Cl^- dans la vésicule [Voir Figure 30].

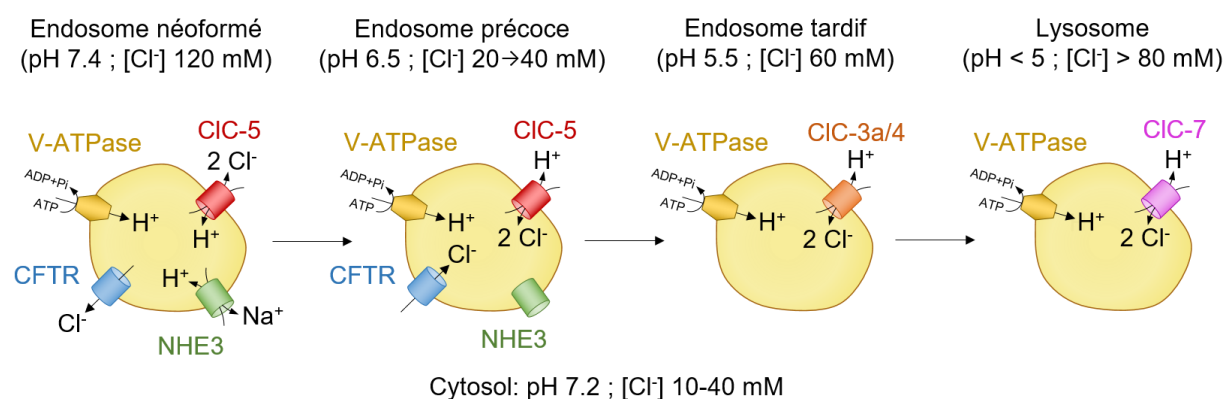


Figure 30: Mécanismes hypothétiques des transports de protons de d'ions chlorure le long de la voie endo-lysosomale proximale (d'après Stauber & Weinert, 2012; Lippiat & Smith, 2012)

b. Rôles des interactions protéine-protéine de ClC-5 dans le tubule proximal

Outre son rôle de transport dans l'endosome précoce, ClC-5 affecterait aussi l'endocytose du TP *via* des interactions protéine-protéine dans les cellules proximales. La plupart de ces interactions n'ont été décrites que *in vitro*, par le groupe de Philip Poronnik *via* l'utilisation de techniques multiples (GST pull-down, double-hybride, co-immunoprécipitation, imagerie confocale). La première décrite implique ClC-5 et une ubiquitine ligase appelée WWP2 (Pirozzi *et al.*, 1997). Les deux protéines interagiraient *via* un motif PY sur l'extrémité C-terminale de ClC-5, ce qui aurait pour effet d'ubiquitinyler l'échangeur et de provoquer son internalisation (Schwake *et al.*, 2001). Plus tard, un processus similaire impliquant le motif PY et l'ubiquitine ligase Nedd4.2, provoquant l'internalisation de ClC-5 par mono-ubiquitylation, a été décrit (Hryciw *et al.*, 2004). Le retrait de ClC-5 de la membrane plasmique provoquant *in vitro* une réduction de l'endocytose de l'albumine, il fut proposé que ce mécanisme de régulation de ClC-5 puisse être un modulateur physiologique de l'endocytose proximale. Sur cette base, une lignée de souris porteuses d'une mutation ponctuelle Y672C altérant le fonctionnement du motif PY de ClC-5 fut générée par le groupe de T. Jentsch. Cependant, *in vivo* l'absence du motif PY n'a affecté l'expression de ClC-5 ni qualitativement ni quantitativement et les souris n'ont présenté aucun phénotype ou défaut d'endocytose des PBPM (Rickheit *et al.*, 2010).

D'autres interactions protéiques impliquant ClC-5 ont été décrites. Ainsi, ClC-5 interagit indirectement avec la Mégaline et NHE3 dans les endosomes précoces par l'intermédiaire de la protéine NHERF2. L'impact du complexe sur l'adressage et l'activité des protéines qui le compose ou la capacité d'endocytose du TP n'est pas connu (Hryciw *et al.*, 2006; Hryciw *et al.*, 2012). L'extrémité C-terminale de ClC-5 (ni ses CBS ni son domaine PY) interagit aussi avec la Cofiline, une protéine modulant la stabilité des filaments d'actine selon son statut de phosphorylation. Ayant lieu dans la région sous-membranaire, cette interaction couplerait la présence de ClC-5 à la formation des vésicules d'endocytose (Hryciw *et al.*, 2003). Selon un raisonnement similaire, ClC-5 permettrait le cheminement sur les microtubules des endosomes de la membrane plasmique vers le pôle basolatéral des cellules, *via* son interaction avec la kinésine KIF3B [Voir Figure 5]. Dans les cellules non-polarisées comme les HEK293T, cela favoriserait le transport de ClC-5 vers la membrane plasmique car les microtubules sont inversés (Reed *et al.*, 2010). Enfin, ClC-5 interagit avec la DNPEP, une aminopeptidase dont le rôle est méconnu. Cette interaction favorise aussi l'endocytose *in vitro* de l'albumine et DNPEP serait capable d'interagir avec certains filaments du cytosquelette (Lee *et al.*, 2015).

OBJECTIF DE LA 2^{NDE} ÉTUDE

Les 9 protéines ClC constituent une famille phylogénétique comprenant à la fois des canaux chlorure et des échangeurs $2\text{Cl}^-/\text{H}^+$ (voir Section Introduction C.II.1). Cette dernière particularité est expliquée par l'existence d'un couplage fin des transports d'ions chlorure et proton au sein du pore des échangeurs ClC, qui fait notamment intervenir un résidu crucial de la protéine appelé le "*gating glutamate*" (voir Section Introduction C.II.3b).

Les ClC sont impliqués dans de nombreuses fonctions physiologiques et sont à l'origine de pathologies dont les présentations cliniques sont variées (voir Section Introduction C.II.4). Ainsi, la perte de fonctionnalité de l'échangeur $2\text{Cl}^-/\text{H}^+$ ClC-5, normalement exprimé à la membrane plasmique et dans les endosomes précoces du tubule proximal (voir Section Introduction C.III.1.a), provoque la Maladie de Dent (voir Section Introduction C.III.2.a).

La Maladie de Dent est une maladie rare liée à l'X se manifestant principalement par une protéinurie de bas poids moléculaire et une hypercalciurie. En l'absence de traitement efficace, elle aboutit entre autres à un retard de croissance, une néphrocalcinose et à l'insuffisance rénale (voir Section Introduction C.I.1). La physiopathologie de la Maladie de Dent reste incomplètement comprise. Les mécanismes proposés afin d'expliquer les principales caractéristiques de la Maladie de Dent considèrent le défaut d'endocytose du tubule proximal comme le point de départ de la pathologie (voir Section Introduction C.III.2.c).

Le défaut d'endocytose du tubule proximal en l'absence de ClC-5 serait secondaire à une alcalinisation de l'endosome (voir Section Introduction C.III.2.c). Cependant, le mécanisme par lequel ClC-5 acidifierait les endosomes, initialement formulé lorsque ClC-5 était considéré comme un canal chlorure, reste controversé (voir Section Introduction C.III.3.a).

L'objectif de cette étude s'est inscrit dans la continuité des travaux précédents du laboratoire, qui ont consisté à analyser *in vitro* les défauts moléculaires de mutations pathogènes de ClC-5 (Grand *et al.*, 2009; Grand *et al.*, 2011) (voir Section Introduction C.III.1.b). En effet, nous avons analysé la fonctionnalité d'un ClC-5 pathogène, portant une mutation du *gating glutamate* (E211G). Le phénotype du patient Dent et cette mutation, susceptible de provoquer un découplage du transport chlorure/proton de ClC-5, nous ont été fournis par collaboration avec Rosa Vargas-Poussou du Département de Génétique Humaine de l'Hôpital Européen Georges Pompidou à Paris.

MATÉRIEL ET MÉTHODES N°2

I. Biologie moléculaire

1. Plasmides

L'expression hétérologue de CIC-5 a nécessité l'utilisation de plasmides contenant dans leur site de multi-clonage (SMC) la séquence codante du gène *CLCN5* humain (référence GenBank NG_007159.2). Le premier, appelé pTLN, a été fourni par T. Jentsch (MCD/FMP, Berlin, Allemagne). Ce n'est pas un vecteur d'expression: il ne contient qu'un promoteur SP6 de bactériophage devant son SMC. Cependant, son SMC est entouré de fractions non-codantes de l'ARNm de la β -globine de Xénope et est suivi d'une séquence poly-A. Ce plasmide possède aussi un site de restriction MluI après son SMC et une cassette de résistance bactérienne à l'ampicilline (Amp^R) en aval d'un promoteur Amp^R. Le second plasmide appelé pEGFP est un vecteur d'expression dans les cellules de mammifères: il possède le promoteur du Cytomégalo virus (CMV) en amont de son SMC et une cassette de résistance à la kanamycine (Kan^R) en aval d'un promoteur SV40. Les 2 plasmides sont munis d'une séquence codant un tag hémagglutinine (HA) présent après le résidu 107 de CIC-5 (dans la boucle extracellulaire B-C), qui n'affecte pas le fonctionnement de ce dernier [voir Figure 31] (Schwake *et al.*, 2001).

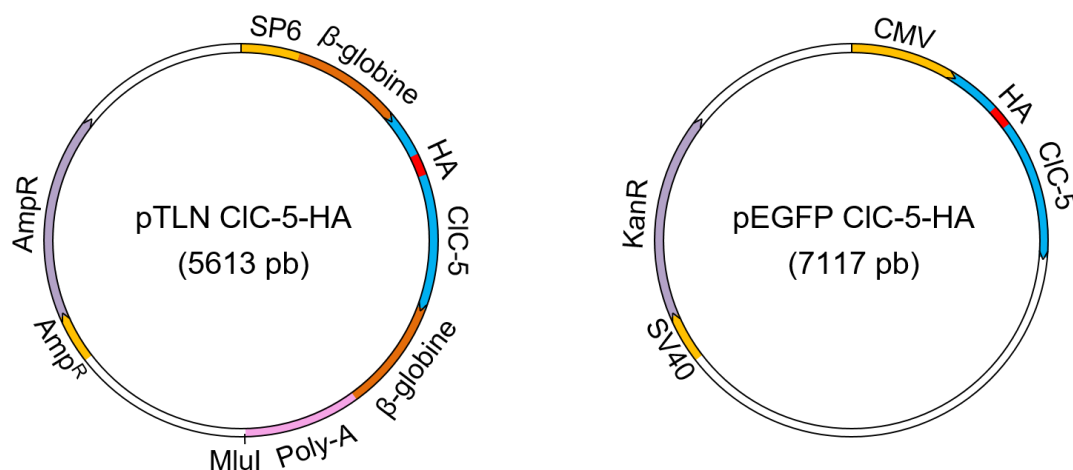


Figure 31: Cartes des plasmides pTLN (à gauche) et pEGFP (à droite) contenant la séquence encodant le CIC-5 humain muni d'un tag HA extracellulaire

Le Dr. A. Alekov (Institut de neurophysiologie, Hanovre, Allemagne) a utilisé un plasmide pRcCMV d'expression de CIC-5 fusionné par son extrémité C-terminale avec la protéine fluorescente mCherry et muni d'un tag HA après son résidu 392 (boucle externe L-M). Cette construction n'affecte pas la fonctionnalité de l'échangeur (Grieschat & Alekov, 2012).

Enfin, le Dr. Alexi Alekov a utilisé un plasmide p156rrL contenant la séquence codante d'une protéine de fusion appelée synapto-pHluorin2. Celle-ci est constituée de la synaptobrevine vésiculaire fusionnée à son extrémité C-terminale avec une protéine dérivée de la GFP appelée pHluorin2. L'ensemble co-localise avec ClC-5 et le marqueur des endosomes précoces Rab5 dans les cellules HEK293T (Alekov, 2015). Tous les plasmides possèdent également une origine de réplication procaryote permettant leur amplification bactérienne.

2. Mutagenèse dirigée et amplification bactérienne des plasmides

La mutation E211G a été introduite dans la séquence codante de *CLCN5* des différents plasmides par mutagenèse dirigée à l'aide du kit "*Quickchange site-directed mutagenesis kit*" (Stratagene). Brièvement, le processus nécessite la conception d'amorces contenant la mutation qui permettront d'amplifier le plasmide sous une forme mutée lors d'une réaction PCR. Cette PCR, dont les étapes sont ajustées, produit *via* une PfuTurbo polymérase un plasmide mutant méthylé. Alors que le plasmide parental non-méthylé est dégradé par l'enzyme DpnI, le plasmide muté est amplifié. Pour cela, des bactéries *E. coli* XL10Gold sont transformées par choc thermique puis cultivées à 37 °C en présence de l'antibiotique auquel le plasmide confère une résistance. La culture débute sur gélose en boîte de Petri puis continue dans un milieu nutritif liquide depuis lequel les plasmides sont purifiés sur colonne à l'aide du kit "*GeneJET Plasmid Miniprep kit*" (Fermentas). Le plasmide est enfin séquencé entièrement par l'entreprise *GATC Biotech*. Les plasmides séquencés sont régulièrement amplifiés par transformation de bactéries *E. coli* DH5 α puis sont dosés par spectrophotométrie avant utilisation.

3. Transcription *in vitro* du plasmide pTLN

Le plasmide pTLN ne permet pas la transcription *in vivo* de la séquence codante qu'il contient dans son SMC. En revanche, son promoteur SP6 permet de réaliser une transcription *in vitro* très efficace à l'aide du kit "*SP6 mMessage mMachine*" (Ambion). La transcription s'arrêtant à l'extrémité 3' de l'ADN, le plasmide est préalablement linéarisé par digestion enzymatique de son site MluI situé après la séquence poly-A [voir Figure 31]. La transcription produit une grande quantité d'ARN messenger artificiel de ClC-5, flanqué de séquences non-codantes de la β -globine de Xénope et se terminant par une queue poly-adénylée. Cet ARNm, stable dans les ovocytes de Xénope, est précipité, lavé, solubilisé puis purifié sur colonne à l'aide du kit "*GeneJet PCR Purification Kit*" (Fermentas). Il est enfin resuspendu dans de l'eau sans RNase, dosé par spectrophotométrie et stocké à -80 °C avant utilisation.

II. Modèles et méthodes d'expression hétérologue

1. Expression hétérologue par injection d'ARNm dans l'ovocyte de Xénope

L'ovocyte de l'amphibien *Xenopus laevis* est un modèle d'expression hétérologue robuste utilisé depuis longtemps par les électrophysiologistes. Il possède l'avantage d'être une cellule géante exprimant aisément à sa surface une très grande quantité de protéines. Sa conservation est simple : elle est effectuée à 17 °C dans un milieu *Barth* filtré contenant (en mM): 88 NaCl, 1 KCl, 0.41 CaCl₂, 0.33 Ca(NO₃)₂, 0.82 MgSO₄, 10 HEPES, pH 7.4, supplémenté par 10 U/ml de pénicilline et 10 µg/ml de streptomycine. Dans le cadre de cette étude, les ovocytes de Xénope utilisés nous ont été fournis au laboratoire par Gabrielle Planelles et Naziha Bakouh après leur extraction d'un Xénope. Les ovocytes ont été défolliculés par agitation durant 2 heures dans un milieu contenant 30-35 U/ml de collagénase de type 2, puis triés sous loupe binoculaire afin de ne conserver que les ovocytes de stade 6 utilisés pour l'expression hétérologue. Chaque ovocyte a ensuite été injecté manuellement avec 20 ng d'ARNm artificiel de ClC-5 dilués dans 50 nl d'eau, à l'aide de pipettes en verre forgé reliées à un injecteur à pression d'air (InjectMatic). Les expérimentations ont été réalisées 3 jours après injection et les résultats comparés à ceux obtenus sur des ovocytes non-injectés du même lot.

2. Culture et transfection transitoire des cellules HEK293T

La lignée cellulaire HEK293T (*Human Embryonic Kidney*) est humaine et d'origine rénale: elle constitue un modèle d'expression plus physiologique pour le ClC-5 que l'ovocyte de Xénope. Ces cellules ne sont pas polarisées, mais elles sont facilement transfectées et se répliquent très vite. Cela permet d'exprimer, suite à une transfection transitoire, une grande quantité de ClC-5 mature, stable et membranaire. Elles sont donc fréquemment utilisées pour l'expression hétérologue de ClC-5. Durant cette étude, des cellules HEK293T ont été cultivées en plaques 6 puits à 37 °C et 5 % CO₂ dans un milieu DMEM (Gibco) supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal (Eurobio ou Biochrom AG) et 1 % d'un mix pénicilline/streptomycine. Les cellules utilisées en électrophysiologie ont été transfectées par la méthode calcium-phosphate avec 10 µg du plasmide pRcCMV seul ou avec 5 µg du plasmide p156rrL, tandis que les cellules utilisées en biochimie ont été transfectées avec 1 µg du plasmide pEGFP à l'aide du "*X-tremeGENE 9 DNA transfection Reagent*" (Sigma Aldrich).

III. Analyses biochimiques de l'expression de ClC-5

1. Mesures de luminescence de surface dans l'ovocyte de Xénope

La luminescence de surface est une technique utilisée afin d'évaluer l'expression de ClC-5 à la membrane plasmique de l'ovocyte de Xénope. Pour cela, les ovocytes sont incubés 30 minutes à 4 °C dans une solution ND96 contenant (en mM) 96 NaCl, 2 KCl, 1 MgCl₂, 1.5 CaCl₂, 5 HEPES, pH 7.4 dans laquelle est ajoutée 1 % de BSA (Bovine Serum Albumin). Ensuite, les ovocytes sont placés 1 heure à 4 °C dans une solution ND96 + 1 % BSA contenant 1 µg/ml de l'anticorps monoclonal rat anti-HA 3F10 (Sigma-Aldrich, 1:100^{ème}). L'anticorps se fixe alors spécifiquement sur le tag HA extracellulaire de ClC-5. Les ovocytes sont lavés 8 fois 3 minutes à 4 °C avec une solution ND96 + 1 % BSA sans anticorps, puis sont incubés 45 minutes à 4 °C dans la même solution contenant 2 µg/ml d'anticorps 112-035-062 de chèvre anti-rat couplé à l'enzyme HRP (Horseradish Peroxydase) (JacksonImmunoResearch, 1:400^{ème}). Après 6 lavages de 3 minutes, les ovocytes sont placés individuellement 1 minute à température ambiante dans une solution "SuperSignal ELISA Femto Maximum Sensitivity Substrate Solution" (Pierce). Cette solution alcaline contient de l'H₂O₂ (substrat de la HRP) et du luminol. Ce dernier est oxydé par la HRP et entre dans un état excité d'où il revient à son état initial en émettant un photon du domaine visible: il est luminescent. C'est pourquoi l'ovocyte est ensuite placé dans la chambre d'un luminomètre Turner TD-20/20 (TurnerDesign) qui quantifie son émission lumineuse durant 10 secondes pour en faire une valeur en unité arbitraire ULR (Unité Lumineuse Relative). La valeur ULR obtenue est une fonction linéaire et proportionnelle de la quantité d'ARNm artificiel de ClC-5-HA injectée dans les ovocytes [voir Figure 32].

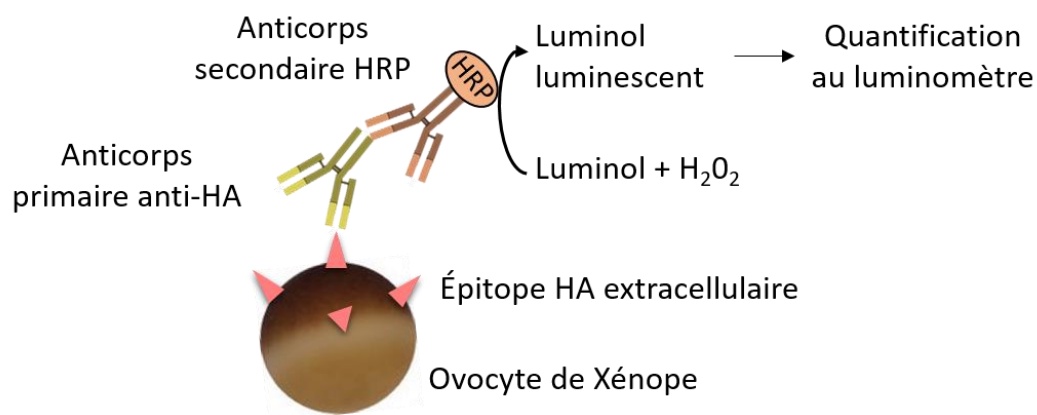


Figure 32: Représentation schématique de la méthode de détection de ClC-5 à la surface des ovocytes de Xénope par immunomarquage luminescent de son tag HA extracellulaire

2. Biotinylation de surface des cellules HEK293T

La biotinylation des protéines de surface est une méthode de liaison des protéines de la membrane plasmique avec la protéine appelée biotine. Son principe repose sur l'utilisation d'une biotine couplée à un réactif soluble se liant à pH 8.0 aux résidus lysine des protéines (Sulfo-NHS). La forte affinité de la biotine pour la streptavidine/neutravidine est ensuite utilisée afin de marquer ou d'isoler les protéines biotinylées. Durant cette étude, deux types de biotinylation ont été réalisés. La première permet créer une liaison covalente irréversible entre la biotine et le complexe Sulfo-NHS/protéine à l'aide du composé "*Sulfo-NHS-LC-Biotin*" (Pierce). L'ensemble sera marqué par une streptavidine couplée à un fluorochrome. La seconde nécessite l'emploi du composé "*Sulfo-NHS-SS-Biotin*" (Pierce) dont la liaison disulfure entre la biotine et le complexe Sulfo-NHS/protéine est réductible. Cela permettra, après leur liaison à des billes de neutravidine-agarose, de séparer les protéines membranaires isolées de la biotine afin de les faire migrer par électrophorèse [voir Figure 33].

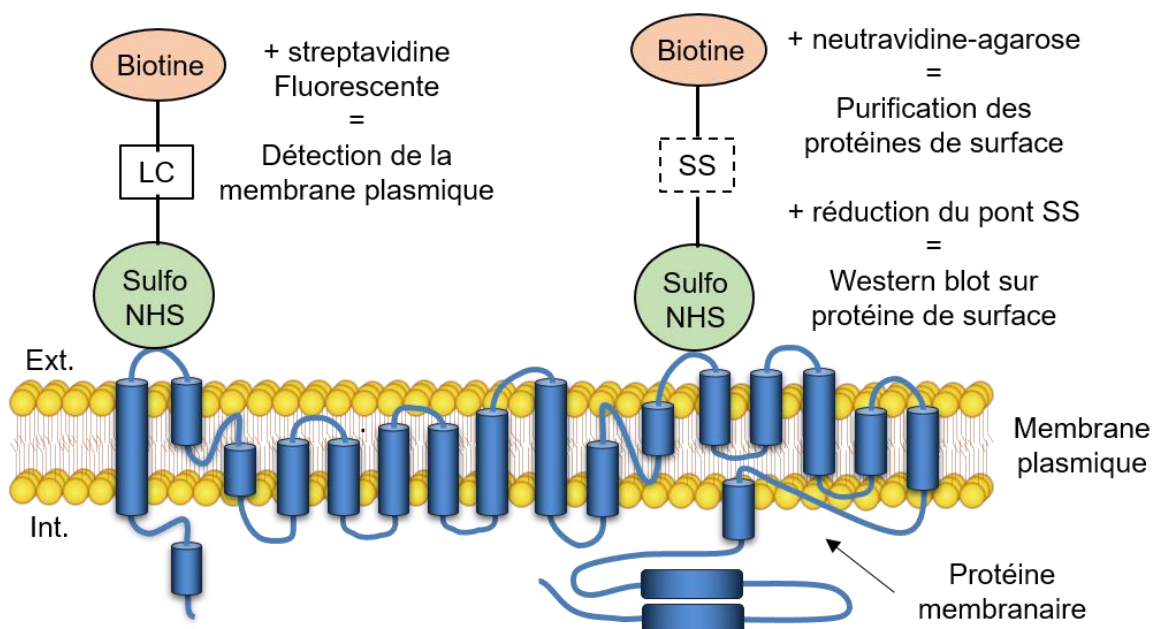


Figure 33: Représentation schématique des méthodes de biotinylation irréversible (à gauche) et réversible (à droite) des protéines de surface à l'aide de la Sulfo-NHS-Biotine

En pratique, 48 heures après transfection les HEK293T sont placées 30 minutes dans leur milieu à 4 °C afin d'abolir toute fluidité membranaire, puis sont lavées 3 fois dans un tampon PBS (Phosphate Buffer Saline) froid au pH 8.0 contenant 100 mM de CaCl_2 et 1 mM de MgCl_2 (PBS^{++}). Les cellules sont ensuite incubées 1 heure à 4 °C dans du PBS^{++} pH 8.0 contenant 1.5 mg/ml de Sulfo-NHS-Biotin. La biotine en excès est rincée 1 heure à 4 °C dans du PBS^{++} pH 8.0 + 3 % BSA, puis les cellules sont lavées 3 fois 5 minutes à 4 °C au PBS^{++} .

3. Extraction et dosage des protéines totales et biotinylées

Les protéines ont été extraites de cellules HEK293T transfectées depuis 48 heures. Les cellules sont incubées 10 minutes à 4 °C dans un tampon de lyse au pH 7.4 contenant (en mM) 150 NaCl, 50 Tris-HCl, 1 EDTA ainsi que 1 % de NP-40, 0.2 % de SDS et le mix d'inhibiteurs de protéases "*Complete EDTA Free protease inhibitor mix*" (Sigma-Aldrich). Elles sont ensuite lysées mécaniquement et les protéines des extraits cellulaires sont solubilisées par agitation à 4 °C sur roue durant 30 minutes dans la solution de lyse. Les extraits sont alors centrifugés à 5000 g durant 10 minutes à 4 °C. Les surnageants protéiques sont récupérés, dosés par spectrophotométrie à l'aide du kit "*BCA Protein Assay quantification kit*" (Pierce) et d'une gamme étalon de BSA, puis stockés à -80 °C avant utilisation.

L'extraction des protéines issues des cellules HEK293T biotinylées est effectuée après leur dernier lavage au PBS⁺⁺ à 4 °C. L'extraction est réalisée comme en l'absence de biotinylation mais avec une solution de lyse contenant (en mM) 50 Tris-HCl, 2 EDTA, 2 EGTA, 30 NaF, 30 NaPPi ainsi que 1 % de Triton-X100, 0.1 % de SDS et le mix d'inhibiteurs de protéases. Les extraits cellulaires sont centrifugés durant 3 minutes à 15.000 g puis les surnageants sont dosés comme indiqué précédemment. Les protéines biotinylées (de surface) sont isolées des protéines non-biotinylées (intracellulaires) à l'aide de billes d'agarose couplées à la neutravidine appelée "*NeutrAvidin-agarose beads*" (Pierce). La neutravidine, dérivée de la streptavidine, a une forte affinité à pH neutre pour la biotine. Pour cela, 110 µl de billes sont préalablement lavés puis dilués dans 500 µl d'une solution *TLB* contenant (en mM): 50 Tris HCl, 100 NaCl, 5 EDTA et le mix d'inhibiteurs de protéases. À cette solution, 100 µg de protéines totales sont ajoutées et l'ensemble est mis sous agitation constante pendant 16 heures à 4 °C. Durant cette étape, la neutravidin-agarose se lie à la biotine. Ensuite, la solution est centrifugée 2 minutes à 2500 g de façon à culoter les billes d'agarose. Le surnageant de protéines intracellulaire est jeté, les billes associées aux protéines biotinylées sont lavées et resuspendues dans la solution *TLB*. Après 6 cycles de lavage/centrifugation/resuspension, les billes sont incubées 10 minutes à 95 °C dans 50 µl du tampon Laemmli L2X pur utilisé en Western blot et vortexées. Cette incubation dans un milieu réducteur à chaud clive le pont disulfure du Sulfo-NHS-SS-Biotin [voir Figure 33], séparant les protéines biotinylées des billes d'agarose et de la biotine. La préparation est centrifugée une dernière fois 2 minutes à 2500 g puis le surnageant contenant les protéines biotinylées (de surface) est conservé à -80 °C jusqu'à utilisation.

4. Analyse des échantillons protéiques par Western blot

Les protéines sont dénaturées par incubation 10 minutes à 95 °C dans 1 volume de tampon Laemmli L2X contenant 125 mM de Tris-HCl pH 6.8, 5 % de SDS, 2.5 % de β -mercapto-ethanol, 13.6 % de sucrose et 0.0125 % de bleu de bromophénol. Le mélange visible et dense permet de déposer 20 μ g de protéines totales ou 35 μ l de protéines biotinylées au fond du puits d'un gel de polyacrylamide à 10 % contenant du SDS. Les protéines sont séparées dans ce gel selon leur taille par électrophorèse puis sont transférées à 4 °C par électrophorèse liquide sur une membrane de nitrocellulose. Enfin, un immunomarquage du tag HA de CIC-5 et de la β -actine (qui sert de témoin de dépôt des protéines dans les puits) est réalisé sur la membrane. Pour cela, la membrane est saturée 1 heure sous agitation dans un tampon TBS (Tris Buffer Saline) contenant 0.2 % de NP-40 et 5 % de protéines de lait de vache déshydratées. La membrane est alors incubée dans cette solution contenant un anticorps primaire (une nuit à 4 °C) puis contenant un anticorps secondaire couplé à la HRP (1 heure à température ambiante). Après chaque incubation la membrane est lavée 3 fois 15 minutes dans du TBS + 0.2 % NP-40. Enfin, les complexes immuns sont révélés par chimioluminescence en chambre noire à l'aide de l'"ECL Western Blotting Substrate" (Pierce) et quantifiés à l'aide du logiciel *Imagej*. Les anticorps utilisés pour révéler le tag HA de CIC-5 sont le rat anti-HA 3F10 à 0.67 μ g/ml (Sigma-Aldrich) et le chèvre anti-rat HRP 112-035-062 à 0.08 mg/ml (JacksonImmunoResearch).

5. Immunofluorescence indirecte sur les cellules HEK293T

L'immunofluorescence est réalisée sur des cellules transfectées 48 heures (et si besoin biotinylées) sur des lamelles de verres tapissées de Poly-L-Lysine. Les cellules sont lavées au PBS, fixées 15 minutes au PBS + 4 % de PFA (paraformaldéhyde) puis perméabilisées 1 minute dans du PBS + 0.1 % Triton-X100 + 0.1 % BSA. Les sites de liaison non-spécifiques des anticorps sont saturés 30 minutes par incubation des cellules dans une solution de blocage contenant (en mM): 20 Na_2HPO_4 , 450 NaCl, 0.1 % de Triton-X100 et 10 % de sérum de chèvre (Sigma-Aldrich). Les cellules sont alors incubées 1 heure dans cette solution supplémentée avec l'anticorps de souris anti-HA H3663 (Sigma Aldrich) et/ou de lapin anti-EEA1 Ab2900 (Abcam) à 5 μ g/ml. Après lavage au PBS, les cellules sont incubées avec des anticorps anti-lapin et/ou anti-souris couplés à des fluorochromes et si besoin de la streptavidine fluorescente (ThermoFischer, 1:200^{ème}) liant la biotine. Après lavage au PBS, les lamelles sont montées sur lame au *Glycergel* (DAKO) et observées au microscope confocal LSM710 (Zeiss).

IV. Analyses des propriétés de transport de ClC-5

1. Voltage-clamp en double microélectrodes dans l'ovocyte de Xénope

Le voltage-clamp en double microélectrodes est une technique qui permet de mesurer le courant global (I) généré par les canaux et transporteurs ioniques présents à la membrane plasmique de cellules (telles que les ovocytes de Xénope) à différents potentiels de membrane imposés par l'expérimentateur (V_i) [voir Figure 34]. Pour ce faire, un ovocyte de Xénope est placé dans une chambre de perfusion contenant la solution ND96 (Voir Section Matériel et Méthodes n°2 III.1). Si besoin, cette solution est remplacée en cours de mesure par une solution ND96 dont le pH est ajusté à 5.5, 6.5, 7.0 ou 8.0 en remplaçant les 5 mM d'HEPES par 5 mM de MES ou de Trizma Base. Deux microélectrodes en borosilicate de résistance 0,1-1 M Ω sont étirées depuis des capillaires, remplies d'une solution conductrice de KCl 3M, reliées à un amplificateur TEV-200 (Dagan) par l'intermédiaire de filaments d'argent chlorurés et enfin introduites dans l'ovocyte. L'une des 2 mesure le potentiel de membrane (V_m), qu'un amplificateur compare au V_i . L'autre, située à la sortie de l'amplificateur, injecte dans l'ovocyte un courant i permettant d'amener le potentiel V_m au potentiel V_i . L'amplificateur est connecté à une interface analogique/numérique Digidata 1320A (Axon Instruments). Après leur conversion, les données sont analysées sur ordinateur grâce au logiciel PClamp 10 (Axon Instruments). L'ensemble du dispositif est placé sur une table antivibratoire entourée d'une cage de Faraday qui isole électriquement le circuit. Notre protocole de voltage-clamp impose à l'ovocyte des potentiels allant de -100 à +100 mV par pas de 20 mV durant 800 ms chacun.

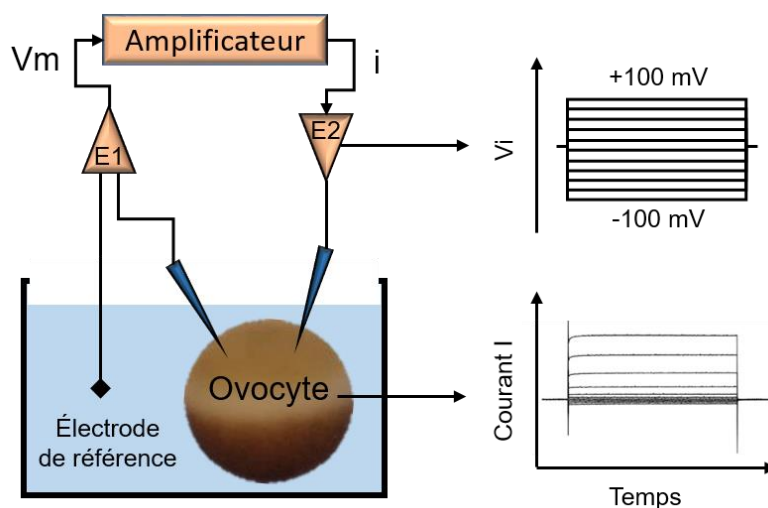


Figure 34: Représentation schématique du dispositif de voltage-clamp en double microélectrodes utilisé pour mesurer les courants dans l'ovocyte de Xénope

2. Mesures du transport de H^+ de ClC-5 dans les cellules HEK293T

Des mesures de patch-clamp en configuration cellule entière appliquées aux cellules HEK293T ont permis de mesurer la capacité de transport des protons par le ClC-5 sauvage et le mutant E211G. Elles ont été réalisées par le Dr. Alexi Alekov (Institut de neurophysiologie, Hanovre, Allemagne). Cette technique électrophysiologique consiste, comme le voltage-clamp en double microélectrodes, à imposer différents potentiels à une cellule et à mesurer le courant généré en retour par les canaux et transporteurs ioniques exprimés à sa surface. Pour ce faire, une pipette de verre est remplie d'une solution contenant (en mM): 110 NaCl, 5 $MgCl_2$, 5 EGTA, 10 HEPES, pH 7.4. La solution de la pipette est connectée à un amplificateur par un filament d'argent chloruré. L'autre borne du circuit est constituée par une électrode de référence. Les signaux provenant de l'amplificateur sont visualisés et analysés sur ordinateur après filtrage à 3 KHz et conversion analogique/numérique à 100 KHz. Les cellules sont placées dans une solution physiologique contenant (en mM): 145 NaCl, 4 KCl, 2 $CaCl_2$, 1 $MgCl_2$, 0.25 HEPES, pH 7.4. L'application d'une pression négative dans l'électrode préalablement attachée à la surface de la cellule permet de mettre en continuité électrique cette dernière et l'intérieur de la cellule, et ainsi d'obtenir la configuration de patch-clamp en cellule entière. Les courants globaux traversant la membrane de la cellule peuvent alors être enregistrés. En outre, 37.5 μM de BCECF (2',7'-bis(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluoresceine), qui est un composé qui fluorescent, ont été rajoutés dans la solution de pipette. Le BCECF émet de la fluorescence à 530 nm dont l'intensité est proportionnelle au pH lors d'une excitation par une longueur d'onde de 490 nm. De plus, son émission de fluorescence à 530 nm ne dépend pas du pH lorsqu'il est excité par une longueur d'onde de 440 nm (c'est un point isobestique) [voir Figure 35].

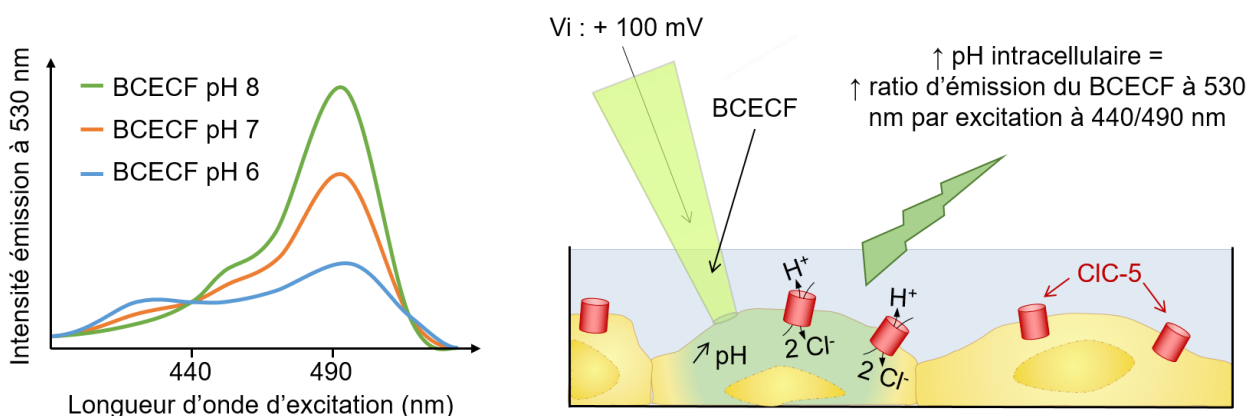


Figure 35: Spectre d'excitation/émission idéalisé du BCECF (à gauche) et schéma du principe de la mesure du transport des protons par ClC-5 dans les cellules (à droite)

En pratique, l'expérimentateur s'attend à ce que l'application de différences de potentiel transmembranaires positives provoque un fort courant rectifiant sortant, suite à l'activation du ClC-5 sauvage surexprimé par la cellule. Une telle dépolarisation de la membrane plasmique conduira alors à un flux sortant important de H^+ et donc à une alcalisation du cytoplasme. Cette alcalinisation est mesurable grâce à la fluorescence émise en parallèle par le BCECF. Le ratio de fluorescence émise à 530 nm par 2 excitations successives à 490 et 430 nm est mesuré à l'aide d'un microscope à fluorescence combiné au poste de patch-clamp. Le ratio augmente si le cytoplasme est alcalinisé (Alekov & Fahlke, 2009).

3. Détermination du pH endosomal dans les cellules HEK293T

Les mesures de pH endosomal dans les cellules HEK293T ont été effectuées par le Dr. Alexi Alekov (Institut de neurophysiologie, Hanovre, Allemagne). Ces cellules exprimaient à la fois un ClC-5 fusionné à son extrémité C-terminale avec la protéine fluorescente mCherry et la protéine de fusion synapto-pHluorin2. Cette dernière, comme le BCECF (voir Section Matériel et Méthodes n°2 IV.2) est une sonde ratiométrique sensible au pH: son excitation à 488 nm provoque une émission fluorescente à 500-550 nm dont l'intensité est inversement proportionnelle au pH, alors que son excitation à 405 nm provoque une émission de fluorescence à 500-550 nm indépendante du pH (Mahon, 2011). La synapto-pHluorin2 étant adressée aux endosomes précoces (Alekov, 2015), y mesurer le ratio des intensités de fluorescence émises à 500-550 nm suite à 2 excitations successives à 405 et 488 nm (ratio 405/488) permet de mesurer le pH luminal. Les valeurs absolues de pH sont déterminées par comparaison des ratios 405/488 à ceux obtenus dans des vésicules néoformées depuis un milieu extracellulaire de pH connu. En pratique, des cellules HEK293T vivantes maintenues à température ambiante dans du PBS⁺⁺ ont été photographiées à l'aide d'un microscope confocal LSM780 (Zeiss). Les ratios 405/488 ont été mesurés au niveau d'endosomes précoces exprimant à la fois la synapto-pHluorin2 et le ClC-5-mCherry (sauvage ou E211G) qui fluoresce en rouge à 560-650 nm. Ces ratios ont été comparés à ceux d'endosomes n'exprimant pas ClC-5.

V. Présentation et analyse statistique des données

Les résultats ont été présentés *via* leur moyenne $\pm$ leur erreur type ou *via* des photographies représentatives, obtenues dans le cadre des n expériences indiquées. Les moyennes ont été comparées 2-à-2 à l'aide de tests de Student bilatéraux au risque α de 5 %. Une différence significative a été considérée lorsque p , résultante du test, était inférieure à 0,05.

RÉSULTATS DE LA 2^{NDE} ÉTUDE

I. Article n°2

A novel ClC-5 mutation involved in Dent's disease leads to normal endosomal acidification despite abolished proton transport.

Yohan Bignon^{1,2,3,4}, Alexi Alekov⁵, Nadia Frachon^{1,2,3,4}, Olivier Lahuna⁶, Carine Jean-Baptiste Doh-Egueli⁷, Georges Deschênes^{8,9}, Rosa Vargas-Poussou^{10,11} and Stéphane Lourdel^{1,2,3,4}

¹Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR_S 1138, Centre de Recherche des Cordeliers, F-75006, Paris, France.

²INSERM, UMR_S 1138, Centre de Recherche des Cordeliers, F-75006, Paris, France.

³Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, UMR_S 1138, Centre de Recherche des Cordeliers, F-75006, Paris, France.

⁴Centre National de la Recherche Scientifique ERL 8228, Centre de Recherche des Cordeliers, F-75006 Paris, France.

⁵Institut für Neurophysiologie, Medizinische Hochschule Hannover, Hannover, Germany.

⁶Inserm, U1016, Institut Cochin, Paris, France.

⁷CHU de Pointe-à-Pitre, Service de pédiatrie générale, Pointe-à-Pitre, France.

⁸Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Robert Debré, Service de Néphrologie Pédiatrique, Paris, France.

⁹Centre de Référence des Maladies Rénales Héritaires de l'Enfant et de l'Adulte (MARHEA), Paris, France.

¹⁰Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Département de génétique, Paris, France.

¹¹Université Paris-Descartes, Faculté de Médecine, Paris, France.

Running title: Dent's disease: characterization of a ClC-5 Cl⁻ channel mutant

Key words: Dent's disease; *CLCN5*; ClC-5; endosomal acidification; endocytosis

Corresponding author:

Dr. Stéphane Lourdel
Centre de Recherche des Cordeliers
UMRS 1138, ERL 8228
15, rue de l'école de médecine
75006 Paris, France
Phone : +33 1 44 27 51 17
Email : stephane.lourdel@upmc.fr

ABSTRACT

Dent's disease is an X-linked recessive renal tubular disorder characterized by low-molecular-weight proteinuria, hypercalciuria, nephrolithiasis, nephrocalcinosis, and progressive renal failure. Inactivating mutations of *CLCN5*, the gene encoding the $2\text{Cl}^-/\text{H}^+$ exchanger ClC-5 have been reported in patients with Dent's disease 1. *In vivo* studies in mice harboring a mutation in the "gating glutamate" (E211A) of ClC-5 and mathematical modeling suggest that endosomal chloride concentration could be an important parameter in endocytosis, rather than acidification as earlier hypothesized. Here, to better understand the physiopathology of the disease, we investigated the consequences of a new pathogenic mutation (E211G) affecting the "gating glutamate" of ClC-5. In HEK293T cells, the E211G mutant displayed unaltered complex N-glycosylation and subsequent normal plasma membrane and early endosomes localization, as wild-type (WT) ClC-5. In *X. laevis* oocytes and HEK293T cells, we found that contrasting with WT ClC-5, the mutation abolished the outward rectification, the sensitivity to extracellular H^+ and converted ClC-5 into a Cl^- channel. Investigation of endosomal acidification in HEK293T cells using the pH-sensitive GFP variant pHluorin2 showed that the luminal pH of cells expressing WT or E211G was not significantly different. Our study further confirms that impaired acidification of endosomes is not the only parameter in defective endocytosis in Dent's disease 1.

INTRODUCTION

Dent's disease is a hereditary X-linked recessive renal proximal tubule disorder characterized by low-molecular-weight-proteinuria (LMWP), hypercalciuria and hyperphosphaturia, inconstantly associated with others signs of Fanconi syndrome. Up to now, there is no specific treatment: Dent's disease frequently led to nephrocalcinosis, nephrolithiasis and in many cases chronic renal failure. About two-third of patients display inactivating mutations of the *CLCN5* gene encoding the $2\text{Cl}^-/\text{H}^+$ exchanger ClC-5 (Dent's disease 1, MIM #300009), whereas inactivating mutations of the *OCRL1* gene encoding the phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate-5-phosphatase have been reported in ~15% of patients (Dent's disease 2, MIM #300555) (Hoopes et al., 2005; Mansour-Hendili et al., 2015). In the kidney, ClC-5 is abundantly expressed in the early endosomes of proximal tubule cells where it co-localizes with the V-type H^+ -ATPase and low-molecular-weight proteins after their uptake by endocytosis. Lower levels of expression are also detected at the plasma membrane of these cells, in the thick ascending limb of Henle's loop and in α -intercalated cells of the collecting duct (Devuyst et al., 1999; Gunther et al., 1998; Piwon et al., 2000; Sakamoto et al., 1999; Suzuki et al., 2006). The co-distribution of ClC-5 with the proton pump on early endosomes of proximal tubule cells suggested that it may play a crucial role in receptor-mediated endocytosis by permitting an electrical shunt required for sufficient endosomal acidification by the V-type H^+ -ATPase (Gunther et al., 1998; Piwon et al., 2000). Indeed, disturbed endosomal acidification and endocytosis were observed in ClC-5 knock-out mice (Gunther et al., 2003; Novarino et al., 2010; Piwon et al., 2000; Wang et al., 2005), in proximal tubule cell lines (Wang et al., 2005) and in immortalized proximal tubule cells from patients with Dent's disease (Gorvin et al., 2013).

The small amount of ClC-5 detected at the brush border of proximal tubule cells is also related to endocytosis, by mediating interactions with several proteins involved in receptor-mediated endocytosis, such as the multi-ligand receptor megalin and the microtubule-dependent motor protein KIF3B (Hryciw et al., 2006, 2012a, 2012b; Reed et al., 2010; Wang et al., 2005).

ClC 2Cl⁻/H⁺ exchangers carry a critical glutamate residue that plays a key role in the coupling of H⁺ to Cl⁻ flux (Dutzler et al., 2002, 2003; Feng et al., 2010). An artificial mutation of this “gating glutamate” to alanine in ClC-5 (E211A) and other ClC abolished H⁺ flux and allowed the observation of pure Cl⁻ conductance (Accardi and Miller, 2004; Feng et al., 2010; Matsuda et al., 2010; Neagoe et al., 2010; Picollo and Pusch, 2005; Scheel et al., 2005). Interestingly, mice carrying the E211A artificial mutation that converts ClC-5 to a pure Cl⁻ channel displayed the same renal phenotype as ClC-5 knock-out, including LMWP proteinuria, despite normal endosomal acidification (Novarino et al., 2010). Model calculations indicate that such a Cl⁻ conductance may permit sufficient acidification, but leads to a reduced Cl⁻ endosomal accumulation (Weinert et al., 2010).

It was also found in heterologous expression systems and in immortalized proximal tubule cells from patients that some *CLCN5* mutations result in unaltered endosomal pH (Gorvin et al., 2013; Smith et al., 2009). Altogether, these results suggest that endosomal chloride accumulation during ClC-5 transport in proximal tubule cells may be critical in endocytosis, rather than acidification as first hypothesized. They also indicate that the role of ClC-5 in the physiopathology of the disease is more complex than previously assumed.

To date, at least 234 *CLCN5* inactivating mutations have been identified in patients with Dent's disease type 1 (Mansour-Hendili et al., 2015). Functional investigations using *X. laevis* oocytes and mammalian cells allowed the division of *CLCN5* missense mutations into three classes (D'Antonio et al., 2013; Grand et al., 2011, 2011; Lourdel et al., 2012; Ludwig et al., 2005; Smith et al., 2009): class 1 mutations are the most frequent, and induce a defect in protein folding and processing resulting in endoplasmic reticulum retention of the mutant protein for further degradation by the proteasome; class 2 mutations cause a lower stability of the mature protein; and class 3 mutations alter electrical activity but not the trafficking of the mutant protein to the plasma membrane and the early endosomes.

In this study, we report data that help to better understand the functional implication of ClC-5 in Dent's disease 1 by describing a new pathogenic *CLCN5* missense mutation that affects the critical “gating glutamate” of ClC-5 and by further investigating its effects on endosomal acidification in *X. laevis* oocytes and mammalian cell lines.

RESULTS

E211G mutation causes progressive Dent disease type 1 in a young patient. The patient is the first son of unrelated parents. He was born at term of 39 weeks after an uneventful pregnancy, with body weight of 3,070 g and height of 48 cm. At 4 months of age, failure to thrive was observed. At one year and a half, he was hospitalized for severe dehydration ($> 10\%$ BW) with hyponatremia, hypokalemia, hypouricemia and hypophosphatemia (Table 1). Renal Ultrasound showed no nephrocalcinosis. He received intravenous rehydration and ambulatory treatment with salt and phosphate supplementation. Four months later, an hospitalization in a tertiary care center showed failure to thrive, similar electrolyte abnormalities and the urinary analysis suggested a diagnosis of Fanconi syndrome due to the association of salt loosing with secondary hyperaldosteronism, renal hypokalemia and hypouricemia, aminoaciduria, hypercalciuria, low molecular weight proteinuria (LMWP) and stage 2 CKD: eGFR (estimated glomerular filtration rate) was $78 \text{ ml/mn}/1.73\text{m}^2$. X-ray examination show a bone age concordant with chronological age and no rickets.

The diagnosis of cystinosis was excluded (intraleucocytary cystine at 0.23 nmol/mg , no cysteine crystals in retina or cornea and normal sensitivity to light). Diagnosis of Dent disease was also considered; family screening showed no LMWP and mild hypercalciuria in his mother (Table 1).

Unfortunately, the compliance to treatment and to medical follow-up of this patient and his family is poor and in the last years he has only consulted to the emergency services twice during acute episodes associated with dehydration. At last follow-up, his eGFR calculated by Schwartz formula was $55 \text{ ml/min}/1.73 \text{ m}^2$.

E211G mutation alters currents and sensitivity to external pH. To characterize functionally the ClC-5 E211G mutant, we first injected wild-type (WT) and mutant human ClC-5 cRNA into *X. laevis* oocytes (Figure 1). Two electrode voltage-clamp recordings revealed typical strongly outwardly rectifying currents for the oocytes expressing WT ClC-5 (Friedrich et al., 1999; Grand et al., 2009, 2011; Picollo and Pusch, 2005; Scheel et al., 2005; Steinmeyer et al., 1995). In contrast, we observed that the E211G mutant displayed a nearly linear current/voltage relationship as already described for the artificial E211A and the recently described pathogenic E211Q mutants (Friedrich et al., 1999; Picollo and Pusch, 2005; Satoh et al., 2016; Scheel et al., 2005) (Figure 1A-B). The currents recorded with the E211G mutant were significantly reduced by 38% in comparison to those of WT ClC-5 at positive membrane voltages. To further elucidate the mechanisms leading to reduced electrical activity, we investigated the plasma membrane targeting of the ClC-5 mutant using a chemiluminescence assay by taking advantage of the extracellular HA epitope on ClC-5. We found that the normalized luminescence responses did not significantly differ between WT ClC-5 and the E211G mutant (Figure 1C). Thus, the reduced current amplitude of the mutant cannot be attributed to reduced cell surface expression. Furthermore, as previously reported (Friedrich et al., 1999; Picollo and Pusch, 2005; Scheel et al., 2005), currents from WT ClC-5 were reduced by an extracellular acidification (Figure 1D). Conversely, currents from the E211G mutant did not responded to extracellular pH changes.

E211G mutation have no effect on plasma membrane and early endosomes localization.

To further document the subcellular localization of the mutant ClC-5, we performed confocal microscopy imaging in transiently-transfected HEK293T cells, a mammalian cell line that is appropriate for such analysis (Alekov, 2015; Grand et al., 2009, 2011; Satoh et al., 2016).

As previously reported (Alekov, 2015; Grand et al., 2009, 2011; Smith et al., 2009; Tang et al., 2016), Figure 2 shows that WT ClC-5 co-localized with biotinylated cell-surface proteins, and with the early endosomes marker EEA1. Similarly, the ClC-5 E211G mutant co-localized with biotinylated cell-surface proteins and EEA1 (Figure 2). We also carried out surface biotinylation experiments using transiently-transfected HEK293T cells to further explore the plasma membrane expression of the mutant ClC-5. No significant differences could be detected in the surface fraction containing WT ClC-5 and the E211G mutant (Figure 3A). Overall, these data indicate that the E211G mutation lead to normal plasma membrane and early endosomes expression of ClC-5.

E211G mutation does not result in altered protein expression. We next examined the impact of the E211G mutation on ClC-5 protein expression. Total cell lysates isolated from HEK293T cells transfected transiently with WT or mutant ClC-5 were subjected to a western blot analysis (Figure 3B). In agreement with previous reports (Grand et al., 2009, 2011), WT ClC-5 expression produced two main immunoreactive signals at ~ 75 and ~ 80-90 kDa. The lower band corresponds to the core-glycosylated form of ClC-5 that is retained in the endoplasmic reticulum, whereas the upper band corresponds to the complex-glycosylated form of ClC-5 that is present at the plasma membrane. Here, when an equivalent amount of proteins was loaded in each lane, we observed no quantitative or qualitative signal difference between WT ClC-5 and the E211G mutant. Thus, the E211G does not change the stability or N-glycosylation of ClC-5.

E211G mutation uncouples Cl^-/H^+ exchange. Overall, our results demonstrate that the E211G mutation does not alter the subcellular localization and protein expression of ClC-5, but leads to an alteration of its function. Interestingly, the insensitivity of the E211G mutant to extracellular acidification reported in *X. laevis* oocytes (Figure 1D) was similar to data obtained for the E211A and E211Q mutants and thus suggests that the mutation may convert ClC-5 into a pure chloride conductance by eliminating the coupling of the H^+ currents to the Cl^- flux (Picollo and Pusch, 2005; Satoh et al., 2016; Scheel et al., 2005). Therefore, we then investigated proton transport of the mutant in HEK293T transfected cells.

For this purpose, we measured the variations of the intracellular pH of cells expressing WT or E211G ClC-5 upon membrane depolarization by using the ratiometric pH-sensitive fluorescent indicator BCECF. The plasma membrane was patch-clamped and subjected to different voltages using the whole-cell configuration. Similar to recordings in *X. laevis* oocytes, currents obtained with the E211G mutant exhibited abolished outward rectification. Currents from the previously reported ClC-5 E211Q mutant (Satoh et al., 2016) were significantly lower compared to those of the E211G mutant (Figure 4A-B). In contrast to data recorded with WT ClC-5, exposure of transfected cells with the E211G mutant to positive membrane voltages did not lead to significant voltage-dependent intracellular pH changes (Figure 4C). The voltage-dependence of the rate of the intracellular pH change of cells expressing WT ClC-5 correlated well with the voltage-dependence of the currents obtained with WT ClC-5 (Figure 4D). Such relationship could not be obtained with the ClC-5 E211G mutant despite significant currents at positive and negative membrane voltages in HEK293T cells. These results therefore demonstrate that the ClC-5 E211G mutant behaves as a pure Cl^- channel.

E211G mutation results in unaltered endosomal acidification. The localization of ClC-5 in early endosomes suggests an involvement in proximal tubule endocytosis by permitting intraluminal acidification, in agreement with the LMWP that is observed in patients with Dent's disease (Devuyst and Luciani, 2015). Thus, we next investigated the effect of the E211G mutation on endosomal acidification in transfected HEK293T cells using the pH-sensitive GFP variant pHluorin2 fused to the C-terminus of the vesicular protein synaptobrevin (Alekov, 2015). As expected from a previous report (Alekov, 2015), ClC-5 and synapto-pHluorin2 showed endosomal co-localization (Figure 5A). The analysis of ClC-5-containing endosomes (Figure 5B) showed that the E211G mutation lead to endosomal acidification ($\text{pH } 6.39 \pm 0.05$, $n = 41$) that was not significantly different to those elicited by WT ClC-5 ($\text{pH } 6.24 \pm 0.06$, $n = 30$) (Figure 5C). Endosomal pH was, however, significantly different between mock cells and cells expressing WT ClC-5 or the E211G mutant. Thus, E211G ClC-5 is still able to mediate proper early endosomal acidification.

DISCUSSION

Here, we investigated the functional and cellular effects of a novel ClC-5 mutation (E211G), affecting the “gating glutamate” that is responsible for coupling the Cl⁻ flux to the H⁺ counter-transport found in a patient with Dent’s disease 1.

Using voltage-clamp recordings in *X. laevis* oocytes, we showed that the outward rectification and the sensitivity to extracellular H⁺ were abolished in the E211G mutant in contrast to WT ClC-5. Such alterations in ion conduction have already been observed for the artificial E211A and the pathogenic E211Q mutations. These amino acid substitutions directly affect the “gating glutamate” and lead ClC-5 to function as a Cl⁻ channel (Picollo and Pusch, 2005; Satoh et al., 2016; Scheel et al., 2005). Consistent with these observations, we have also demonstrated that this mutant ClC-5 behaves as a pure Cl⁻ channel. Furthermore, the mutant displayed similar protein processing, plasma membrane and early endosomes distribution than WT ClC-5. Unaltered subcellular localization has already been described for the E211Q mutant, except that higher protein expression levels were reported for this mutant (Satoh et al., 2016).

It is postulated that defect in endosomal acidification consecutive to the loss-of-function of ClC-5 is of crucial importance for proper proximal tubule endocytosis (Devuyst and Luciani, 2015; Jentsch, 2015). Remarkably, using the ratiometric pH-sensitive GFP variant pHluorin2 in HEK293T cells, we demonstrated that the E211G mutation is not associated with defective endosomal acidification, given that the mean intraluminal pH did not significantly differ between cells expressing WT or the mutant ClC-5. This result is in sharp contrast with previous findings reported for endosomal acidification in HEK293T cells expressing the E211Q mutant. Despite unaltered early endosomes targeting of the mutant protein, the vesicular pH of these cells was significantly higher compared to cells expressing WT ClC-5 (Satoh et al., 2016). Changes in current amplitudes of the mutant proteins could explain this difference.

Our recordings in HEK293T cells demonstrated that the E211Q (which changes an acidic amino acid by a polar uncharged one) mutation results in significantly lower currents compared to those of the E211G mutant (which changes an acidic amino acid by an hydrophobic one). These findings are in line with previous observations showing that mutation E211C, despite its good surface expression, exhibits reduced current amplitudes that dramatically increase when intracellular pH is lowered (Grieschat and Alekov, 2012). It seems, therefore, that not only the charge of the amino acid side chain at position 211 but also its size is important for the biophysical properties of ClC-5 (Supplemental Figure 1). This hypothesis is in agreement with the data of Satoh et al demonstrating that the transport current amplitude for mutation E211Q is lower compared to mutation E211A (Satoh et al., 2016). ClC-5 mutants with large electrically neutral side chain at position 211 might, therefore, exhibit insufficient electrical activity and reduce thereby the electrical shunt required by the V-type H⁺-ATPase. This would inhibit further H⁺ pumping by the V-type H⁺-ATPase, and the vesicular pH would be quite distant from its physiological value. Interestingly, our findings are similar with data previously generated by Jentsch's group using the E211A mouse model (Novarino et al., 2010). Despite normal acidification of isolated early endosomes from the renal cortex, these mice displayed impaired proximal tubule endocytosis that was comparable to that observed in ClC-5 knock-out mice. Such phenotype was ascribed to reduced Cl⁻ concentration in endosomes resulting during acidification from the activity of a Cl⁻ channel instead of a 2Cl⁻/H⁺ exchanger. This would in turn impair the endosomal/lysosomal pathway of the proximal tubule (Novarino et al., 2010; Weinert et al., 2010).

In Dent' diseases 1, no correlation between type of mutation and phenotype has been described (Mansour-Hendili et al., 2015). Patient harboring E211Q mutation has high LMWP (urinary β -2 microglobuline 37.5 mg/L), hypercalciuria, nephrocalcinosis and normal renal function at 7.4 years old. Our patient harboring E211Q mutation also has high LMWP (urinary α -1 microglobuline 196 mg/L), hypercalciuria without nephrocalcinosis but developed CKD at 5 years old.

Our data demonstrate that LMWP proteinuria observed in the patient harboring the E211G mutation cannot be explained by alterations in endocytosis due to defective endosomal acidification, but rather strongly suggest an involvement of intraluminal Cl^- in this phenomenon (Smith and Lippiat, 2010). The pivotal role of ClC-5 in controlling vesicular Cl^- concentration for proper proximal tubule endocytosis is further supported by other functional studies using different cell lines. Interestingly, two other ClC-5 pathogenic mutations (G57V and 30:insH) positioned at quite distance from the “gating glutamate” induced similar disturbances. Respectively in HEK-MSR cells and in immortalized proximal tubular epithelial cells from patients with Dent's disease 1 expressing those two ClC-5 mutants, authors were not able to see any abnormal endosomal acidification (Gorvin et al., 2013; Smith et al., 2009). However, defective receptor-mediated endocytosis was also observed with the 30:insH mutation, whereas fluid-phase endocytosis was unaffected. Several hypotheses have been proposed to explain the involvement of luminal Cl^- in the endosomal pathway (Stauber and Jentsch, 2013). Changes in Cl^- concentration may for instance affect Ca^{2+} efflux from members of the two-pore channel (TPC) family that are target for the second messenger nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP) or the transient receptor potential mucolipin (TRPML) family. These channels play a significant role in fusion and trafficking of the endolysosomal network by promoting local Ca^{2+} release (Brailoiu and Brailoiu, 2016; Grimm et al., 2017).

Alternatively, because these organelles are highly permeable to water, alterations in luminal Cl^- concentration may influence their shape via an osmotic effect. These changes could prevent formation of tubular membranes that are required for the formation or the fusion of endosomes and lysosomes (Scott and Gruenberg, 2011). In this context, further experiments will be needed to unravel the precise molecular mechanisms linking Cl^- accumulation in early endosomes of proximal tubule cells and endocytosis.

CONCISE METHODS

DNA sequence analysis of the *CLCN5* gene. Peripheral blood samples were obtained from the patient and genomic DNA was extracted by standard methods. The coding exons (2 to 12) and intron–exon junctions were amplified with *CLCN5*-specific primers described elsewhere using PCR amplification (Lloyd et al., 1997). We carried out direct sequencing using the dioxo chain termination method on an automated Division 373A Stretch DNA capillary sequencer (Perkin Elmer/Applied Biosystems, CA, USA), and evaluated sequences with Sequencher software (Gene Codes, MI, USA).

Molecular Biology. The human coding sequence of wild-type ClC-5 (GenBank NG_007159.2) was subcloned either into the pTLN vector (a generous gift of T. J. Jentsch, MDC/FMP, Berlin, Germany) for expression in *X. laevis* oocytes, or into the pEGFP and pRcCMV vectors for expression in HEK293T cells. In the pEGFP vector, the coding sequence for GFP have been substituted for those of ClC-5. The HA epitope (YPYDVPDYA) is introduced between amino acids 107 and 108 of ClC-5 in pTLN and pEGFP vectors, or between amino acids 392 and 393 in the pRcCMV vector containing the fluorescent mCherry fused to the C-terminus of ClC-5, as previously described (Grand et al., 2011; Grieschat and Alekov, 2014). The ClC-5 E211G mutation was introduced in those vectors by site-directed mutagenesis using the Quickchange site-directed mutagenesis kit (Stratagene, CA, USA). All constructs were fully sequenced before use. The synapto-pHluorin2 construct was kindly provided by Dr. Raul Guzman (FZ Jülich, Jülich, Germany). For its creation, we used the original vesicular pH reporter synapto-pHluorin kindly provided by Dr. Miesenböck (Miesenböck et al., 1998). In our construct, we replaced the fluorescent GFP-based pHluorin with the newer and brighter pHluorin2 (Mahon, 2011) obtained as a gift from Dr. Mahon. Finally, the synapto-pHluorin2 sequence was subcloned into the p156rrL vector using standard PCR procedures.

Expression in *X. laevis* oocytes. Capped cRNA were synthesized in vitro from pTLN expression vectors using the SP6 mMessage mMachine Kit (Ambion, TX, USA). Defolliculated *X. laevis* oocytes were injected with 50 nl of RNase free-water containing 20 ng of the different cRNAs and were then kept at 17°C in modified Barth's solution containing (in mM): 88 NaCl, 1 KCl, 0.41 CaCl₂, 0.33 Ca(NO₃)₂, 0.82 MgSO₄, 10 HEPES, pH 7.4, and supplemented with 10 U/ml of penicillin and 10 µg/ml streptomycin (ThermoFischer, MA, USA).

Surface labeling of oocytes. Experiments were performed as previously described (Grand et al., 2011). Briefly, a rat monoclonal anti-HA antibody (3F10, Roche Diagnostics, France) was used as primary antibody and a peroxidase-conjugated goat anti-rat antibody (Jackson ImmunoResearch, PA, USA) as secondary antibody. Chemiluminescence was quantified using a Turner TD-20/20 luminometer (Turner Designs, CA, USA) by placing individual oocytes in 50 µl of SuperSignal Elisa Femto Maximum Sensitivity Substrate Solution (Pierce, IL, USA).

Voltage-clamp in *X. laevis* oocytes. Two days after injection, two-electrode voltage-clamp experiments were performed at room temperature using a TEV-200A amplifier (Dagan, MN, USA) and PClamp 10 software (Axon Instruments, CA, USA). Currents were recorded in ND96 solution containing (in mM): 96 NaCl, 2 KCl, 1.5 CaCl₂, 1MgCl₂, 5 HEPES, pH 7.4. For pH 5.5, 6.5 and 7.0, 5 mM HEPES was replaced by 5 mM MES. For pH 8.5, 5 mM HEPES was replaced by 5 mM Trizma Base. Currents were recorded in response to a voltage protocol consisting of 20 mV steps from –100 mV to +100 mV during 800 ms from a holding potential of –30 mV.

Whole-cell recordings. An EPC-10 amplifier, controlled by the PATCHMASTER software package (both from HEKA Electronics), was used to perform whole-cell patch-clamp (Hamill et al., 1981). Currents were recorded after filtering at 3 kHz and digitalization at 100 kHz sampling rate. To reduce series resistance voltage errors, capacitance cancelation and series resistance compensation were applied. Recordings for which the uncompensated error exceeded 5 mV were discarded. Patch pipettes with resistances between 1.2 and 1.8 MΩ were filled with a patch pipette solution containing (in mM): 110 NaCl, 5 MgCl₂, 5 EGTA and 10 HEPES (pH 7.4). The standard extracellular solution contained (in mM) 145 NaCl, 4 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, and 15 HEPES (pH 7.4).

Cell culture and transfection. HEK293T cells used for biochemistry were grown at 37°C and 5 % CO₂, in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Gibco, CA, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (Eurobio, France) and a penicillin/streptomycin mix (ThermoFischer, MA, USA) to a final concentration of 100 U/ml and 100 mg/ml, respectively. The cells were transiently transfected with 1 ug of pEGFP plasmid using X-tremeGENE 9 DNA transfection Reagent (Sigma Aldrich, MO, USA) according to the manufacturer's instructions.

HEK 293T cells used for electrophysiology and vesicular pH measurements were cultured in DMEM (Gibco, CA, USA) supplemented with 10% FBS (Biochrom AG, Germany), 2 mM L-glutamine and 50 units/ml penicillin/streptomycin (ThermoFischer, MA, USA). Cells were transfected using standard calcium phosphate precipitation method (Graham and van der Eb, 1973) using 10 µg of pRcCMV-ClC-5 DNA alone or in combination with 5 µg synapto-pHluorin2 plasmid.

Surface biotinylation of HEK293T cells. Forty-eight hours after transfection, cells were placed 30 minutes on ice and rinsed three times with a cold PBS solution pH 8.0 supplemented with 100 mM CaCl_2 and 1 mM MgCl_2 (PBS⁺⁺). Cells were then incubated at 4°C for 1 hour with 1.5 mg/ml biotin in cold PBS⁺⁺ pH 8.0. After 1 hour at 4°C in a quenching solution, cells were washed three times in ice cold PBS⁺⁺. When surface biotinylation was followed by western blotting analysis, the biotin and the quenching solutions contained the reducible Sulfo-NHS-SS-biotin (Pierce, IL, USA) and 0.1 % BSA in PBS⁺⁺, respectively. When surface biotinylation was followed by immunocytochemistry, the biotin and the quenching solutions contained the non-reducible Sulfo-NHS-LC-biotin (Pierce, IL, USA) and 100 mM Glycine in PBS⁺⁺ pH 8.0, respectively.

Total and surface protein isolation. Forty-eight hours after transfection, cells were incubated and scratched at 4°C in a lysis solution containing 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1 % NP-40, 0.2 % SDS pH 7.4 and a Complete EDTA Free protease inhibitor mix (Roche Diagnostics, France). Extracts turned 30 minutes at 4°C on a wheel to solubilize proteins and were then centrifuged at 5000 g during 10 minutes. Protein concentration in the resulting supernatant was quantified using the BCA Protein Assay quantification kit (Pierce, IL, USA). For protein extraction from surface-biotinylated HEK293T cells, lysis solution contained 50 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 30 mM NaF, 30 mM NaPPi, 1% Triton and 0.1% SDS and a Complete EDTA Free protease inhibitor mix (Roche Diagnostics, France). Protein extracts were subjected to centrifugation during 3 minutes at 15000 g.

Isolation of biotinylated protein was performed using 100 µg of fresh total protein extracts from surface-biotinylated HEK293T cells and NeutrAvidin–agarose beads (Pierce, IL, USA).

For each reaction, washed and dried beads from 110 µl of the provided 50 % slurry were diluted into 500 µl of a TLB solution containing (in mM): 50 Tris HCl, 100 NaCl, 5 EDTA and a Complete EDTA Free protease inhibitor mix (Roche Diagnostics, France) and mixed with biotinylated protein extract. After overnight agitation at 4°C, beads were centrifuged 2 minutes at 2500 g and were washed with TLB solution four times, to remove non-biotinylated protein in the supernatant. Finally, dried beads were incubated 10 minutes at 95°C with 50 µl of denaturing buffer, vortexed, centrifuged 2 minutes at 2500 g and 35 µl from supernatant of denatured surface proteins were loaded in a polyacrylamide gel well.

Western blot analysis. Twenty micrograms of total proteins or total surface protein extracts were separated on an 10% SDS-PAGE gel and transferred to nitrocellulose membranes. The blocking solution contained 5 % of non-fat milk proteins added in the washing buffer TBS + 0.2 % NP-40. Primary antibodies were monoclonal 3F10 rat anti-HA (Roche Diagnostics, France; 1:1500) and monoclonal A2228 mouse anti-β-Actine (Sigma Aldrich, MO, USA; 1:20000). Peroxidase-conjugated secondary antibodies were goat anti-rat antibody (Jackson ImmunoResearch, PA, USA; 1:10000) and sc-2005 goat anti-mouse (Santa Cruz; 1:10000). Antibodies were diluted in TBS blocking solution and incubated with membrane under constant agitation, overnight at 4°C or 1 hour at room temperature. Indirect protein detection was performed by chemiluminescence using the Pierce™ ECL Western Blotting Substrate (ThermoFischer, MA, USA). The protein signal was quantified using the ImageJ freeware (NIH, Bethesda, USA) and normalized on the β-actin signal (used as loading control).

Immunocytochemistry and confocal Imaging. Forty-eight hours after transfection on poly-L-lysine coated coverslips, HEK293T cells were washed with PBS, fixed in 4% paraformaldehyde and permeabilized with 0.1% Triton.

Nonspecific binding sites were blocked with a 10% goat serum solution, in which antibodies were then incubated with cells during 1 hour at room temperature. Primary antibodies were H3663 mouse anti-HA (Sigma Aldrich, MO, USA; 1:200), Ab2900 rabbit anti-EEA1 (Abcam, Cambridge, UK; 1:200) and secondary antibodies were 115-095 FITC-conjugated goat anti-mouse (Jackson ImmunoResearch, PA, USA; 1:250), A21428 AlexaFluor™555-conjugated goat anti-rabbit (ThermoFischer, MA, USA; 1:250). In the course of surface biotin labelling, cells were biotinylated as described above, extra biotin was removed and cells were washed prior to chemical fixation with PFA. At the end of immunocytochemistry, Cy5-conjugated Streptavidin (ThermoFischer, MA, USA; 1:200) was incubated with cells in the same time than A11059 rabbit anti-mouse AlexaFluor™488-conjugated antibody (Life Technologies; 1:200). Labeled cells were analyzed with a Zeiss LSM 710 confocal laser-scanning microscope.

Fluorescence measurements of intracellular pH. Measurements of intracellular pH in the whole-cell patch clamp configuration were described in detail elsewhere (Alekov and Fahlke, 2009). In brief, cells were loaded with 37.5 μ M 2',7'-bis(2-carboxyethyl)-5(and 6)-carboxyfluorescein (BCECF, Wako Chemicals) through the patch pipette. For these experiments, the proton buffering capacity of the intracellular patch-clamp solution (see above) was lowered by reducing its HEPES content to 0.25 mM. BCECF fluorescence was detected through an UPlanSApo 60x/NA1.35 oil immersion objective mounted on an Olympus IX-71 microscope. Sequential excitation at 490 and 440 nm was applied using a Polychrome V monochromator and the fluorescence was detected at 530 nm with a photodiode (both from Till Photonics). The resultant fluorescence ratio F490/F440 was converted to absolute pH by using a calibration curve, previously obtained *ex situ* (see description in (Alekov and Fahlke, 2009)).

Vesicular pH measurement and confocal Imaging. Ratiometric measurements of vesicular pH were performed as described previously (Alekov, 2015). In brief, WT or mutant ClC-5 were co-expressed with synapto-pHluorin2 in HEK293T cells. The fluorescence of an mCherry tag covalently linked to the C-terminus of the ClC transporter was used to identify vesicles containing ClC-5. Subsequently, the pH in these vesicles was determined ratiometrically using a dual wavelength excitation of the fluorescent pHluorin2 construct containing a covalently linked fused synapto-pHluorin2. Images were acquired 24-48 h after transfection on a Carl-Zeiss LSM 780 inverted microscope using a 40x water immersion objective. The pHluorin2 and mCherry fluorophores were excited at 405/488 and 561 nm and emission was detected at 500-550 and 560-650 nm, respectively. Live cell imaging was performed in PBS containing Ca^{2+} and Mg^{2+} (Gibco, CA, USA) at room temperature (22–24°C). A calibration curve was constructed to convert the ratio of the pHluorin2 fluorescence as excited with 405 and 488 nm in absolute pH. To this end, cells were bathed in potassium-based solutions with different pHs supplemented with 10 μM nigericin. The analysis of the calibration data was performed using Carl Zeiss Zen lite 2011 (Blue edition) software. Particle detection was performed using the MatLab (MathWorks) adaptation by Blair and Dufresne of the original Crocker and Grier algorithm (Crocker and Grier, 1996). The code was incorporated into house-written MatLab script (Alekov, 2015) that carried out automatic background subtraction, segmentation ratiometric analyses of the identified vesicular regions. Images were assembled for figure visualization with IMAGEJ (Rasband, n.d.).

Statistics. Results are given as means $\pm$ SEM for the indicated n number of experiments. A significance difference between means was considered when a P value < 0.05 was obtained after running a bilateral Student's *t* test.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Prof. T. J. Jentsch for kindly providing the HA-tagged ClC-5, C. Klein for excellent technical assistance in confocal microscopy, G. Planelles and N. Bakouh for support and help with oocytes. We also thank Marc Ambrosini and Yohan Legueux-Cajgfinger for their contributions during their graduate studies at Université Pierre et Marie Curie. This work was supported by a grant from the Fondation du Rein. Y. Bignon holds a fellowship from the French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

STATEMENT OF COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare that there is no conflict of interest

REFERENCES

- Accardi, A., and Miller, C. (2004). Secondary active transport mediated by a prokaryotic homologue of ClC Cl⁻ channels. *Nature* 427, 803–807.
- Alekov, A.K. (2015). Mutations associated with Dent's disease affect gating and voltage dependence of the human anion/proton exchanger ClC-5. *Front Physiol* 6, 159.
- Alekov, A.K., and Fahlke, C. (2009). Channel-like slippage modes in the human anion/proton exchanger ClC-4. *J. Gen. Physiol.* 133, 485–496.
- Brailoiu, G.C., and Brailoiu, E. (2016). Modulation of Calcium Entry by the Endo-lysosomal System. *Adv. Exp. Med. Biol.* 898, 423–447.
- Crocker, J.C., and Grier, D.G. (1996). Methods of digital video microscopy for colloidal studies. *J Colloid Interface* 179, 298–310.
- D'Antonio, C., Molinski, S., Ahmadi, S., Huan, L.J., Wellhauser, L., and Bear, C.E. (2013). Conformational defects underlie proteasomal degradation of Dent's disease-causing mutants of ClC-5. *Biochem J* 452, 391–400.
- Devuyst, O., and Luciani, A. (2015). Chloride transporters and receptor-mediated endocytosis in the renal proximal tubule. *J Physiol* 593, 4151–4164.
- Devuyst, O., Christie, P.T., Courtoy, P.J., Beauwens, R., and Thakker, R.V. (1999). Intra-renal and subcellular distribution of the human chloride channel, CLC-5, reveals a pathophysiological basis for Dent's disease. *Hum Mol Genet* 8, 247–257.
- Dutzler, R., Campbell, E.B., Cadene, M., Chait, B.T., and MacKinnon, R. (2002). X-ray structure of a ClC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity. *Nature* 415, 287–294.
- Dutzler, R., Campbell, E.B., and MacKinnon, R. (2003). Gating the selectivity filter in ClC chloride channels. *Science* 300, 108–112.
- Feng, L., Campbell, E.B., Hsiung, Y., and MacKinnon, R. (2010). Structure of a eukaryotic CLC transporter defines an intermediate state in the transport cycle. *Science* 330, 635–641.
- Friedrich, T., Breiderhoff, T., and Jentsch, T.J. (1999). Mutational analysis demonstrates that ClC-4 and ClC-5 directly mediate plasma membrane currents. *J Biol Chem* 274, 896–902.
- Gorvin, C.M., Wilmer, M.J., Piret, S.E., Harding, B., van den Heuvel, L.P., Wrong, O., Jat, P.S., Lippiat, J.D., Levchenko, E.N., and Thakker, R.V. (2013). Receptor-mediated endocytosis and endosomal acidification is impaired in proximal tubule epithelial cells of Dent disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 7014–7019.
- Graham, F.L., and van der Eb, A.J. (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52, 456–467.
- Grand, T., Mordasini, D., L'Hoste, S., Pennaforte, T., Genete, M., Biyeyeme, M.J., Vargas-Poussou, R., Blanchard, A., Teulon, J., and Lourdel, S. (2009). Novel CLCN5 mutations in patients with Dent's disease result in altered ion currents or impaired exchanger processing. *Kidney Int* 76, 999–1005.
- Grand, T., L'Hoste, S., Mordasini, D., Defontaine, N., Keck, M., Pennaforte, T., Genete, M., Laghmani, K., Teulon, J., and Lourdel, S. (2011). Heterogeneity in the processing of CLCN5 mutants related to Dent disease. *Hum Mutat* 32, 476–483.
- Grieschat, M., and Alekov, A.K. (2012). Glutamate 268 Regulates Transport Probability of the Anion/Proton Exchanger ClC-5. *J. Biol. Chem.* 287, 8101–8109.
- Grieschat, M., and Alekov, A.K. (2014). Multiple discrete transitions underlie voltage-dependent activation in ClC Cl⁻/H⁺ antiporters. *Biophys. J.* 107, L13–15.
- Grimm, C., Butz, E., Chen, C.-C., Wahl-Schott, C., and Biel, M. (2017). From mucopolidosis type IV to Ebola: TRPML and two-pore channels at the crossroads of endo-lysosomal trafficking and disease. *Cell Calcium*.

- Gunther, W., Luchow, A., Cluzeaud, F., Vandewalle, A., and Jentsch, T.J. (1998). ClC-5, the chloride channel mutated in Dent's disease, colocalizes with the proton pump in endocytotically active kidney cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 8075–8080.
- Gunther, W., Piwon, N., and Jentsch, T.J. (2003). The ClC-5 chloride channel knock-out mouse - an animal model for Dent's disease. *Pflügers Arch* 445, 456–462.
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., and Sigworth, F.J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch* 391, 85–100.
- Hoopes, R.R., Jr., Shrimpton, A.E., Knohl, S.J., Hueber, P., Hoppe, B., Matyus, J., Simckes, A., Tasic, V., Toenshoff, B., Suchy, S.F., et al. (2005). Dent Disease with mutations in OCRL1. *Am J Hum Genet* 76, 260–267.
- Hryciw, D.H., Ekberg, J., Ferguson, C., Lee, A., Wang, D., Parton, R.G., Pollock, C.A., Yun, C.C., and Poronnik, P. (2006). Regulation of albumin endocytosis by PSD95/Dlg/ZO-1 (PDZ) scaffolds. Interaction of Na⁺-H⁺ exchange regulatory factor-2 with ClC-5. *J Biol Chem* 281, 16068–16077.
- Hryciw, D.H., Kruger, W.A., Briffa, J.F., Slattery, C., Bolithon, A., Lee, A., and Poronnik, P. (2012a). Sgk-1 is a positive regulator of constitutive albumin uptake in renal proximal tubule cells. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 30, 1215–1226.
- Hryciw, D.H., Jenkin, K.A., Simcocks, A.C., Grinfeld, E., McAinch, A.J., and Poronnik, P. (2012b). The interaction between megalin and ClC-5 is scaffolded by the Na⁺-H⁺ exchanger regulatory factor 2 (NHERF2) in proximal tubule cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44, 815–823.
- Jentsch, T.J. (2015). Discovery of CLC transport proteins: cloning, structure, function and pathophysiology. *J. Physiol.*
- Lloyd, S.E., Pearce, S.H., Gunther, W., Kawaguchi, H., Igarashi, T., Jentsch, T.J., and Thakker, R.V. (1997). Idiopathic low molecular weight proteinuria associated with hypercalciuric nephrocalcinosis in Japanese children is due to mutations of the renal chloride channel (CLCN5). *J Clin Invest* 99, 967–974.
- Lourdel, S., Grand, T., Burgos, J., Gonzalez, W., Sepulveda, F.V., and Teulon, J. (2012). ClC-5 mutations associated with Dent's disease: a major role of the dimer interface. *Pflügers Arch* 463, 247–256.
- Ludwig, M., Doroszewicz, J., Seyberth, H.W., Bokenkamp, A., Balluch, B., Nuutinen, M., Utsch, B., and Waldegger, S. (2005). Functional evaluation of Dent's disease-causing mutations: implications for ClC-5 channel trafficking and internalization. *Hum Genet* 117, 228–237.
- Mahon, M.J. (2011). pHluorin2: an enhanced, ratiometric, pH-sensitive green fluorescent protein. *Adv. Biosci. Biotechnol. Print* 2, 132–137.
- Mansour-Hendili, L., Blanchard, A., Le Pottier, N., Roncelin, I., Lourdel, S., Treard, C., Gonzalez, W., Vergara-Jaque, A., Morin, G., Colin, E., et al. (2015). Mutation Update of the CLCN5 Gene Responsible for Dent Disease 1. *Hum Mutat* 36, 743–752.
- Matsuda, J.J., Filali, M.S., Collins, M.M., Volk, K.A., and Lamb, F.S. (2010). The ClC-3 Cl⁻/H⁺ antiporter becomes uncoupled at low extracellular pH. *J Biol Chem* 285, 2569–2579.
- Miesenböck, G., De Angelis, D.A., and Rothman, J.E. (1998). Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature* 394, 192–195.
- Neagoe, I., Stauber, T., Fidzinski, P., Bergsdorf, E.Y., and Jentsch, T.J. (2010). The late endosomal ClC-6 mediates proton/chloride countertransport in heterologous plasma membrane expression. *J Biol Chem* 285, 21689–21697.
- Novarino, G., Weinert, S., Rickheit, G., and Jentsch, T.J. (2010). Endosomal chloride-proton exchange rather than chloride conductance is crucial for renal endocytosis. *Science* 328, 1398–1401.

- Piccolo, A., and Pusch, M. (2005). Chloride/proton antiporter activity of mammalian CLC proteins CLC-4 and CLC-5. *Nature* 436, 420–423.
- Piwon, N., Gunther, W., Schwake, M., Bosl, M.R., and Jentsch, T.J. (2000). CLC-5 Cl⁻-channel disruption impairs endocytosis in a mouse model for Dent's disease. *Nature* 408, 369–373.
- Rasband, W.S. (n.d.). ImageJ US Natl Inst Health.
- Reed, A.A., Loh, N.Y., Terryn, S., Lippiat, J.D., Partridge, C., Galvanovskis, J., Williams, S.E., Jouret, F., Wu, F.T., Courtoy, P.J., et al. (2010). CLC-5 and KIF3B interact to facilitate CLC-5 plasma membrane expression, endocytosis, and microtubular transport: relevance to pathophysiology of Dent's disease. *Am J Physiol Ren. Physiol* 298, F365-80.
- Sakamoto, H., Sado, Y., Naito, I., Kwon, T.H., Inoue, S., Endo, K., Kawasaki, M., Uchida, S., Nielsen, S., Sasaki, S., et al. (1999). Cellular and subcellular immunolocalization of CLC-5 channel in mouse kidney: colocalization with H⁺-ATPase. *Am J Physiol* 277, F957-65.
- Satoh, N., Yamada, H., Yamazaki, O., Suzuki, M., Nakamura, M., Suzuki, A., Ashida, A., Yamamoto, D., Kaku, Y., Sekine, T., et al. (2016). A pure chloride channel mutant of CLC-5 causes Dent's disease via insufficient V-ATPase activation. *Pflugers Arch.* 468, 1183–1196.
- Scheel, O., Zdebik, A.A., Lourdel, S., and Jentsch, T.J. (2005). Voltage-dependent electrogenic chloride/proton exchange by endosomal CLC proteins. *Nature* 436, 424–427.
- Scott, C.C., and Gruenberg, J. (2011). Ion flux and the function of endosomes and lysosomes: pH is just the start: the flux of ions across endosomal membranes influences endosome function not only through regulation of the luminal pH. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 33, 103–110.
- Smith, A.J., and Lippiat, J.D. (2010). Direct endosomal acidification by the outwardly rectifying CLC-5 Cl⁽⁻⁾/H⁽⁺⁾ exchanger. *J. Physiol.* 588, 2033–2045.
- Smith, A.J., Reed, A.A., Loh, N.Y., Thakker, R.V., and Lippiat, J.D. (2009). Characterization of Dent's disease mutations of CLC-5 reveals a correlation between functional and cell biological consequences and protein structure. *Am J Physiol Ren. Physiol* 296, F390-7.
- Stauber, T., and Jentsch, T.J. (2013). Chloride in vesicular trafficking and function. *Annu. Rev. Physiol.* 75, 453–477.
- Steinmeyer, K., Schwappach, B., Bens, M., Vandewalle, A., and Jentsch, T.J. (1995). Cloning and functional expression of rat CLC-5, a chloride channel related to kidney disease. *J Biol Chem* 270, 31172–31177.
- Suzuki, T., Rai, T., Hayama, A., Sohara, E., Suda, S., Itoh, T., Sasaki, S., and Uchida, S. (2006). Intracellular localization of CLC chloride channels and their ability to form hetero-oligomers. *J Cell Physiol* 206, 792–798.
- Tang, X., Brown, M.R., Cogal, A.G., Gauvin, D., Harris, P.C., Lieske, J.C., Romero, M.F., and Chang, M.-H. (2016). Functional and transport analyses of CLCN5 genetic changes identified in Dent disease patients. *Physiol. Rep.* 4.
- Wang, Y., Cai, H., Cebotaru, L., Hryciw, D.H., Weinman, E.J., Donowitz, M., Guggino, S.E., and Guggino, W.B. (2005). CLC-5: role in endocytosis in the proximal tubule. *Am J Physiol Ren. Physiol* 289, F850-62.
- Weinert, S., Jabs, S., Supanchart, C., Schweizer, M., Gimber, N., Richter, M., Rademann, J., Stauber, T., Kornak, U., and Jentsch, T.J. (2010). Lysosomal pathology and osteopetrosis upon loss of H⁺-driven lysosomal Cl⁻ accumulation. *Science* 328, 1401–1403.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Functional characterization of WT ClC-5 and E211G mutant in *X. laevis* oocytes. (A) Representative voltage-clamp recordings obtained from oocytes expressing WT and E211G ClC-5, and from noninjected oocytes in ND96 solution. (B) Steady-state current-voltage relationships obtained under the same conditions as described in A. Each data point represents the mean $\pm$ SEM for at least 8 oocytes from three different batches (WT, $n = 19$; E211G, $n = 17$; NI, $n = 8$). (C) Currents/cell surface expression relationship for WT ClC-5 and E211G mutant in *X. laevis* oocytes. Currents at +100 mV are from the same data as in panel A. For cell surface expression, the values (measured in RLU: Relative Light Units) were normalized to those of WT ClC-5 in the same batch of oocytes. Each column represents the mean $\pm$ SEM for at least 8 oocytes for current recordings, and at least 40 oocytes from three different batches of oocytes for the surface expression. (D) Extracellular pH dependence obtained from *X. laevis* expressing WT and E211G ClC-5 in ND96 solution at pH 5.5, 6.5, 7.0, 7.4 and 8.5. Currents at +100 mV were normalized for individual oocytes in the same batch of oocytes to the current at +100 mV in ND96 solution at pH 7.4. WT, oocytes injected with wild-type ClC-5; NI, noninjected oocytes. *, $P < 0.001$ is the difference between WT or E211G ClC-5 versus NI. #, $P < 0.001$ is the difference between NI or E211G ClC-5 versus WT ClC-5. WT, oocytes injected with wild-type ClC-5; NI, noninjected oocytes.

Figure 2. Subcellular localization of WT ClC-5 and E211G mutant in HEK293T transfected cells. ClC-5 expression was detected by green fluorescence. Plasma membrane and early endosomes were stained by biotin and Early Endosome Antigen 1 marker (EEA1), and were detected by red fluorescence. The yellow fluorescence indicates the overlap of ClC-5 and the organelles. Scale bars, 8 μ m. WT, wild-type.

Figure 3. Cell surface biotinylation and western-blot analysis of WT ClC-5 and E211G mutant in HEK293T transfected cells. (A) Results are shown as western blot analysis of the surface biotinylated protein fraction (S) or total cell lysates (T). The right panel shows densitometric analysis of total and cell surface ClC-5 as normalized expression to WT ClC-5. Each column represents the mean $\pm$ SEM from four experiments. Mock, HEK293T cells not transfected with the expression vector; WT and E211G refer to HEK293T cells transfected with WT or mutant ClC-5. (B) Total cell lysates were isolated from HEK293T cells 48 h after transfection with ClC-5. Actin was used as the loading marker of the samples. The right panel shows semi-quantification of the blots by densitometry analysis. Protein expression was normalized to those of WT ClC-5. Each column represents the mean $\pm$ SEM from three experiments.

Figure 4. Measurement of proton flux of WT ClC-5 and E211G mutant in HEK293T transfected cells. (A) Representative whole-cell recording and (B) current-voltage relationship obtained from HEK293T cells expressing E211G ($n = 7$) or E211Q ClC-5 ($n = 10$). Data are presented as mean $\pm$ SEM. (C) Representative intracellular pH changes recorded at different voltages in a HEK293T transfected cells expressing WT or E211G ClC-5 using BCECF fluorimetry. Lines represent linear fits to the data and were used to provide the rates of intracellular pH changes $\Delta pH/\Delta t$. The insets depict the macroscopic whole cell currents measured in the same cells. (D) Averaged rates of intracellular pH changes as function of clamp voltage. The red line represents the scaled current-voltage relationship of WT ClC-5. Each data point represents the mean $\pm$ SEM from 5 different cells.

Figure 5. Effects of WT and E211G ClC-5 on endosomal acidification in HEK293T transfected cells. (A) Representative confocal images as used for determining intracellular pH. The large image represents the overlay of mCherry ClC-5 (red fluorescence) and synapto-pHluorin2 (green fluorescence). Scale bars, 10 μ m. (B) Illustration of the particle identification used to select individual vesicular regions in the red channel (ClC-5 containing endosomes) and used to measure the fluorescence intensities in both pHluorin2 channels. The identified particles are overlaid as circles on the red channel of the cells depicted in A. (C) Endosomal pH measured from cells transfected with pHluorin2 (Mock, $n = 55$) or with ClC-5 (WT, $n = 30$; E211G, $n = 41$).

Supplemental Figure 1. Properties of the different amino acids substituted at position 211 compared to those of glutamic acid in wild-type ClC-5.

TABLES

	E211G Patient					Mother
Age (years)	1,5	1,9	2,4	4,3	5,75	28
Weight	-	10.3	11.3	13.4	13.5	-
Height	-	82.4	86.5	100	110	-
Plasma concentrations						
Sodium (133-146 mmol/L)	124	136	137	132	135	138
Potassium (3,5-5 mmol/L)	2.0	3.3	3.2	2.7	3.0	3.9
Chloride (90-117 mmol/L)	82	99	97	82	88	106
CO ₂ t (18-25mmol/L)	22	27	26	25	23	-
Calcium (2.2-2.6 mmol/L)	-	2.48	2.61	2.39	2.41	-
Phosphate (1-5 yr 1.45-2.10 ; Adult 0.85-1.50 mmol/L)	0.9	1.58	1.62	-	-	-
Magnesium (0.75-1 mmol/L)	-	0.86	0.77	-	-	-
Proteins (1-15 yr: 56-75; Adult: 64-83 g/L)	76	70	76	73	76	77
Albumin (1-15 yr: 30-42; Adult: 35-50 g/L)	-	46	-	-	-	-
Urea (1-15 yr:1.6-6.5; Adult: 2.5-87.5 mmol/L)	9.6	5.9	8.3	-	-	4.6
Creatinine **	46	34	35	61	65	59
Uric Acid (1-15 yr: 120-320; Adult: 150-400 mmol/L)	-	181	173	-	-	271
Glucose (4.1-5.9 mmol/L)	-	4.9	7.8	-	4.1	5.2
PTH (10-46 ng/L)	-	32	24	-	-	-
25 Vitamin D (30-80 µg/L)	-	22	-	-	-	-
1-25 Vitamin D (10-110ng/L)	-	64	-	-	-	-
Renin (8-180 UI/L)	-	470	-	-	-	19.3 ^a
Aldosterone (70-800 pg/ml)	-	240	-	-	-	-
Urine						
FE Sodium (< 1%)	-	0.26	0.37	-	-	0.78
FE Potassium (9-23%)	-	25	23	-	-	13.5
FE Uric acid (children: 15-22%; females 10-14%)	-	18.1	14.9	-	-	7.4
FE Magnesium (1.5-3.5%)	-	5.9	5.2	-	-	-
TRP (%)	-	89.3	86.2	-	-	-
Calcium/creatinine (mmol/mmol*)	-	1.65	1.32	-	-	0.44
Osmolality (mOsm./Kg H ₂ O)	-	309	242	-	-	725
Aminoacids/creatinine (µmol/mmol)	-	2267	-	-	-	725
Glucose (0.3-1.1 mmol/L)	-	<0.3	<0.3	-	-	<0.3
Protein g/L	-	1,2	0.98	-	-	0.08
Albumin (<3 mg/L)	-	210	195	-	-	<6
Alpha-1-microglobuline (mg/L)	-	196	-	-	-	<4

Table 1. Clinical characteristics of the patient with Dent's disease 1 carrying the E211G mutation.

*Reference values (CI 95%) for U Ca/creatinine ratio (mM/mM): 1–2 yr, 0.07–1.50; 2–3 yr, 0.06–1.40; 3–5 yr, 0.05–1.10; 5–7 yr, 0.04–0.80; 7–18 yr, 0.04–0.70; 18–70 yr, 0.04–0.70. **Reference values for creatinine (µmol/L); 1-3 yr 21-36; 3-5 yr: 27-42; 5-7 yr: 28-52; Adult Woman: 44-80^a plasma renin concentration (normal range for adult: 10–50 mIU/L).

FIGURES

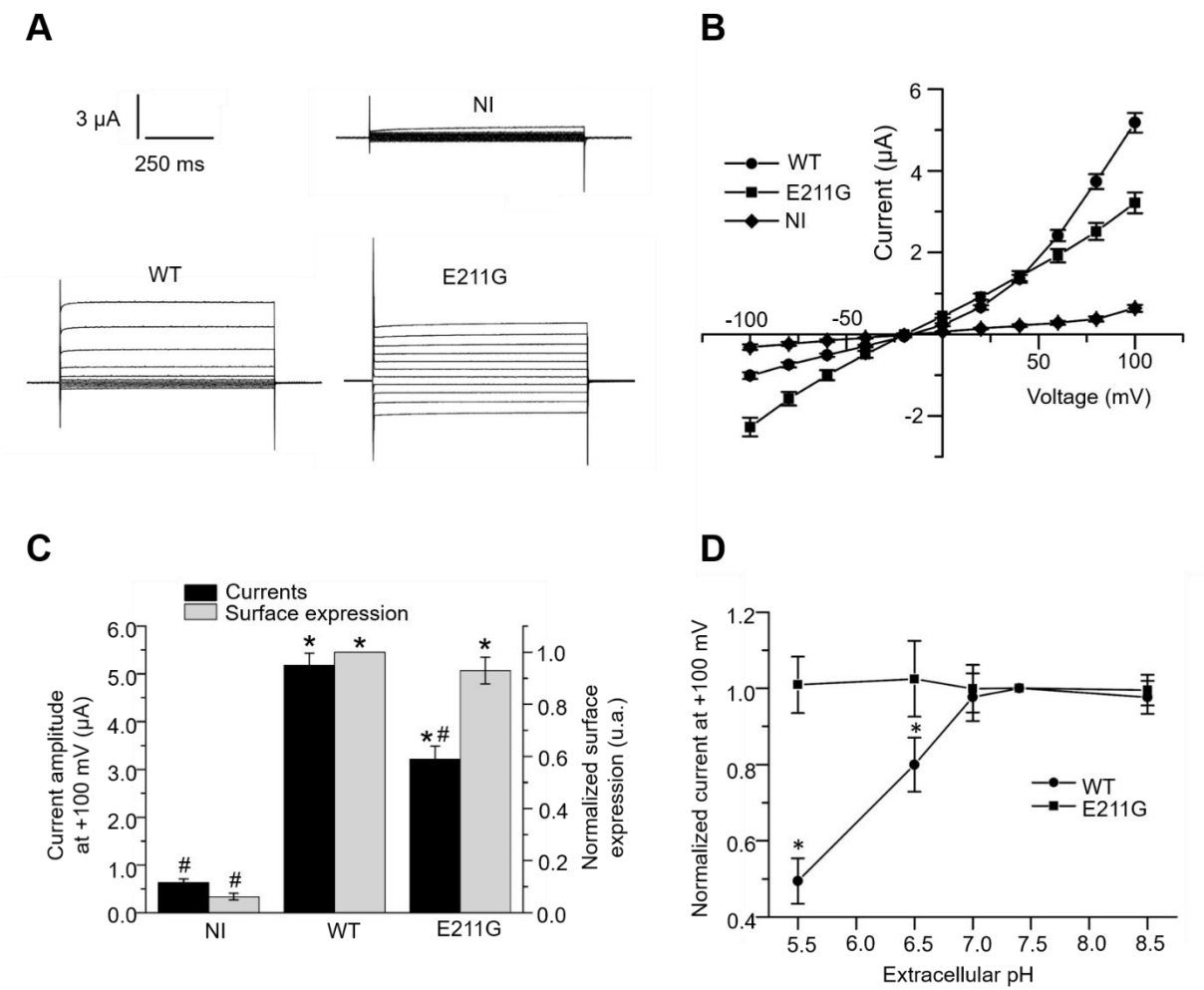


Figure 1

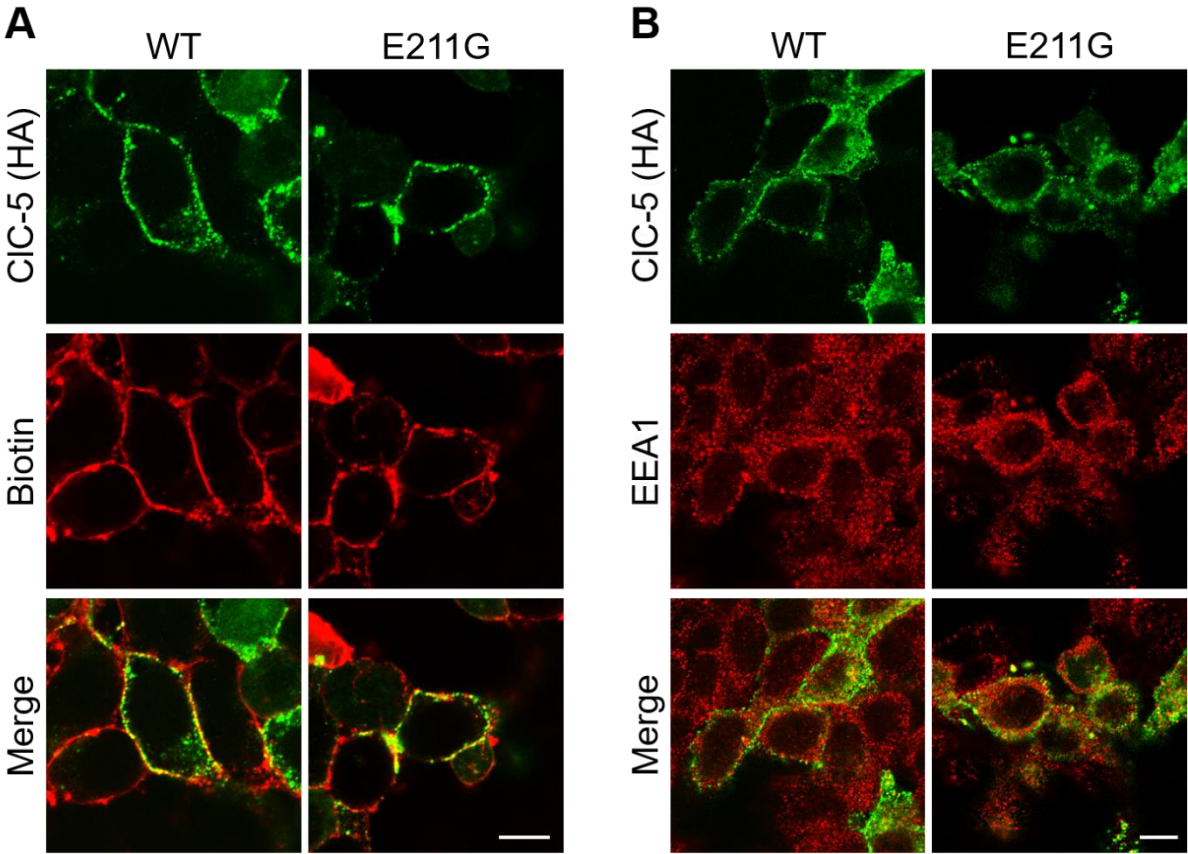


Figure 2

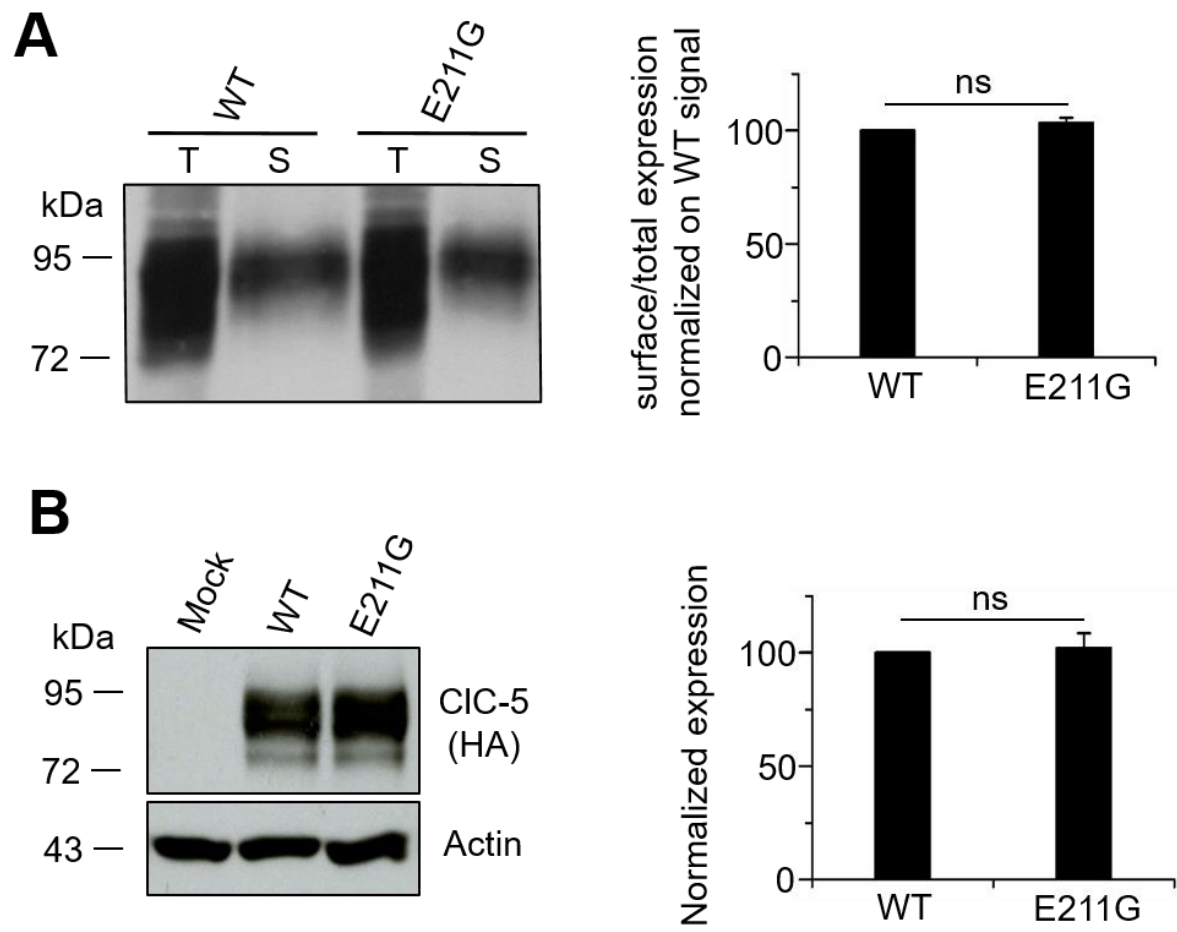


Figure 3

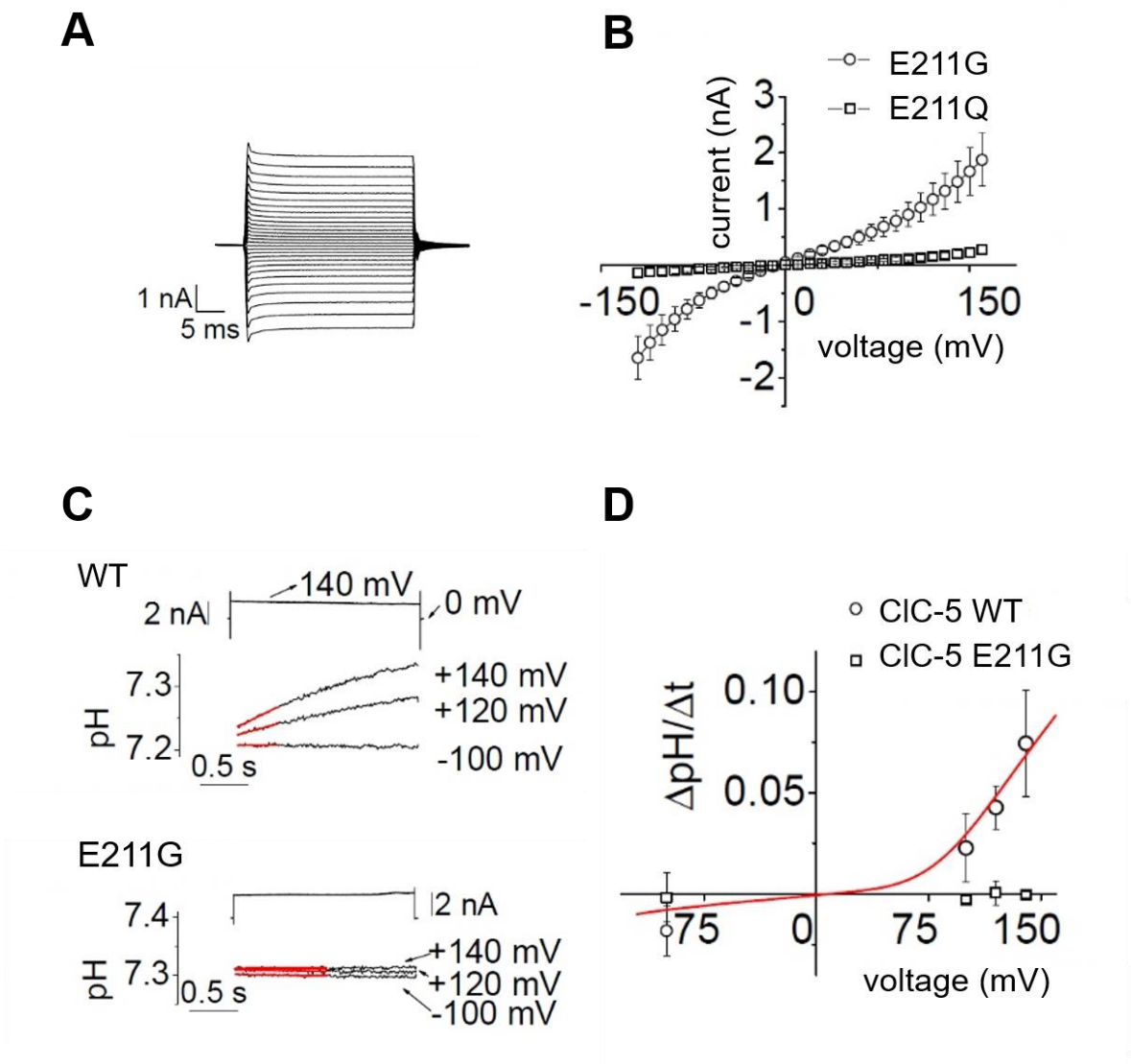


Figure 4

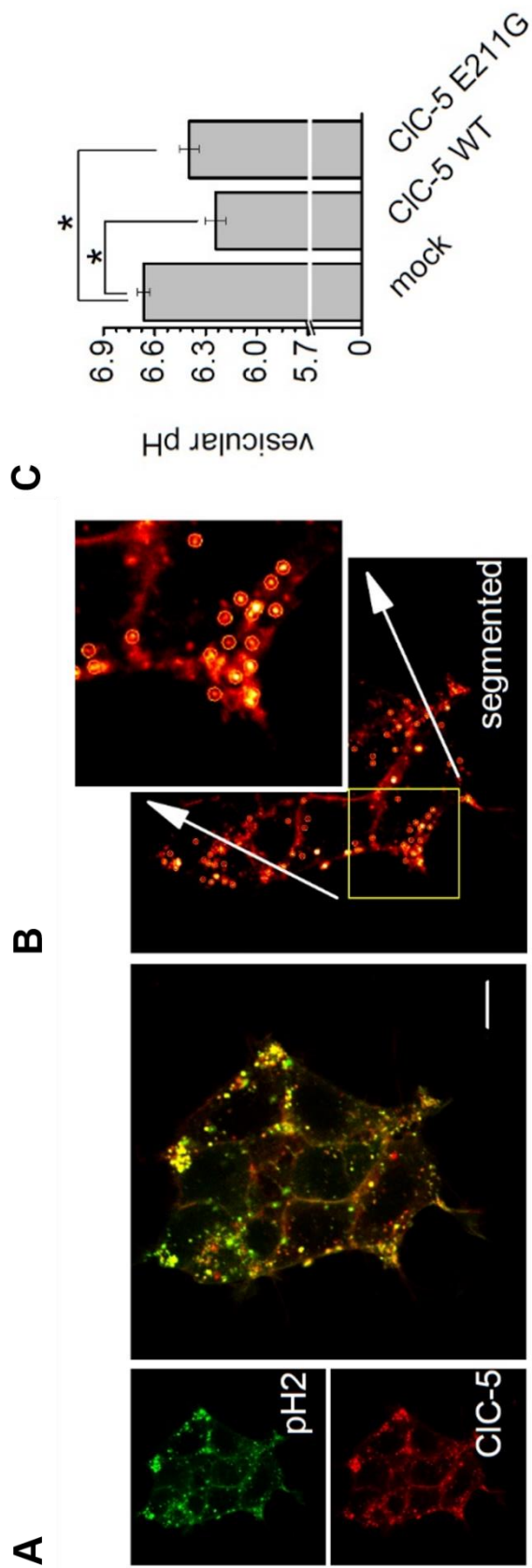
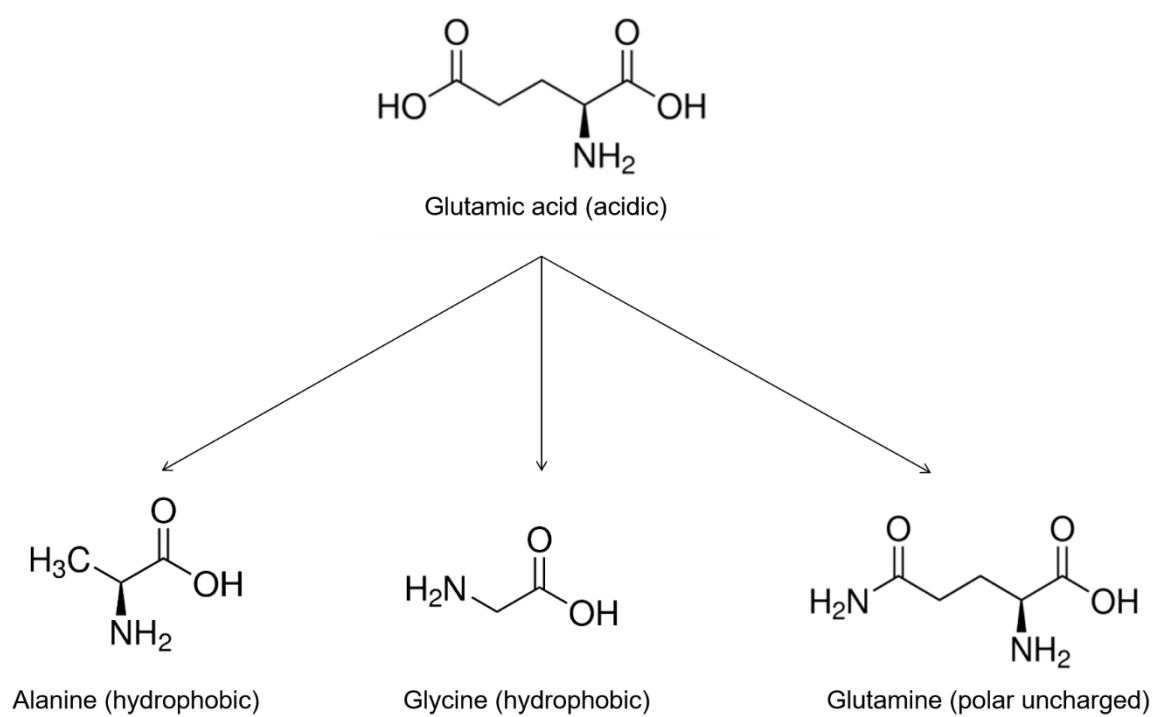


Figure 5

**Sup. Figure 1**

II. Résumé de l'article n°2

1. Description d'un patient Dent porteur d'une mutation E211G de CLC-5

Alors que les mutations artificielles du *gating glutamate* (G_{Glu}) de CLC-5 ne portaient jusque-là qu'un intérêt fondamental de compréhension de la relation structure-fonction de l'échangeur (voir Section Introduction C.II.3.b), le service de Génétique Humaine de l'Hôpital Européen Georges Pompidou a diagnostiqué en 2013 chez un très jeune garçon une MD de type 1 causée par la mutation de ce glutamate. Après séquençage des exons et des jonctions intron-exon de son gène *CLCN5*, il s'est avéré que ce patient était porteur d'une mutation ponctuelle de l'exon 6 remplaçant son G_{Glu} par une glycine (E211G).

Le phénotype de ce patient ne dénote pas de celui des autres patients Dent en cela qu'il ne développe pas de symptômes inattendus. Cependant, sa maladie s'est manifestée tôt dans l'enfance et le diagnostic génétique fut précoce pour un patient Dent. En effet, dès le 4^{ème} mois de vie, ce patient montrait les signes d'un retard de croissance. Lorsqu'il a eu 1 an et demi, un épisode de déshydratation sévère nécessitant son hospitalisation d'urgence a alerté le corps médical. Cette déshydratation était accompagnée d'une hyponatrémie, d'une hypokaliémie et d'une hypophosphatémie. Une 2^{nde} hospitalisation 4 mois plus tard a mis en évidence le retard de croissance du patient, associé aux mêmes anomalies électrolytiques que précédemment. L'analyse de l'urine du patient a montré la présence d'un syndrome de Fanconi (voir Section Introduction A.II.5.a). Ce syndrome s'est présenté par une fuite urinaire de NaCl et d'ions Mg^{2+} , une forte hypercalciurie, une aminoacidurie et une PiBPM (notamment une excrétion urinaire d'albumine et d' α -1 microglobuline). Les épisodes de déshydrations du patient et l'élévation de sa concentration plasmatique en rénine suggèrent une polyurie accompagnée d'un hyperaldostéronisme secondaire. En parallèle, les concentrations plasmatiques en PTH, en 1,25-OH vitD et la densité osseuse du patient sont normales, alors que sa concentration plasmatique en 25-OH vitD est basse [voir Tableau 1 dans l'article].

La cystinose étant une cause fréquente de syndrome de Fanconi, elle fut un temps considérée, avant d'être écartée. Les mesures effectuées à cet égard permettent d'exclure la présence d'anomalies visuelles chez le patient. Cependant, la MD diagnostiquée chez le patient porteur de la mutation E211G évolue rapidement : en l'absence de néphrocalcinose, son DFG estimé était de 78 ml/min à 1.5 an et de 55 ml/min à 5 ans (insuffisance rénale de stade 3a).

2. La mutation E211G n'altère ni l'expression ni l'adressage de ClC-5

Une fois communiquée au laboratoire, nous avons entrepris d'analyser *in vitro* la fonctionnalité de la mutation E211G. Pour cela, nous avons reproduit le mutant par mutagenèse dirigée au sein de plasmides contenant la séquence codante du ClC-5 humain, puis nous avons utilisé ces plasmides pour exprimer transitoirement la forme sauvage (WT) ou mutée de ClC-5 dans des ovocytes de Xénope et les cellules de la lignée humaine d'origine rénale HEK293T (voir Section Matériel et Méthodes n°2 I et II).

Dans un premier temps nous avons comparé l'expression et la N-glycosylation du mutant à ceux de la protéine WT par Western blot de lysats protéiques de cellules HEK293T. Comme précédemment observé (Grand *et al.*, 2011), le ClC-5 est visualisé en une bande de 75 kDa correspondant à une forme *core-glycosylée* présente dans le RE et sous une forme de 80-90 kDa *glycosylée complexe* présente à la membrane plasmique et aux endosomes précoces (voir Section Introduction B.I.2.c). Durant notre étude, nous n'avons vu aucune différence quantitative ou qualitative entre le ClC-5 WT et le mutant E211G dans les cellules HEK293T [voir Figure 3B dans l'article]. Le mutant E211G est correctement exprimé, stable et mature.

Par la suite, nous avons évalué la capacité du mutant E211G à atteindre la membrane plasmique et les endosomes précoces où il est susceptible de porter une fonction de transport ionique. Dans un premier temps, l'insertion du ClC-5 à la surface cellulaire fut évaluée *via* la luminescence générée par des ovocytes de Xénope exprimant un ClC-5 porteur d'une étiquette HA extracellulaire couplée à une enzyme HRP (voir Section Matériel et Méthodes n°2 III.1). Dans ces conditions, la luminescence de surface des ovocytes exprimant les ClC-5 WT ou E211G est équivalente [voir Figure 1C dans l'article]. Dans un second temps, l'adressage subcellulaire du mutant de ClC-5 a été examiné dans les cellules HEK293T par biotinylation des protéines de surface suivie de Western blot ou d'immunofluorescence indirecte (voir Section Matériel et Méthodes n°2 III.2). Nous avons observé par microscopie confocale que le ClC-5 WT et le mutant E211G sont co-localisés avec les protéines membranaires biotinylées et le marqueur EEA1 des endosomes précoces [voir Figure 2 dans l'article]. De plus, la fraction du ClC-5 total présente à la membrane plasmique est équivalente que la protéine soit WT ou mutée [voir Figure 3A dans l'article]. Le mutant E211G de ClC-5 présente donc un adressage quantitativement et qualitativement similaire à celui du ClC-5 WT.

3. La mutation E211G convertit l'échangeur ClC-5 en canal chlorure

La mutation pathogène étudiée étant située sur le G_{Glu} de l'échangeur et ne provoquant l'altération ni de l'expression ni de l'adressage de ClC-5, nous nous sommes intéressés aux propriétés conductrices du mutant E211G. Exprimé dans l'ovocyte de Xénope, le mutant produit des courants en réponse à l'imposition par voltage-clamp en double microélectrodes de différences de potentiels transmembranaires (voir Section Matériel et Méthodes n°2 IV.1). Cependant, alors que le ClC-5 WT est fortement rectifiant entrant, la relation courant-voltage du E211G est quasiment linéaire. À un potentiel imposé de +100 mV, les courants générés par le mutant sont inférieurs de 38 % à ceux générés par le ClC-5 WT, alors qu'ils sont supérieurs lorsque les potentiels imposés sont négatifs [voir Figures 1A et 1B dans l'article]. Par ailleurs, alors que le ClC-5 WT est inhibé par les protons extracellulaires, le mutant E211G y est insensible [voir Figure 1D dans l'article]. Ces deux propriétés sont clairement liées aux phénomènes de protonation/déprotonation de la chaîne latérale du G_{Glu} du ClC-5 WT, mais les mécanismes à l'origine de leur présence ne sont pas clairement définis (voir Section Introduction C.II.3.c).

Les altérations électriques observées dans l'ovocyte de Xénope semblent difficilement conciliables avec une perte de fonctionnalité de l'échangeur ClC-5. Toutefois, elles sont similaires à celles observées *in vitro* pour le mutant artificiel E211A qui découple le transport des ions H⁺ et Cl⁻ du ClC-5 (voir Section Introduction C.II.3.c) (Picollo & Pusch, 2005; Scheel *et al.*, 2005). C'est pourquoi, par collaboration avec le Dr. Alexi Alekov de l'Institut de neurophysiologie d'Hanovre en Allemagne, nous avons entrepris d'évaluer la capacité de transport des ions H⁺ du mutant E211G. Les mesures ont été réalisées sur des cellules HEK293T exprimant un ClC-5 activé *via* l'imposition de voltages positifs par patch-clamp en configuration cellule entière. Théoriquement, il en résulte une alcalinisation du milieu intracellulaire provoquée par l'activité de transport de protons de ClC-5: celle-ci est mesurée à l'aide du BCECF, agent fluorescent dont le spectre d'émission dépend du pH (voir Section Matériel et Méthodes n°2 IV.II). Les résultats obtenus montrent que, contrairement au ClC-5 WT dont les courants provoquent une alcalinisation intracellulaire proportionnelle, les courants produits par le mutant E211G ne modifient pas le pH intracellulaire [voir Figures 4C et 4D dans l'article]. Ces courants sont pourtant d'intensité comparable à ceux du ClC-5 WT, au contraire d'un mutant E211Q récemment analysé (Sato *et al.*, 2016) [voir Figures 4A et 4B dans l'article]. Ce résultat démontre que le mutant pathogène E211G est un canal chlorure.

4. Le mutant E211G de ClC-5 permet l'acidification endosomale

L'échangeur ClC-5 est nécessaire à l'acidification des endosomes précoces le long de la voie endo-lysosomale et leur défaut d'acidification est souvent considéré comme étant à l'origine de la MD (Pusch & Zifarelli, 2015). Toutefois, le sens de fonctionnement de l'échangeur dans l'endosome est toujours débattu. La sortie de protons dans le sens de leur gradient électrochimique *via* ClC-5, couplée à une accumulation d'ions chlorure dans les vésicules est une hypothèse contre-intuitive envisagée (Jentsch, 2015). En effet, une telle accumulation de chlorure dans l'endosome générerait un *shunt électrique* nécessaire à l'activité soutenue de la V-ATPase (voir Section Introduction C.III.3a). Notre mutant n'étant pas capable de transporter des protons, son activité est donc susceptible d'altérer le pH endosomal.

C'est pourquoi, à l'aide d'une sonde ratiométrique fluorescente appelée synapto-pHluorin2 spécifiquement adressée aux endosomes précoces [Voir Figures 5A et 5B dans l'article] et dont le spectre d'émission dépend du pH (voir Section Matériel et Méthodes n°2 IV.3), le Dr. Alexi Alekov a mesuré par microscopie confocale le pH endosomal de cellules HEK293T exprimant le ClC-5 WT ou E211G. Il en ressort très étonnamment que l'expression dans un endosome précoce du mutant E211G entraîne une acidification significative du contenu vésiculaire. Cette acidification significative n'est pas significativement différente de celle provoquée par l'expression du ClC-5 WT [voir Figure 5C dans l'article]. Le mutant E211G conserve donc la capacité qu'a le ClC-5 WT d'acidifier les endosomes précoces dans lesquels il est exprimé.

DISCUSSION DE LA 2^{NDE} ÉTUDE

I. Conséquences de la substitution du *gating glutamate* de ClC-5

En résumé, l'analyse fonctionnelle de la mutation E211G de ClC-5 a montré que remplacer le G_{Glu} du ClC-5 par une glycine n'altère ni l'expression ni l'adressage de la protéine. En revanche, cette substitution convertit l'échangeur 2Cl⁻/H⁺ ClC-5 en un canal chlorure.

Cette conversion de ClC-5 en canal chlorure avait déjà été observée lors de l'expression *in vitro* d'un mutant artificiel de ClC-5, dont le G_{Glu} était substitué par une Alanine (E211A) (Picollo & Pusch, 2005; Scheel *et al.*, 2005). Ce phénomène et sa caractérisation ont participé à la compréhension des cycles de transport des échangeurs ClC. Il est aujourd'hui admis que la chaîne latérale du G_{Glu} chargée négativement bloque le pore et peut fixer des protons. Lorsque le G_{Glu} est protoné, sa chaîne latérale se déplace et libère le pore dans lequel peuvent alors circuler 2 ions chlorure. L'ion H⁺ se déplace ensuite du G_{Glu} vers d'autres sites de fixation, aboutissant au transport net d'un proton. Ce modèle anticipe que le remplacement du G_{Glu} d'un échangeur ClC par un résidu dont la chaîne latérale est neutre et trop peu encombrante pour bloquer l'accès des ions Cl⁻ au pore produit une abolition du transport de proton mais favorise celui des ions chlorure [voir Figure 24]. La substitution pathogène du G_{Glu} de ClC-5 analysée dans cette étude correspond parfaitement à ce cas de figure: la glycine n'est pas un acide-aminé qui peut être protoné et sa chaîne latérale est réduite à un atome d'hydrogène.

Néanmoins, toutes les substitutions du G_{Glu} de ClC-5 n'affectent pas autant l'échangeur. En dehors de E211A et E211G, les courants produits par 3 autres mutations du G_{Glu} de ClC-5 ont été analysés. La mutation artificielle E211D, dite "*conservatrice*" car substituant un résidu chargé négativement par un autre [voir Figure S1 dans l'article], abolit étonnamment la totalité des courants produits par ClC-5. La chaîne latérale de l'aspartate, si elle lie un ion H⁺, ne serait pas capable de s'articuler dans le pore et de se déprotoner. La mutation artificielle E211C et la mutation pathogène E211Q décrite récemment, qui remplacent le G_{Glu} par des résidus neutres aux chaînes latérales plus longues que celle d'une glycine, convertissent ClC-5 en canal chlorure dont la conductance globale est réduite (Grieschat & Alekov, 2012; Zifarelli *et al.*, 2012; Satoh *et al.*, 2016). De manière intéressante, le patient décrit ici et le patient porteur de la mutation E211Q, qui expriment des canaux chlorure ClC-5, ont été diagnostiqués jeunes mais ne semblent pas atteint d'une forme particulièrement légère ou grave de la MD (Sekine *et al.*, 2014).

II. Importance du chlorure dans la fonction endosomale

Les résultats de l'analyse fonctionnelle du mutant E211G de ClC-5 sont surprenants au regard de la physiopathologie de la MD telle qu'elle est généralement admise. En effet, ClC-5 est considéré nécessaire à l'acidification des endosomes précoces. En l'absence de ClC-5, une acidification altérée limiterait certains processus vésiculaires et réduirait alors la fonctionnalité de la voie endo-lysosomale dont dépend l'endocytose proximale. Dans le cadre de la MD, le défaut d'acidification endosomale serait donc indirectement à l'origine de la PiBPM et de ses conséquences (voir Section Introduction C.III.2.c).

Pourtant, la mutation E211G que nous avons analysée n'altère pas la capacité de ClC-5 à acidifier les endosomes précoces. Le patient Dent porteur de cette mutation pourrait donc être malade en dépit d'un pH endosomal adéquat. Ce résultat étonnant fait écho à deux publications. Dans la 1^{ère}, les auteurs ont mesuré le pH endosomal de lignées de cellules HEK transfectées de façon stable avec différentes mutations pathogènes de ClC-5. Sur 3 mutations testées, 2 ne présentaient pas de défaut d'acidification des endosomes (G57V et R280P) (Smith *et al.*, 2009). Dans la 2^{nde}, des mesures similaires ont été faites sur des cellules proximales immortalisées de patients Dent. Une des mutations testées, l'insertion d'une histidine en position 30 (30insH), n'affecte pas le pH endosomal des cellules du patient (Gorvin *et al.*, 2013). Dans leur ensemble, ces résultats contredisent l'idée selon laquelle la MD est causée par un défaut de pH endosomal. Elle serait plutôt liée à un défaut d'accumulation de chlorure le long de la voie endo-lysosomale.

En renfort de cette hypothèse viennent plusieurs éléments. D'abord, l'analyse du phénotype de souris porteuses de la mutation artificielle E211A de ClC-5: ces souris présentent toutes les caractéristiques morphologiques, rénales et biologiques des souris invalidées pour *Clcn5* alors qu'à la différence de ces dernières, les souris exprimant le canal ClC-5 E211A ont un pH endosomal normal (Novarino *et al.*, 2010). En outre, si chez les souris invalidées pour *Clcn5* l'endosome est plus alcalin, il contient également moins de chlorure (Hara-Chikuma *et al.*, 2005a). De plus, la mutation pathogène 30insH citée plus haut réduit le transport d'ions Cl⁻ de ClC-5 sans affecter son transport d'ions H⁺ (Gorvin *et al.*, 2013). Enfin, des analyses *in silico* ont montré qu'un canal chlorure accumule moins d'ions Cl⁻ dans une vésicule qu'un échangeur 2Cl⁻/H⁺ (Weinert *et al.*, 2010). Pour autant, la mutation E211Q qui convertit ClC-5 en canal altère le pH endosomal (Sato *et al.*, 2016). Cette différence avec les mutations E211G et E211A serait liée à la faible intensité des courants chlorure produits par le mutant E211Q. Ce dernier accumulerait trop peu de chlorure pour *shunter* efficacement la H⁺-ATPase vacuolaire.

De façon intéressante, l'acidification normale des endosomes exprimant un ClC-5 E211G ou E211A rend improbable l'"acidification directe" de l'endosome par ClC-5 (voir section Introduction C.III.3.a). En effet, si ClC-5 utilisait un gradient électrochimique de chlorure initial (théorique et non mesuré) pour acidifier directement l'endosome, alors le remplacer par un canal chlorure dissiperait rapidement ce gradient sans permettre en échange une diminution du pH endosomal. Par ailleurs, l'atteinte rénale des souris porteuses du ClC-5 E211A (non-fonctionnel mais correctement adressé) écarte une implication majeure des interactions protéine-protéine de ClC-5 dans la physiopathologie de la MD (Jentsch, 2015).

En résumé, l'absence d'un ClC-5 fonctionnel affecterait l'accumulation de chlore dans l'endosome dans des proportions capable non seulement d'induire un défaut d'endocytose mais aussi de réduire l'acidification endosomale. Mais lorsque le ClC-5 est muté en canal chlorure ou lorsqu'il conserve une conductance faible aux ions Cl^- , l'accumulation endosomale de chlorure serait réduite (entraînant un défaut d'endocytose) mais suffisante pour permettre une acidification adéquate des endosomes précoces par la H^+ -ATPase vacuolaire. L'ensemble aboutit à deux conclusions. Premièrement, le couplage des transports chlore/proton de ClC-5 est nécessaire à sa fonction. Deuxièmement, l'endocytose ne requiert pas seulement un pH endosomal acide mais aussi une concentration endosomale en chlorure précise.

Toutefois, la concentration endosomale en chlorure n'a jamais été mesurée en présence d'un mutant de ClC-5. Il reste donc à montrer qu'elle est réduite lorsqu'un mutant non-fonctionnel ou converti en canal chlorure est exprimé. Ces mesures n'ont pas été réalisées car la seule sonde ratiométrique sensible au chlore existante, publiée par le groupe d'A. Verkman, est chimique et peu stable. Sa synthèse requiert de nombreuses étapes et des compétences avancées en chimie organique et inorganique. Une fois préparée, la sonde doit être liée à un ligand de l'endocytose pour atteindre les endosomes (Sonawane *et al.*, 2002; Hara-Chikuma *et al.*, 2005a). Le groupe de T. Jentsch a synthétisé une sonde analogue mais moins efficace couplée au dextran. Elle leur a permis de confirmer *in vitro* qu'un échangeur $2\text{Cl}^-/\text{H}^+$ ClC-7 accumule plus de chlorure dans les lysosomes qu'un mutant ClC-7 converti en canal chlorure (voir section Introduction C.II.4.a) (Weinert *et al.*, 2010). Quoi qu'il en soit, le rôle du chlorure dans les endosomes est totalement inconnu. Il est seulement possible de spéculer que les ions Cl^- impacteraient l'endocytose proximale dans la MD en modulant l'osmolarité ou l'efflux d'ions Ca^{2+} des endosomes, *via* des canaux calciques endosomaux impliqués dans le trafic vésiculaire (Saito *et al.*, 2007; Stauber & Jentsch, 2013; Brailoiu & Brailoiu, 2016; Grimm *et al.*, 2017).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Accardi**, (2015). "Structure and gating of CLC channels and exchangers". *J Physiol* 593: 4129-4138.
- Accardi & Miller**, (2004). "Secondary active transport mediated by a prokaryotic homologue of CLC Cl⁻ channels". *Nature* 427: 803-807.
- Accardi & Pusch**, (2000). "Fast and slow gating relaxations in the muscle chloride channel CLC-1". *J Gen Physiol* 116: 433-444.
- Accardi et al.**, (2005). "Separate ion pathways in a Cl⁻/H⁺ exchanger". *J Gen Physiol* 126: 563-570.
- Accardi et al.**, (2006). "Separate Ion Pathways in a Cl⁻/H⁺ Exchanger". *J Gen Physiol* 126: 563-570.
- Adam et al.**, (1986). "31P-NMR in vivo measurement of renal intracellular pH: effects of acidosis and K⁺ depletion in rats". *Am J Physiol* 251: F904-910.
- Akuta et al.**, (1997). "Mutations of CLCN5 in Japanese children with idiopathic low molecular weight proteinuria, hypercalciuria and nephrocalcinosis". *Kidney Int* 52: 911-916.
- Alekov**, (2015). "Mutations associated with Dent's disease affect gating and voltage dependence of the human anion/proton exchanger CLC-5". *Front Physiol* 6: 159.
- Alekov & Fahlke**, (2009). "Channel-like slippage modes in the human anion/proton exchanger CLC-4". *J Gen Physiol* 133: 485-496.
- Alex et al.**, (2010). "Clcn5 knockout mice exhibit novel immunomodulatory effects and are more susceptible to dextran sulfate sodium-induced colitis". *J Immunol* 184: 3988-3996.
- Ambuhl et al.**, (1998). "Regulation of renal phosphate transport by acute and chronic metabolic acidosis in the rat". *Kidney Int* 53: 1288-1298.
- Andrini et al.**, (2015). "CLC-K chloride channels: emerging pathophysiology of Bartter syndrome type 3". *Am J Physiol Renal Physiol* 308: F1324-1334.
- Aruga et al.**, (2000). "Chronic metabolic acidosis increases NaDC-1 mRNA and protein abundance in rat kidney". *Kidney Int* 58: 206-215.
- Attmane-Elakeb et al.**, (1998). "Stimulation by in vivo and in vitro metabolic acidosis of expression of rBSC-1, the Na⁺-K⁺(NH₄⁺)-2Cl⁻ cotransporter of the rat medullary thick ascending limb". *J Biol Chem* 273: 33681-33691.
- Babenko et al.**, (2006). "Activating mutations in the ABCC8 gene in neonatal diabetes mellitus". *N Engl J Med* 355: 456-466.
- Bacic et al.**, (2006). "The renal Na⁺/phosphate cotransporter NaPi-IIa is internalized via the receptor-mediated endocytic route in response to parathyroid hormone". *Kidney Int* 69: 495-503.
- Bailey et al.**, (2006). "Maxi-K channels contribute to urinary potassium excretion in the ROMK-deficient mouse model of Type II Bartter's syndrome and in adaptation to a high-K diet". *Kidney Int* 70: 51-59.
- Barriere et al.**, (2003). "Role of TASK2 potassium channels regarding volume regulation in primary cultures of mouse proximal tubules". *J Gen Physiol* 122: 177-190.
- Bartter et al.**, (1962). "Hyperplasia of the juxtaglomerular complex with hyperaldosteronism and hypokalemic alkalosis. A new syndrome". *Am J Med* 33: 811-828.
- Basilio et al.**, (2014). "Conformational changes required for H⁺/Cl⁻ exchange mediated by a CLC transporter". *Nat Struct Mol Biol* 21: 456-463.
- Beck et al.**, (1993). "Regulation of basolateral K channels in proximal tubule studied during continuous micropfusion". *Am J Physiol* 264: F496-501.
- Beck et al.**, (1998). "Targeted inactivation of Npt2 in mice leads to severe renal phosphate wasting, hypercalciuria, and skeletal abnormalities". *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 5372-5377.

- Becker-Cohen et al.**, (2012). "Vitamin A deficiency associated with urinary retinol binding protein wasting in Dent's disease". *Pediatr Nephrol* 27: 1097-1102.
- Bennetts & Parker**, (2013). "Molecular determinants of common gating of a ClC chloride channel". *Nat Commun* 4: 2507.
- Bennetts et al.**, (2005). "Cytoplasmic ATP-sensing domains regulate gating of skeletal muscle ClC-1 chloride channels". *J Biol Chem* 280: 32452-32458.
- Bergsdorf et al.**, (2009). "Residues important for nitrate/proton coupling in plant and mammalian CLC transporters". *J Biol Chem* 284: 11184-11193.
- Bi et al.**, (2013). "Chloride channelopathies of ClC-2". *Int J Mol Sci* 15: 218-249.
- Biagi et al.**, (1981). "Intracellular potentials in rabbit proximal tubules perfused in vitro". *Am J Physiol* 240: F200-210.
- Bikle**, (2014). "Vitamin D: Production, Metabolism, and Mechanisms of Action". Endotext. L. J. De Groot, G. Chrousos, K. Dungan et al. South Dartmouth (MA).
- Birkenhager et al.**, (2001). "Mutation of BSND causes Bartter syndrome with sensorineural deafness and kidney failure". *Nat Genet* 29: 310-314.
- Bishop et al.**, (2010). "Role of the Rhesus glycoprotein, Rh B glycoprotein, in renal ammonia excretion". *Am J Physiol Renal Physiol* 299: F1065-1077.
- Biver et al.**, (2008). "A role for Rhesus factor Rhcg in renal ammonium excretion and male fertility". *Nature* 456: 339-343.
- Blaine et al.**, (2015). "Renal control of calcium, phosphate, and magnesium homeostasis". *Clin J Am Soc Nephrol* 10: 1257-1272.
- Blanchard et al.**, (2016). "Observations of a large Dent disease cohort". *Kidney Int* 90: 430-439.
- Blanchard et al.**, (2008). "Effect of hydrochlorothiazide on urinary calcium excretion in dent disease: an uncontrolled trial". *Am J Kidney Dis* 52: 1084-1095.
- Blantz & Pelayo**, (1984). "A functional role for the tubuloglomerular feedback mechanism". *Kidney Int* 25: 739-746.
- Blanz et al.**, (2007). "Leukoencephalopathy upon disruption of the chloride channel ClC-2". *J Neurosci* 27: 6581-6589.
- Bockenbauer et al.**, (2009). "Epilepsy, ataxia, sensorineural deafness, tubulopathy, and KCNJ10 mutations". *N Engl J Med* 360: 1960-1970.
- Boim et al.**, (1995). "ROMK inwardly rectifying ATP-sensitive K⁺ channel. II. Cloning and distribution of alternative forms". *Am J Physiol* 268: F1132-1140.
- Bokenkamp et al.**, (2009). "Dent-2 disease: a mild variant of Lowe syndrome". *J Pediatr* 155: 94-99.
- Bokenkamp & Ludwig**, (2016). "The oculocerebrorenal syndrome of Lowe: an update". *Pediatr Nephrol* 31: 2201-2212.
- Bond et al.**, (1994). "Cloning and expression of a family of inward rectifier potassium channels". *Receptors Channels* 2: 183-191.
- Bosl et al.**, (2001). "Male germ cells and photoreceptors, both dependent on close cell-cell interactions, degenerate upon ClC-2 Cl(-) channel disruption". *EMBO J* 20: 1289-1299.
- Bourgeois et al.**, (2010). "NHE4 is critical for the renal handling of ammonia in rodents". *J Clin Invest* 120: 1895-1904.
- Brailoiu & Brailoiu**, (2016). "Modulation of Calcium Entry by the Endo-lysosomal System". *Adv Exp Med Biol* 898: 423-447.
- Brandt & Jentsch**, (1995). "ClC-6 and ClC-7 are two novel broadly expressed members of the CLC chloride channel family". *FEBS Lett* 377: 15-20.
- Bredt et al.**, (1995). "Cloning and expression of two brain-specific inwardly rectifying potassium channels". *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 6753-6757.

- Brenes et al.**, (1977). "Familial proximal renal tubular acidosis. A distinct clinical entity". *Am J Med* 63: 244-252.
- Brenes & Sanchez**, (1993). "Impaired urinary ammonium excretion in patients with isolated proximal renal tubular acidosis". *J Am Soc Nephrol* 4: 1073-1078.
- Brennan et al.**, (1988). "Effect of pH on citrate reabsorption in the proximal convoluted tubule". *Am J Physiol* 255: F301-306.
- Brochiero et al.**, (2002). "Cloning of rabbit Kir6.1, SUR2A, and SUR2B: possible candidates for a renal K(ATP) channel". *Am J Physiol Renal Physiol* 282: F289-300.
- Brown & Fenton**, (2012). "The Cell Biology of Vasopressin Action". Brenner and Rector's The Kidney 9ème Édition. Elsevier. 1: 353-383.
- Brown & Wagner**, (2012). "Molecular mechanisms of acid-base sensing by the kidney". *J Am Soc Nephrol* 23: 774-780.
- Busque & Wagner**, (2009). "Potassium restriction, high protein intake, and metabolic acidosis increase expression of the glutamine transporter SNAT3 (Slc38a3) in mouse kidney". *Am J Physiol Renal Physiol* 297: F440-450.
- Cao et al.**, (2007). "Descending vasa recta endothelia express inward rectifier potassium channels". *Am J Physiol Renal Physiol* 293: F1248-1255.
- Capasso et al.**, (2002). "Bicarbonate transport along the loop of Henle: molecular mechanisms and regulation". *J Nephrol* 15 Suppl 5: S88-96.
- Capdevila-Nortes et al.**, (2015). "Structural determinants of interaction, trafficking and function in the CLC-2/MLC1 subunit GlialCAM involved in leukodystrophy". *J Physiol* 593: 4165-4180.
- Carr et al.**, (2003). "A role for CBS domain 2 in trafficking of chloride channel CLC-5". *Biochem Biophys Res Commun* 310: 600-605.
- Carr et al.**, (2006). "Disruption of clc-5 leads to a redistribution of annexin A2 and promotes calcium crystal agglomeration in collecting duct epithelial cells". *Cell Mol Life Sci* 63: 367-377.
- Cebotaru et al.**, (2005). "High citrate diet delays progression of renal insufficiency in the CLC-5 knockout mouse model of Dent's disease". *Kidney Int* 68: 642-652.
- Chabardes-Garonne et al.**, (2003). "A panoramic view of gene expression in the human kidney". *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 13710-13715.
- Chabardes et al.**, (1996). "Localization of mRNAs encoding Ca²⁺-inhibitable adenylyl cyclases along the renal tubule. Functional consequences for regulation of the cAMP content". *J Biol Chem* 271: 19264-19271.
- Chan et al.**, (2016). "Loss of function mutation of the Slc38a3 glutamine transporter reveals its critical role for amino acid metabolism in the liver, brain, and kidney". *Pflugers Arch* 468: 213-227.
- Chaudhari et al.**, (2014). "A molecular web: endoplasmic reticulum stress, inflammation, and oxidative stress". *Front Cell Neurosci* 8: 213.
- Chen et al.**, (2013). "Novel brain expression of CLC-1 chloride channels and enrichment of CLCN1 variants in epilepsy". *Neurology* 80: 1078-1085.
- Chevalier**, (2016). "The proximal tubule is the primary target of injury and progression of kidney disease: role of the glomerulotubular junction". *Am J Physiol Renal Physiol* 311: F145-161.
- Chilton et al.**, (2008). "Inward rectifier K(+) currents and Kir2.1 expression in renal afferent and efferent arterioles". *J Am Soc Nephrol* 19: 69-76.
- Choi et al.**, (2011). "K⁺ channel mutations in adrenal aldosterone-producing adenomas and hereditary hypertension". *Science* 331: 768-772.
- Chou et al.**, (1977). "Effects of acetazolamide on proximal tubule Cl⁻, Na⁺, and HCO₃⁻ transport in normal and acidotic dogs during distal blockade". *J Clin Invest* 60: 162-170.

- Christensen et al.**, (2003). "Loss of chloride channel *CLC-5* impairs endocytosis by defective trafficking of megalin and cubilin in kidney proximal tubules". *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 8472-8477.
- Chung et al.**, (2009). "Neuronal activity regulates phosphorylation-dependent surface delivery of G protein-activated inwardly rectifying potassium channels". *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 629-634.
- Clague et al.**, (1994). "Vacuolar ATPase activity is required for endosomal carrier vesicle formation". *J Biol Chem* 269: 21-24.
- Cluzeaud et al.**, (1998). "Expression of TWIK-1, a novel weakly inward rectifying potassium channel in rat kidney". *Am J Physiol* 275: C1602-1609.
- Conti et al.**, (2002). "Membrane targeting of ATP-sensitive potassium channel. Effects of glycosylation on surface expression". *J Biol Chem* 277: 25416-25422.
- Costa et al.**, (2012). "The Arabidopsis central vacuole as an expression system for intracellular transporters: functional characterization of the Cl-/H⁺ exchanger *CLC-7*". *J Physiol* 590: 3421-3430.
- Coulter et al.**, (1995). "Identification and molecular localization of a pH-sensing domain for the inward rectifier potassium channel *HIR*". *Neuron* 15: 1157-1168.
- Cuevas et al.**, (2017). "Potassium Sensing by Renal Distal Tubules Requires Kir4.1". *J Am Soc Nephrol* 28: 1814-1825.
- Curthoys & Moe**, (2014). "Proximal tubule function and response to acidosis". *Clin J Am Soc Nephrol* 9: 1627-1638.
- D'Adamo et al.**, (2011). "Genetic inactivation of *Kcnj16* identifies Kir5.1 as an important determinant of neuronal PCO₂/pH sensitivity". *J Biol Chem* 286: 192-198.
- D'Antonio et al.**, (2013). "Conformational defects underlie proteasomal degradation of Dent's disease-causing mutants of *CLC-5*". *Biochem J* 452: 391-400.
- Dantzler et al.**, (2014). "Urine-concentrating mechanism in the inner medulla: function of the thin limbs of the loops of Henle". *Clin J Am Soc Nephrol* 9: 1781-1789.
- Dart & Leyland**, (2001). "Targeting of an A kinase-anchoring protein, AKAP79, to an inwardly rectifying potassium channel, Kir2.1". *J Biol Chem* 276: 20499-20505.
- de Seigneux et al.**, (2015). "Proteinuria Increases Plasma Phosphate by Altering Its Tubular Handling". *J Am Soc Nephrol* 26: 1608-1618.
- deHart et al.**, (2008). "The alpha9beta1 integrin enhances cell migration by polyamine-mediated modulation of an inward-rectifier potassium channel". *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 7188-7193.
- Dent & Friedman**, (1964). "Hypercalcuric Rickets Associated with Renal Tubular Damage". *Arch Dis Child* 39: 240-249.
- Depienne et al.**, (2013). "Brain white matter oedema due to *CLC-2* chloride channel deficiency: an observational analytical study". *Lancet Neurol* 12: 659-668.
- Derst et al.**, (2001a). "Cellular localization of the potassium channel Kir7.1 in guinea pig and human kidney". *Kidney Int* 59: 2197-2205.
- Derst et al.**, (2001b). "Genetic and functional linkage of Kir5.1 and Kir2.1 channel subunits". *FEBS Lett* 491: 305-311.
- Derst et al.**, (1998). "A hyperprostaglandin E syndrome mutation in Kir1.1 (renal outer medullary potassium) channels reveals a crucial residue for channel function in Kir1.3 channels". *J Biol Chem* 273: 23884-23891.
- Deschenes & Fila**, (2011). "Primary molecular disorders and secondary biological adaptations in bartter syndrome". *Int J Nephrol* 2011: 396209.
- Devuyst et al.**, (1999). "Intra-renal and subcellular distribution of the human chloride channel, *CLC-5*, reveals a pathophysiological basis for Dent's disease". *Hum Mol Genet* 8: 247-257.

- Devuyst & Luciani**, (2015). "*Chloride transporters and receptor-mediated endocytosis in the renal proximal tubule*". *J Physiol* 593: 4151-4164.
- Devuyst & Thakker**, (2010). "*Dent's disease*". *Orphanet J Rare Dis* 5: 28.
- Di Bella et al.**, (2014). "*Subclinical leukodystrophy and infertility in a man with a novel homozygous CLCN2 mutation*". *Neurology* 83: 1217-1218.
- Dickson et al.**, (2014). "*The proximal tubule and albuminuria: really!*". *J Am Soc Nephrol* 25: 443-453.
- Dizin et al.**, (2013). "*Albuminuria induces a proinflammatory and profibrotic response in cortical collecting ducts via the 24p3 receptor*". *Am J Physiol Renal Physiol* 305: F1053-1063.
- Djukic et al.**, (2007). "*Conditional knock-out of Kir4.1 leads to glial membrane depolarization, inhibition of potassium and glutamate uptake, and enhanced short-term synaptic potentiation*". *J Neurosci* 27: 11354-11365.
- Dong et al.**, (2016). "*Romk1 Knockout Mice Do Not Produce Bartter Phenotype but Exhibit Impaired K Excretion*". *J Biol Chem* 291: 5259-5269.
- Doyle et al.**, (1998). "*The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity*". *Science* 280: 69-77.
- Duan et al.**, (2004). "*Spatial-Temporal Distribution of CLC-5 in Rat Tooth Germ Development*". Communication orale au congrès annuel de l'Association Internationale de Recherche Dentaire.
- Duan et al.**, (2009). "*CLC-5 regulates dentin development through TGF-beta1 pathway*". *Arch Oral Biol* 54: 1118-1124.
- DuBose**, (2012). "*Disorders of Acid-Base Balance*". Brenner and Rector's The Kidney 9ème Édition. Elsevier. 1: 595-639.
- DuBose & Good**, (1991). "*Effects of chronic hyperkalemia on renal production and proximal tubule transport of ammonium in rats*". *Am J Physiol* 260: F680-687.
- Dutzler et al.**, (2002). "*X-ray structure of a CLC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity*". *Nature* 415: 287-294.
- Dutzler et al.**, (2003). "*Gating the selectivity filter in CLC chloride channels*". *Science* 300: 108-112.
- Edmonds et al.**, (2002). "*CLC-5: ontogeny of an alternative chloride channel in respiratory epithelia*". *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282: L501-507.
- Edvinsson et al.**, (2011). "*Potassium-dependent activation of Kir4.2 K(+) channels*". *J Physiol* 589: 5949-5963.
- El Karoui et al.**, (2016). "*Endoplasmic reticulum stress drives proteinuria-induced kidney lesions via Lipocalin 2*". *Nat Commun* 7: 10330.
- Eladari et al.**, (1998). "*Functional and molecular characterization of luminal and basolateral Cl-/HCO₃- exchangers of rat thick limbs*". *Am J Physiol* 275: F334-342.
- Ellgaard & Helenius**, (2003). "*Quality control in the endoplasmic reticulum*". *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 181-191.
- Elmonem et al.**, (2016). "*Cystinosis: a review*". *Orphanet J Rare Dis* 11: 47.
- Elvington et al.**, (2009). "*Substrate-driven conformational changes in CLC-ec1 observed by fluorine NMR*". *EMBO J* 28: 3090-3102.
- Eshbach & Weisz**, (2017). "*Receptor-Mediated Endocytosis in the Proximal Tubule*". *Annu Rev Physiol* 79: 425-448.
- Estevez et al.**, (2001). "*Barttin is a Cl- channel beta-subunit crucial for renal Cl- reabsorption and inner ear K⁺ secretion*". *Nature* 414: 558-561.
- Estevez et al.**, (2004). "*Functional and structural conservation of CBS domains from CLC chloride channels*". *J Physiol* 557: 363-378.

- Fagerberg et al.**, (2014). "Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics". *Mol Cell Proteomics* 13: 397-406.
- Fakler et al.**, (1996). "Identification of a titratable lysine residue that determines sensitivity of kidney potassium channels (ROMK) to intracellular pH". *EMBO J* 15: 4093-4099.
- Fan et al.**, (2015). "Vasopressin-induced stimulation of the Na(+)-activated K(+) channels is responsible for maintaining the basolateral K(+) conductance of the thick ascending limb (TAL) in EAST/SeSAME syndrome". *Biochim Biophys Acta* 1852: 2554-2562.
- Fang et al.**, (2010). "Hypertension resistance polymorphisms in ROMK (Kir1.1) alter channel function by different mechanisms". *Am J Physiol Renal Physiol* 299: F1359-1364.
- Fang et al.**, (2005). "Functional expression of Kir2.x in human aortic endothelial cells: the dominant role of Kir2.2". *Am J Physiol Cell Physiol* 289: C1134-1144.
- Fang et al.**, (2013). "Involvement of endoplasmic reticulum stress in albuminuria induced inflammasome activation in renal proximal tubular cells". *PLoS One* 8: e72344.
- Faundez & Hartzell**, (2004). "Intracellular chloride channels: determinants of function in the endosomal pathway". *Sci STKE* 2004: re8.
- Feng et al.**, (2010). "Structure of a eukaryotic CLC transporter defines an intermediate state in the transport cycle". *Science* 330: 635-641.
- Feng et al.**, (2012). "Molecular mechanism of proton transport in CLC Cl⁻/H⁺ exchange transporters". *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 11699-11704.
- Ferrando-Miguel et al.**, (2004). "Protein levels of genes encoded on chromosome 21 in fetal Down Syndrome brain (Part V): overexpression of phosphatidyl-inositol-glycan class P protein (DSCR5)". *Amino Acids* 26: 255-261.
- Fezai et al.**, (2015). "SPAK and OSR1 Sensitive Kir2.1 K⁺ Channels". *Neurosignals* 23: 20-33.
- Finer et al.**, (2003). "Transient neonatal hyperkalemia in the antenatal (ROMK defective) Bartter syndrome". *J Pediatr* 142: 318-323.
- Fischer et al.**, (2010). "Barttin activates CLC-K channel function by modulating gating". *J Am Soc Nephrol* 21: 1281-1289.
- Fisher et al.**, (1994). "Isolation and partial characterization of a chloride channel gene which is expressed in kidney and is a candidate for Dent's disease (an X-linked hereditary nephrolithiasis)". *Hum Mol Genet* 3: 2053-2059.
- Fisher et al.**, (1995). "Cloning and characterization of CLCN5, the human kidney chloride channel gene implicated in Dent disease (an X-linked hereditary nephrolithiasis)". *Genomics* 29: 598-606.
- Foote et al.**, (2017). "An Exploration of Charge Compensating Ion Channels across the Phagocytic Vacuole of Neutrophils". *Front Pharmacol* 8: 94.
- Forster et al.**, (2006). "Proximal tubular handling of phosphate: A molecular perspective". *Kidney Int* 70: 1548-1559.
- Freitas et al.**, (2008). "Na(+)-glucose transporter-2 messenger ribonucleic acid expression in kidney of diabetic rats correlates with glycemic levels: involvement of hepatocyte nuclear factor-1alpha expression and activity". *Endocrinology* 149: 717-724.
- Friedrich et al.**, (1999). "Mutational analysis demonstrates that CLC-4 and CLC-5 directly mediate plasma membrane currents". *J Biol Chem* 274: 896-902.
- Fromter**, (1982). "Electrophysiological analysis of rat renal sugar and amino acid transport. I. Basic phenomena". *Pflugers Arch* 393: 179-189.
- Fry & Karet**, (2007). "Inherited renal acidoses". *Physiology (Bethesda)* 22: 202-211.
- Fu et al.**, (2013). "Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes". *Curr Diabetes Rev* 9: 25-53.

- Fujita et al.**, (2002). "Specific localization of an inwardly rectifying K(+) channel, Kir4.1, at the apical membrane of rat gastric parietal cells; its possible involvement in K(+) recycling for the H(+)-K(+)-pump". *J Physiol* 540: 85-92.
- Fukuda et al.**, (2013). "Replication study for the association of a single-nucleotide polymorphism, rs3746876, within KCNJ15, with susceptibility to type 2 diabetes in a Japanese population". *J Hum Genet* 58: 490-493.
- Gabriel et al.**, (2017). "Bone marrow transplantation improves proximal tubule dysfunction in a mouse model of Dent disease". *Kidney Int* 91: 842-855.
- Gailly et al.**, (2008). "A novel renal carbonic anhydrase type III plays a role in proximal tubule dysfunction". *Kidney Int* 74: 52-61.
- Gawenis et al.**, (2007). "Colonic anion secretory defects and metabolic acidosis in mice lacking the NBC1 Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter". *J Biol Chem* 282: 9042-9052.
- Gekle**, (2007). "Renal albumin handling: a look at the dark side of the filter". *Kidney Int* 71: 479-481.
- Gekle et al.**, (2001). "Inhibition of Na⁺-H⁺ exchanger-3 interferes with apical receptor-mediated endocytosis via vesicle fusion". *J Physiol* 531: 619-629.
- Gekle et al.**, (1995). "Endosomal alkalization reduces J_{max} and K_m of albumin receptor-mediated endocytosis in OK cells". *Am J Physiol* 268: F899-906.
- Giebisch et al.**, (2007). "Renal and extrarenal regulation of potassium". *Kidney Int* 72: 397-410.
- Gilbert et al.**, (2012). "Vasoactive Molecules and the Kidney". Brenner and Rector's The Kidney 9ème Édition. Elsevier. 1: 384-420.
- Glowatzki et al.**, (1995). "Subunit-dependent assembly of inward-rectifier K⁺ channels". *Proc Biol Sci* 261: 251-261.
- Gloyn et al.**, (2004). "Activating mutations in the gene encoding the ATP-sensitive potassium-channel subunit Kir6.2 and permanent neonatal diabetes". *N Engl J Med* 350: 1838-1849.
- Gogelein**, (1990). "Ion channels in mammalian proximal renal tubules". *Ren Physiol Biochem* 13: 8-25.
- Gogelein & Greger**, (1987). "Properties of single K⁺ channels in the basolateral membrane of rabbit proximal straight tubules". *Pflügers Arch* 410: 288-295.
- Gonzalez et al.**, (2012). "K(+) channels: function-structural overview". *Compr Physiol* 2: 2087-2149.
- Good & Burg**, (1984). "Ammonia production by individual segments of the rat nephron". *J Clin Invest* 73: 602-610.
- Gorvin et al.**, (2013). "Receptor-mediated endocytosis and endosomal acidification is impaired in proximal tubule epithelial cells of Dent disease patients". *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 7014-7019.
- Gosset et al.**, (1997). "A new inward rectifier potassium channel gene (KCNJ15) localized on chromosome 21 in the Down syndrome chromosome region 1 (DCR1)". *Genomics* 44: 237-241.
- Gradogna et al.**, (2010). "A regulatory calcium-binding site at the subunit interface of CLC-K kidney chloride channels". *J Gen Physiol* 136: 311-323.
- Grand et al.**, (2011). "Heterogeneity in the processing of CLCN5 mutants related to Dent disease". *Hum Mutat* 32: 476-483.
- Grand et al.**, (2009). "Novel CLCN5 mutations in patients with Dent's disease result in altered ion currents or impaired exchanger processing". *Kidney Int* 76: 999-1005.
- Graves et al.**, (2008). "The Cl⁻/H⁺ antiporter CLC-7 is the primary chloride permeation pathway in lysosomes". *Nature* 453: 788-792.
- Gray et al.**, (2005). "Basolateral K⁺ conductance in principal cells of rat CCD". *Am J Physiol Renal Physiol* 288: F493-504.

- Greger et al.**, (1996). "Functions of the Kidney, Fluid- and Electrolyte-Balance ". *Comprehensive Human Physiology, From Cellular Mechanisms to Integration*. Elsevier, Springer. 1: 1469-1625.
- Grieschat & Alekov**, (2012). "Glutamate 268 regulates transport probability of the anion/proton exchanger *ClC-5*". *J Biol Chem* 287: 8101-8109.
- Grill et al.**, (2016). "Salt-losing nephropathy in mice with a null mutation of the *Clcnk2* gene". *Acta Physiol (Oxf)* 218: 198-211.
- Grimm et al.**, (2017). "From mucopolipidosis type IV to Ebola: *TRPML* and two-pore channels at the crossroads of endo-lysosomal trafficking and disease". *Cell Calcium*.
- Guggino**, (2009). "Can we generate new hypotheses about Dent's disease from gene analysis of a mouse model?". *Exp Physiol* 94: 191-196.
- Gunther et al.**, (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: 8075-8080.
- Gunther et al.**, (2003). "The *ClC-5* chloride channel knock-out mouse - an animal model for Dent's disease". *Pflugers Arch* 445: 456-462.
- Guo et al.**, (2017). "*Na⁺/HCO₃⁻* Cotransporter *NBCn2* Mediates *HCO₃⁻* Reclamation in the Apical Membrane of Renal Proximal Tubules". *J Am Soc Nephrol*.
- Guven et al.**, (2017). "Mutational analysis of *PHEX*, *FGF23* and *CLCN5* in patients with hypophosphataemic rickets". *Clin Endocrinol (Oxf)* 87: 103-112.
- Guzman et al.**, (2013). "*ClC-3* is an intracellular chloride/proton exchanger with large voltage-dependent nonlinear capacitance". *ACS Chem Neurosci* 4: 994-1003.
- Hadchouel et al.**, (2016). "Regulation of Renal Electrolyte Transport by *WNK* and *SPAK-OSR1* Kinases". *Annu Rev Physiol* 78: 367-389.
- Hamilton & Devor**, (2012). "Basolateral membrane *K⁺* channels in renal epithelial cells". *Am J Physiol Renal Physiol* 302: F1069-1081.
- Hamm et al.**, (2015). "Acid-Base Homeostasis". *Clin J Am Soc Nephrol* 10: 2232-2242.
- Handlogten et al.**, (2015). "*NBCe1* expression is required for normal renal ammonia metabolism". *Am J Physiol Renal Physiol* 309: F658-666.
- Haque et al.**, (2012). "Proximal renal tubular acidosis: a not so rare disorder of multiple etiologies". *Nephrol Dial Transplant* 27: 4273-4287.
- Hara-Chikuma et al.**, (2005a). "Impaired acidification in early endosomes of *ClC-5* deficient proximal tubule". *Biochem Biophys Res Commun* 329: 941-946.
- Hara-Chikuma et al.**, (2005b). "*ClC-3* chloride channels facilitate endosomal acidification and chloride accumulation". *J Biol Chem* 280: 1241-1247.
- Hassinen et al.**, (2008). "A novel inwardly rectifying *K⁺* channel, *Kir2.5*, is upregulated under chronic cold stress in fish cardiac myocytes". *J Exp Biol* 211: 2162-2171.
- Hayama et al.**, (2003). "Molecular mechanisms of Bartter syndrome caused by mutations in the *BSND* gene". *Histochem Cell Biol* 119: 485-493.
- He et al.**, (2011). "Acid secretion-associated translocation of *KCNJ15* in gastric parietal cells". *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 301: G591-600.
- Hebert et al.**, (2005). "Molecular diversity and regulation of renal potassium channels". *Physiol Rev* 85: 319-371.
- Hechenberger et al.**, (1996). "A family of putative chloride channels from *Arabidopsis* and functional complementation of a yeast strain with a *CLC* gene disruption". *J Biol Chem* 271: 33632-33638.
- Hennings et al.**, (2017). "The *ClC-K2* Chloride Channel Is Critical for Salt Handling in the Distal Nephron". *J Am Soc Nephrol* 28: 209-217.
- Hetz**, (2012). "The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond". *Nat Rev Mol Cell Biol* 13: 89-102.

- Hibino et al.**, (2004a). "Differential assembly of inwardly rectifying K⁺ channel subunits, Kir4.1 and Kir5.1, in brain astrocytes". *J Biol Chem* 279: 44065-44073.
- Hibino et al.**, (2004b). "Expression of an inwardly rectifying K⁺ channel, Kir5.1, in specific types of fibrocytes in the cochlear lateral wall suggests its functional importance in the establishment of endocochlear potential". *Eur J Neurosci* 19: 76-84.
- Hibino et al.**, (1997). "An ATP-dependent inwardly rectifying potassium channel, KAB-2 (Kir4.1), in cochlear stria vascularis of inner ear: its specific subcellular localization and correlation with the formation of endocochlear potential". *J Neurosci* 17: 4711-4721.
- Hibino et al.**, (2010). "Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles". *Physiol Rev* 90: 291-366.
- Higashi et al.**, (2001). "An inwardly rectifying K(+) channel, Kir4.1, expressed in astrocytes surrounds synapses and blood vessels in brain". *Am J Physiol Cell Physiol* 281: C922-931.
- Hilgemann & Ball**, (1996). "Regulation of cardiac Na⁺,Ca²⁺ exchange and KATP potassium channels by PIP2". *Science* 273: 956-959.
- Hill et al.**, (2002). "Cloning, expression, and localization of a rat hepatocyte inwardly rectifying potassium channel". *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282: G233-240.
- Hirsch & Schlatter**, (1993). "K⁺ channels in the basolateral membrane of rat cortical collecting duct". *Pflugers Arch* 424: 470-477.
- Ho et al.**, (1993). "Cloning and expression of an inwardly rectifying ATP-regulated potassium channel". *Nature* 362: 31-38.
- Hofherr et al.**, (2005). "Selective Golgi export of Kir2.1 controls the stoichiometry of functional Kir2.x channel heteromers". *J Cell Sci* 118: 1935-1943.
- Hoopes et al.**, (2005). "Dent Disease with mutations in OCRL1". *Am J Hum Genet* 76: 260-267.
- Hryciw et al.**, (2006). "Regulation of albumin endocytosis by PSD95/Dlg/ZO-1 (PDZ) scaffolds. Interaction of Na⁺-H⁺ exchange regulatory factor-2 with ClC-5". *J Biol Chem* 281: 16068-16077.
- Hryciw et al.**, (2004). "Nedd4-2 functionally interacts with ClC-5: involvement in constitutive albumin endocytosis in proximal tubule cells". *J Biol Chem* 279: 54996-55007.
- Hryciw et al.**, (2012). "The interaction between megalin and ClC-5 is scaffolded by the Na(+)-H(+) exchanger regulatory factor 2 (NHERF2) in proximal tubule cells". *Int J Biochem Cell Biol* 44: 815-823.
- Hryciw et al.**, (2003). "Cofilin interacts with ClC-5 and regulates albumin uptake in proximal tubule cell lines". *J Biol Chem* 278: 40169-40176.
- Hsieh et al.**, (2016). "The mechanism of inward rectification in Kir channels: A novel kinetic model with non-equilibrium thermodynamics approach". *Biophys Chem* 212: 1-8.
- Hu et al.**, (2016). "X-exome sequencing of 405 unresolved families identifies seven novel intellectual disability genes". *Mol Psychiatry* 21: 133-148.
- Huang et al.**, (1998). "Direct activation of inward rectifier potassium channels by PIP2 and its stabilization by Gbetagamma". *Nature* 391: 803-806.
- Huang et al.**, (2014). "ClC-3 chloride channel/antiporter defect contributes to inflammatory bowel disease in humans and mice". *Gut* 63: 1587-1595.
- Hughes et al.**, (2000). "Cloning and functional expression of human retinal kir2.4, a pH-sensitive inwardly rectifying K(+) channel". *Am J Physiol Cell Physiol* 279: C771-784.
- Hummel et al.**, (2011). "Glucose transport by human renal Na⁺/D-glucose cotransporters SGLT1 and SGLT2". *Am J Physiol Cell Physiol* 300: C14-21.
- Hurst et al.**, (1993). "Na⁺ pump inhibition downregulates an ATP-sensitive K⁺ channel in rabbit proximal convoluted tubule". *Am J Physiol* 264: F760-764.
- Hurst et al.**, (1992). "Basolateral membrane potassium channels in rabbit cortical thick ascending limb". *Am J Physiol* 263: F262-267.

- Hurtado-Lorenzo et al.**, (2006). "V-ATPase interacts with ARNO and Arf6 in early endosomes and regulates the protein degradative pathway". *Nat Cell Biol* 8: 124-136.
- Hutagalung & Novick**, (2011). "Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology". *Physiol Rev* 91: 119-149.
- Hwang et al.**, (1991). "Mechanism of altered renal glutaminase gene expression in response to chronic acidosis". *Biochemistry* 30: 7522-7526.
- ICSGFBL**, (1997). "Mutations in the gene encoding the inwardly-rectifying renal potassium channel, ROMK, cause the antenatal variant of Bartter syndrome: evidence for genetic heterogeneity. International Collaborative Study Group for Bartter-like Syndromes". *Hum Mol Genet* 6: 17-26.
- Inagaki et al.**, (1995). "Reconstitution of IKATP: an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor". *Science* 270: 1166-1170.
- Inagaki et al.**, (1996). "A family of sulfonylurea receptors determines the pharmacological properties of ATP-sensitive K⁺ channels". *Neuron* 16: 1011-1017.
- Inanobe et al.**, (1995). "Immunological and physical characterization of the brain G protein-gated muscarinic potassium channel". *Biochem Biophys Res Commun* 217: 1238-1244.
- Indiveri et al.**, (1998). "Identification and purification of the reconstitutively active glutamine carrier from rat kidney mitochondria". *Biochem J* 333 (Pt 2): 285-290.
- Ishii et al.**, (2003). "Differential expression and distribution of Kir5.1 and Kir4.1 inwardly rectifying K⁺ channels in retina". *Am J Physiol Cell Physiol* 285: C260-267.
- Ito et al.**, (1996). "Immunolocalization of an inwardly rectifying K⁺ channel, K(AB)-2 (Kir4.1), in the basolateral membrane of renal distal tubular epithelia". *FEBS Lett* 388: 11-15.
- Jaeger et al.**, (1983). "Ammonium transport in rat cortical tubule: relationship to potassium metabolism". *Am J Physiol* 245: F593-600.
- Janssen et al.**, (2009). "Disease-causing dysfunctions of barttin in Bartter syndrome type IV". *J Am Soc Nephrol* 20: 145-153.
- Jayaram et al.**, (2011). "Structure of a slow CLC Cl(-)/H⁺ antiporter from a cyanobacterium". *Biochemistry* 50: 788-794.
- Jeck et al.**, (2001). "Functional heterogeneity of ROMK mutations linked to hyperprostaglandin E syndrome". *Kidney Int* 59: 1803-1811.
- Jentsch**, (2008). "CLC chloride channels and transporters: from genes to protein structure, pathology and physiology". *Crit Rev Biochem Mol Biol* 43: 3-36.
- Jentsch**, (2015). "Discovery of CLC transport proteins: cloning, structure, function and pathophysiology". *J Physiol* 593: 4091-4109.
- Jentsch et al.**, (1999). "The CLC chloride channel family". *Pflugers Arch* 437: 783-795.
- Jentsch et al.**, (1995). "Properties of voltage-gated chloride channels of the CLC gene family". *J Physiol* 482: 19S-25S.
- Jentsch et al.**, (1990). "Primary structure of *Torpedo marmorata* chloride channel isolated by expression cloning in *Xenopus* oocytes". *Nature* 348: 510-514.
- Jeon**, (2008). "Kidney and calcium homeostasis". *Electrolyte Blood Press* 6: 68-76.
- Jeworutzki et al.**, (2012). "GlialCAM, a protein defective in a leukodystrophy, serves as a CLC-2 Cl(-) channel auxiliary subunit". *Neuron* 73: 951-961.
- Jose et al.**, (2002). "Role of dopamine receptors in the kidney in the regulation of blood pressure". *Curr Opin Nephrol Hypertens* 11: 87-92.
- Kahle et al.**, (2003). "WNK4 regulates the balance between renal NaCl reabsorption and K⁺ secretion". *Nat Genet* 35: 372-376.
- Kane et al.**, (2006). "Gene knockout of the KCNJ8-encoded Kir6.1 K(ATP) channel imparts fatal susceptibility to endotoxemia". *FASEB J* 20: 2271-2280.
- Kantarci et al.**, (2007). "Mutations in LRP2, which encodes the multiligand receptor megalin, cause Donnai-Barrow and facio-oculo-acoustico-renal syndromes". *Nat Genet* 39: 957-959.

- Karet**, (2009). "Mechanisms in hyperkalemic renal tubular acidosis". *J Am Soc Nephrol* 20: 251-254.
- Kasper et al.**, (2005). "Loss of the chloride channel *ClC-7* leads to lysosomal storage disease and neurodegeneration". *EMBO J* 24: 1079-1091.
- Katz**, (1949). "Les Constantes Electriques De La Membrane Du Muscle". *Archives Des Sciences Physiologiques* 3: 285-300.
- Katzir et al.**, (2008). "Familial pure proximal renal tubular acidosis--a clinical and genetic study". *Nephrol Dial Transplant* 23: 1211-1215.
- Kaufhold et al.**, (2008). "Localization, trafficking, and significance for acid secretion of parietal cell *Kir4.1* and *KCNQ1* K^+ channels". *Gastroenterology* 134: 1058-1069.
- Keck et al.**, (2013). "Novel *CLCNKB* mutations causing Bartter syndrome affect channel surface expression". *Hum Mutat* 34: 1269-1278.
- Khantwal et al.**, (2016). "Revealing an outward-facing open conformational state in a *CLC* *Cl(-)/H(+)* exchange transporter". *Elife* 5.
- Kieferle et al.**, (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: 6943-6947.
- Kirejczyk et al.**, (2014). "Urinary citrate excretion in healthy children depends on age and gender". *Pediatr Nephrol* 29: 1575-1582.
- Kobayashi et al.**, (2001). "Intrarenal and cellular localization of *CLC-K2* protein in the mouse kidney". *J Am Soc Nephrol* 12: 1327-1334.
- Koch et al.**, (1993). "Evidence for genetic homogeneity in autosomal recessive generalised myotonia (Becker)". *J Med Genet* 30: 914-917.
- Koch et al.**, (1992). "The skeletal muscle chloride channel in dominant and recessive human myotonia". *Science* 257: 797-800.
- Kofuji et al.**, (1995). "Evidence that neuronal *G*-protein-gated inwardly rectifying K^+ channels are activated by *G* beta gamma subunits and function as heteromultimers". *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 6542-6546.
- Kohda et al.**, (1998). "Localization of the *ROMK* potassium channel to the apical membrane of distal nephron in rat kidney". *Kidney Int* 54: 1214-1223.
- Kompatscher et al.**, (2017). "Loss of transcriptional activation of the potassium channel *Kir5.1* by *HNF1beta* drives autosomal dominant tubulointerstitial kidney disease". *Kidney Int*.
- Kondo et al.**, (1996). "Cloning and functional expression of a novel isoform of *ROMK* inwardly rectifying ATP-dependent K^+ channel, *ROMK6* (*Kir1.1f*)". *FEBS Lett* 399: 122-126.
- Koral et al.**, (2014). "Akt recruits *Dab2* to albumin endocytosis in the proximal tubule". *Am J Physiol Renal Physiol* 307: F1380-1389.
- Kornak et al.**, (2001). "Loss of the *ClC-7* chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man". *Cell* 104: 205-215.
- Koster et al.**, (2000). "Targeted overactivity of beta cell *K(ATP)* channels induces profound neonatal diabetes". *Cell* 100: 645-654.
- Kramer et al.**, (2008). "Mechanisms of Disease: the kidney-specific chloride channels *ClCKA* and *ClCKB*, the Barttin subunit, and their clinical relevance". *Nat Clin Pract Nephrol* 4: 38-46.
- Krapivinsky et al.**, (1995). "The *G*-protein-gated atrial K^+ channel *IKACH* is a heteromultimer of two inwardly rectifying $K(+)$ -channel proteins". *Nature* 374: 135-141.
- Krapivinsky et al.**, (1998). "A novel inward rectifier K^+ channel with unique pore properties". *Neuron* 20: 995-1005.
- Kraut & Madias**, (2010). "Metabolic acidosis: pathophysiology, diagnosis and management". *Nat Rev Nephrol* 6: 274-285.
- Kriz & Kaissling**, (2008). "Structural Organization of the Mammalian Kidney". *Seldin and Geibisch's The Kidney 4ème Édition*, Elsevier. 1: 479-564.

- Kubo et al.**, (1993). "Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel". *Nature* 362: 127-133.
- Kumar & Pattnaik**, (2014). "Focus on Kir7.1: physiology and channelopathy". *Channels (Austin)* 8: 488-495.
- Kuo et al.**, (2003). "Crystal structure of the potassium channel KirBac1.1 in the closed state". *Science* 300: 1922-1926.
- Kurtz**, (2004). "Acid-Base Background". *Acid-Base case studies*. T. Publishing: 3-13.
- Kurtz & Zhu**, (2013). "Structure, function, and regulation of the SLC4 NBCe1 transporter and its role in causing proximal renal tubular acidosis". *Curr Opin Nephrol Hypertens* 22: 572-583.
- Kwon et al.**, (2013). "Regulation of aquaporin-2 in the kidney: A molecular mechanism of body-water homeostasis". *Kidney Res Clin Pract* 32: 96-102.
- Lachheb et al.**, (2008). "Kir4.1/Kir5.1 channel forms the major K⁺ channel in the basolateral membrane of mouse renal collecting duct principal cells". *Am J Physiol Renal Physiol* 294: F1398-1407.
- Laghmani et al.**, (2016). "Polyhydramnios, Transient Antenatal Bartter's Syndrome, and MAGED2 Mutations". *N Engl J Med* 374: 1853-1863.
- Laghmani et al.**, (1997). "Chronic metabolic acidosis enhances NHE-3 protein abundance and transport activity in the rat thick ascending limb by increasing NHE-3 mRNA". *J Clin Invest* 99: 24-30.
- Laghmani et al.**, (2002). "The role of endothelin in proximal tubule proton secretion and the adaptation to a chronic metabolic acidosis". *J Nephrol* 15 Suppl 5: S75-87.
- Lam et al.**, (2006). "Modulation of Kir4.2 rectification properties and pH_i-sensitive run-down by association with Kir5.1". *Biochim Biophys Acta* 1758: 1837-1845.
- Lamb et al.**, (1999). "Expression of CLCN voltage-gated chloride channel genes in human blood vessels". *J Mol Cell Cardiol* 31: 657-666.
- Lange et al.**, (2006). "CLC-7 requires Ostm1 as a beta-subunit to support bone resorption and lysosomal function". *Nature* 440: 220-223.
- Lebaudy et al.**, (2007). "K⁺ channel activity in plants: genes, regulations and functions". *FEBS Lett* 581: 2357-2366.
- Lee et al.**, (2015). "Chloride channel CLC-5 binds to aspartyl aminopeptidase to regulate renal albumin endocytosis". *Am J Physiol Renal Physiol* 308: F784-792.
- Lee et al.**, (2016). "Association of the Single Nucleotide Polymorphisms in RUNX1, DYRK1A, and KCNJ15 with Blood Related Traits in Pigs". *Asian-Australas J Anim Sci* 29: 1675-1681.
- Leichtle et al.**, (2004). "Electrophysiological and molecular characterization of the inward rectifier in juxtaglomerular cells from rat kidney". *J Physiol* 560: 365-376.
- Leisle et al.**, (2011). "CLC-7 is a slowly voltage-gated 2Cl⁻/1H⁺-exchanger and requires Ostm1 for transport activity". *EMBO J* 30: 2140-2152.
- Lemann et al.**, (2000). "Acid and mineral balances and bone in familial proximal renal tubular acidosis". *Kidney Int* 58: 1267-1277.
- Li et al.**, (2015). "Impairment of the Vascular KATP Channel Imposes Fatal Susceptibility to Experimental Diabetes Due to Multi-Organ Injuries". *J Cell Physiol* 230: 2915-2926.
- Li et al.**, (2002). "The CLC-3 chloride channel promotes acidification of lysosomes in CHO-K1 and Huh-7 cells". *Am J Physiol Cell Physiol* 282: C1483-1491.
- Li et al.**, (2016). "Dent Disease in Chinese Children and Findings from Heterozygous Mothers: Phenotypic Heterogeneity, Fetal Growth, and 10 Novel Mutations". *J Pediatr* 174: 204-210 e201.
- Liantonio et al.**, (2016). "Kidney CLC-K chloride channels inhibitors: structure-based studies and efficacy in hypertension and associated CLC-K polymorphisms". *J Hypertens* 34: 981-992.

- Lima et al.**, (2010). "ZONAB promotes proliferation and represses differentiation of proximal tubule epithelial cells". *J Am Soc Nephrol* 21: 478-488.
- Lin et al.**, (2011). "Chloride channel (Clc)-5 is necessary for exocytic trafficking of Na⁺/H⁺ exchanger 3 (NHE3)". *J Biol Chem* 286: 22833-22845.
- Lippiat & Smith**, (2012). "The CLC-5 2Cl⁻/H⁺ exchange transporter in endosomal function and Dent's disease". *Front Physiol* 3: 449.
- Lisal & Maduke**, (2008). "The CLC-0 chloride channel is a 'broken' Cl⁻/H⁺ antiporter". *Nat Struct Mol Biol* 15: 805-810.
- Lloyd et al.**, (1996). "A common molecular basis for three inherited kidney stone diseases". *Nature* 379: 445-449.
- Lloyd et al.**, (1997). "Idiopathic low molecular weight proteinuria associated with hypercalciuric nephrocalcinosis in Japanese children is due to mutations of the renal chloride channel (CLCN5)". *J Clin Invest* 99: 967-974.
- Lopatin et al.**, (1994). "Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification". *Nature* 372: 366-369.
- Lopatin et al.**, (1995). "The mechanism of inward rectification of potassium channels: 'long-pore plugging' by cytoplasmic polyamines". *J Gen Physiol* 106: 923-955.
- Lopatin & Nichols**, (1996). "[K⁺] dependence of open-channel conductance in cloned inward rectifier potassium channels (IRK1, Kir2.1)". *Biophys J* 71: 682-694.
- Lopez-Hernandez et al.**, (2011). "Mutant GlialCAM causes megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts, benign familial macrocephaly, and macrocephaly with retardation and autism". *Am J Hum Genet* 88: 422-432.
- Lopez-Novoa et al.**, (2011). "New insights into the mechanism of aminoglycoside nephrotoxicity: an integrative point of view". *Kidney Int* 79: 33-45.
- Lorenz et al.**, (2002). "Impaired renal NaCl absorption in mice lacking the ROMK potassium channel, a model for type II Bartter's syndrome". *J Biol Chem* 277: 37871-37880.
- Lorenz et al.**, (1991). "Renin release from isolated juxtaglomerular apparatus depends on macula densa chloride transport". *Am J Physiol* 260: F486-493.
- Lourdel et al.**, (2012). "CLC-5 mutations associated with Dent's disease: a major role of the dimer interface". *Pflugers Arch* 463: 247-256.
- Lourdel et al.**, (2002). "An inward rectifier K(+) channel at the basolateral membrane of the mouse distal convoluted tubule: similarities with Kir4-Kir5.1 heteromeric channels". *J Physiol* 538: 391-404.
- Lu et al.**, (2002). "Absence of small conductance K⁺ channel (SK) activity in apical membranes of thick ascending limb and cortical collecting duct in ROMK (Bartter's) knockout mice". *J Biol Chem* 277: 37881-37887.
- Ludewig et al.**, (1996). "Two physically distinct pores in the dimeric CLC-0 chloride channel". *Nature* 383: 340-343.
- Ludwig et al.**, (2005). "Functional evaluation of Dent's disease-causing mutations: implications for CLC-5 channel trafficking and internalization". *Hum Genet* 117: 228-237.
- Ludwig et al.**, (2013). "Common gating of both CLC transporter subunits underlies voltage-dependent activation of the 2Cl⁻/1H⁺ exchanger CLC-7/Ostm1". *J Biol Chem* 288: 28611-28619.
- Ludwig et al.**, (2003). "Four additional CLCN5 exons encode a widely expressed novel long CLC-5 isoform but fail to explain Dent's phenotype in patients without mutations in the short variant". *Kidney Blood Press Res* 26: 176-184.
- Luscher & Slesinger**, (2010). "Emerging roles for G protein-gated inwardly rectifying potassium (GIRK) channels in health and disease". *Nat Rev Neurosci* 11: 301-315.
- Luyckx et al.**, (1998). "Intrarenal and subcellular localization of rat CLC5". *Am J Physiol* 275: F761-769.

- Luyckx et al.**, (1999). "Diet-dependent hypercalciuria in transgenic mice with reduced CLC5 chloride channel expression". *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 12174-12179.
- Ma et al.**, (2011). "Golgi export of the Kir2.1 channel is driven by a trafficking signal located within its tertiary structure". *Cell* 145: 1102-1115.
- Ma et al.**, (2001). "Role of ER export signals in controlling surface potassium channel numbers". *Science* 291: 316-319.
- Ma et al.**, (2002). "Diverse trafficking patterns due to multiple traffic motifs in G protein-activated inwardly rectifying potassium channels from brain and heart". *Neuron* 33: 715-729.
- MacGregor et al.**, (1998). "Partially active channels produced by PKA site mutation of the cloned renal K⁺ channel, ROMK2 (kir1.2)". *Am J Physiol* 275: F415-422.
- Magen et al.**, (2010). "A loss-of-function mutation in NaPi-IIa and renal Fanconi's syndrome". *N Engl J Med* 362: 1102-1109.
- Magnusson et al.**, (2011). "Mechanisms of K(+) induced renal vasodilation in normo- and hypertensive rats in vivo". *Acta Physiol (Oxf)* 202: 703-712.
- Mahon**, (2011). "pHluorin2: an enhanced, ratiometric, pH-sensitive green fluorescent protein". *Adv Biosci Biotechnol* 2: 132-137.
- Makhina et al.**, (1994). "Cloning and expression of a novel human brain inward rectifier potassium channel". *J Biol Chem* 269: 20468-20474.
- Mamidala et al.**, (2013). "Molecular characterization of genes encoding inward rectifier potassium (Kir) channels in the bed bug (*Cimex lectularius*)". *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 164: 275-279.
- Mansour-Hendili et al.**, (2015). "Mutation Update of the CLCN5 Gene Responsible for Dent Disease 1". *Hum Mutat* 36: 743-752.
- Marcus et al.**, (2002). "KCNJ10 (Kir4.1) potassium channel knockout abolishes endocochlear potential". *Am J Physiol Cell Physiol* 282: C403-407.
- Maritzen et al.**, (2006a). "CLC-5 does not affect megalin expression and function in the thyroid". *Thyroid* 16: 725-730.
- Maritzen et al.**, (2006b). "Kidney-specific upregulation of vitamin D3 target genes in CLC-5 KO mice". *Kidney Int* 70: 79-87.
- Markovic & Dutzler**, (2007). "The structure of the cytoplasmic domain of the chloride channel CLC-Ka reveals a conserved interaction interface". *Structure* 15: 715-725.
- Martens et al.**, (2017). "Promise of SGLT2 Inhibitors in Heart Failure: Diabetes and Beyond". *Curr Treat Options Cardiovasc Med* 19: 23.
- Matsuda et al.**, (2010). "The CLC-3 Cl⁻/H⁺ antiporter becomes uncoupled at low extracellular pH". *J Biol Chem* 285: 2569-2579.
- Matsumura et al.**, (1999). "Overt nephrogenic diabetes insipidus in mice lacking the CLC-K1 chloride channel". *Nat Genet* 21: 95-98.
- McNicholas et al.**, (1998). "pH-dependent modulation of the cloned renal K⁺ channel, ROMK". *Am J Physiol* 275: F972-981.
- Mennitt et al.**, (1997). "Localization of ROMK channels in the rat kidney". *J Am Soc Nephrol* 8: 1823-1830.
- Meyer & Dutzler**, (2006). "Crystal structure of the cytoplasmic domain of the chloride channel CLC-0". *Structure* 14: 299-307.
- Meyer et al.**, (2007). "Nucleotide recognition by the cytoplasmic domain of the human chloride transporter CLC-5". *Nat Struct Mol Biol* 14: 60-67.
- Middleton et al.**, (1996). "Homodimeric architecture of a CLC-type chloride ion channel". *Nature* 383: 337-340.
- Millar et al.**, (2006). "A Kir2.3-like K⁺ conductance in mouse cortical collecting duct principal cells". *J Membr Biol* 211: 173-184.

- Miller**, (1982). "Open-state substructure of single chloride channels from *Torpedo electrophax*". *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 299: 401-411.
- Miller & White**, (1984). "Dimeric structure of single chloride channels from *Torpedo electrophax*". *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 2772-2775.
- Mo et al.**, (2004). "Coexpression of complementary fragments of *ClC-5* and restoration of chloride channel function in a *Dent's disease* mutation". *Am J Physiol Cell Physiol* 286: C79-89.
- Mohammad-Panah et al.**, (2003). "The chloride channel *ClC-4* contributes to endosomal acidification and trafficking". *J Biol Chem* 278: 29267-29277.
- Mohammad-Panah et al.**, (2009). "An essential role for *ClC-4* in transferrin receptor function revealed in studies of fibroblasts derived from *Clcn4*-null mice". *J Cell Sci* 122: 1229-1237.
- Moret et al.**, (2007). "Regulation of renal amino acid transporters during metabolic acidosis". *Am J Physiol Renal Physiol* 292: F555-566.
- Moulin et al.**, (2003). "Altered polarity and expression of H^+ -ATPase without ultrastructural changes in kidneys of *Dent's disease* patients". *Kidney Int* 63: 1285-1295.
- Mount**, (2012). "Transport of Sodium, Chloride, and Potassium". *Brenner and Rector's The Kidney* 9ème Édition. Elsevier. 1: 158-201.
- Mount**, (2014). "Thick ascending limb of the loop of Henle". *Clin J Am Soc Nephrol* 9: 1974-1986.
- Mufti et al.**, (2011). "Role of *AUF1* and *HuR* in the pH-responsive stabilization of phosphoenolpyruvate carboxykinase mRNA in LLC-PK(1)-F(+) cells". *Am J Physiol Renal Physiol* 301: F1066-1077.
- Nagami**, (1990). "Effect of bath and luminal potassium concentration on ammonia production and secretion by mouse proximal tubules perfused in vitro". *J Clin Invest* 86: 32-39.
- Nagami**, (2002). "Enhanced ammonia secretion by proximal tubules from mice receiving $NH(4)Cl$: role of angiotensin II". *Am J Physiol Renal Physiol* 282: F472-477.
- Nakajima et al.**, (2015). "*KCNJ15/Kir4.2* couples with polyamines to sense weak extracellular electric fields in galvanotaxis". *Nat Commun* 6: 8532.
- Nakamura et al.**, (2001). "An ATP-regulated and pH-sensitive inwardly rectifying $K(+)$ channel in cultured human proximal tubule cells". *Jpn J Physiol* 51: 523-530.
- Nakhoul & Batuman**, (2011). "Role of proximal tubules in the pathogenesis of kidney disease". *Contrib Nephrol* 169: 37-50.
- Namba et al.**, (1996). "*Kir2.2v*: a possible negative regulator of the inwardly rectifying K^+ channel *Kir2.2*". *FEBS Lett* 386: 211-214.
- Neagoe et al.**, (2010). "The late endosomal *ClC-6* mediates proton/chloride countertransport in heterologous plasma membrane expression". *J Biol Chem* 285: 21689-21697.
- Nettleship et al.**, (2012). "Converting monoclonal antibodies into Fab fragments for transient expression in mammalian cells". *Methods Mol Biol* 801: 137-159.
- Neusch et al.**, (2006). "Lack of the *Kir4.1* channel subunit abolishes K^+ buffering properties of astrocytes in the ventral respiratory group: impact on extracellular K^+ regulation". *J Neurophysiol* 95: 1843-1852.
- Nicar et al.**, (1987). "The preservation of urine samples for determination of renal stone risk factors". *Lab Med* 18: 382-384.
- Nie et al.**, (2005). "Expression and insights on function of potassium channel *TWIK-1* in mouse kidney". *Pflugers Arch* 451: 479-488.
- Nielsen et al.**, (2016). "Megalin and cubilin in proximal tubule protein reabsorption: from experimental models to human disease". *Kidney Int* 89: 58-67.
- Nielsen et al.**, (2007). "Endocytosis provides a major alternative pathway for lysosomal biogenesis in kidney proximal tubular cells". *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 5407-5412.

- Nielsen et al.**, (2012). "Anatomy of the Kidney". Brenner and Rector's The Kidney 9ème Édition. Elsevier. 1: 31-93.
- Niemeyer et al.**, (2001). "Modulation of the two-pore domain acid-sensitive K⁺ channel TASK-2 (KCNK5) by changes in cell volume". J Biol Chem 276: 43166-43174.
- Niemeyer et al.**, (2010). "No evidence for a role of CLCN2 variants in idiopathic generalized epilepsy". Nat Genet 42: 3.
- Niemeyer et al.**, (2009). "Voltage-dependent and -independent titration of specific residues accounts for complex gating of a ClC chloride channel by extracellular protons". J Physiol 587: 1387-1400.
- Nigam et al.**, (2015). "Handling of Drugs, Metabolites, and Uremic Toxins by Kidney Proximal Tubule Drug Transporters". Clin J Am Soc Nephrol 10: 2039-2049.
- Nijenhuis et al.**, (2006). "Acid-base status determines the renal expression of Ca²⁺ and Mg²⁺ transport proteins". J Am Soc Nephrol 17: 617-626.
- Nin et al.**, (2008). "The endocochlear potential depends on two K⁺ diffusion potentials and an electrical barrier in the stria vascularis of the inner ear". Proc Natl Acad Sci U S A 105: 1751-1756.
- Nishida et al.**, (2007). "Crystal structure of a Kir3.1-prokaryotic Kir channel chimera". EMBO J 26: 4005-4015.
- Nishida & MacKinnon**, (2002). "Structural basis of inward rectification: cytoplasmic pore of the G protein-gated inward rectifier GIRK1 at 1.8 Å resolution". Cell 111: 957-965.
- Noulin et al.**, (1999). "Two types of K(+) channels at the basolateral membrane of proximal tubule: inhibitory effect of taurine". Am J Physiol 277: F290-297.
- Novarino et al.**, (2010). "Endosomal chloride-proton exchange rather than chloride conductance is crucial for renal endocytosis". Science 328: 1398-1401.
- Nowik et al.**, (2010). "Induction of metabolic acidosis with ammonium chloride (NH₄Cl) in mice and rats--species differences and technical considerations". Cell Physiol Biochem 26: 1059-1072.
- Nowik et al.**, (2008). "Renal phosphaturia during metabolic acidosis revisited: molecular mechanisms for decreased renal phosphate reabsorption". Pflugers Arch 457: 539-549.
- Nykjaer et al.**, (1999). "An endocytic pathway essential for renal uptake and activation of the steroid 25-(OH) vitamin D₃". Cell 96: 507-515.
- O'Connell et al.**, (2005). "Phosphorylation-regulated endoplasmic reticulum retention signal in the renal outer-medullary K⁺ channel (ROMK)". Proc Natl Acad Sci U S A 102: 9954-9959.
- Oakes & Papa**, (2015). "The role of endoplasmic reticulum stress in human pathology". Annu Rev Pathol 10: 173-194.
- Obermuller et al.**, (1998). "The swelling-activated chloride channel ClC-2, the chloride channel ClC-3, and ClC-5, a chloride channel mutated in kidney stone disease, are expressed in distinct subpopulations of renal epithelial cells". J Clin Invest 101: 635-642.
- Ohira et al.**, (1997). "Gene identification in 1.6-Mb region of the Down syndrome region on chromosome 21". Genome Res 7: 47-58.
- Okamoto et al.**, (2012). "Inhibition of glucose-stimulated insulin secretion by KCNJ15, a newly identified susceptibility gene for type 2 diabetes". Diabetes 61: 1734-1741.
- Okamoto et al.**, (2010). "Identification of KCNJ15 as a susceptibility gene in Asian patients with type 2 diabetes mellitus". Am J Hum Genet 86: 54-64.
- Ookata et al.**, (2000). "Localization of inward rectifier potassium channel Kir7.1 in the basolateral membrane of distal nephron and collecting duct". J Am Soc Nephrol 11: 1987-1994.
- Otani et al.**, (2017). "Roles of organic anion transporters (OATs) in renal proximal tubules and their localization". Anat Sci Int 92: 200-206.

- Pabon et al.**, (2000). "Glycosylation of GIRK1 at Asn119 and ROMK1 at Asn117 has different consequences in potassium channel function". *J Biol Chem* 275: 30677-30682.
- Palmer & Schnermann**, (2015). "Integrated control of Na transport along the nephron". *Clin J Am Soc Nephrol* 10: 676-687.
- Palmer et al.**, (2016). "De novo and inherited mutations in the X-linked gene CLCN4 are associated with syndromic intellectual disability and behavior and seizure disorders in males and females". *Mol Psychiatry*.
- Pan et al.**, (2016). "Downregulation of inwardly rectifying potassium channel 5.1 expression in C57BL/6J cochlear lateral wall". *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 36: 406-409.
- Paninka et al.**, (2016). "Whole genome and exome sequencing realignment supports the assignment of KCNJ12, KCNJ17, and KCNJ18 paralogous genes in thyrotoxic periodic paralysis locus: functional characterization of two polymorphic Kir2.6 isoforms". *Mol Genet Genomics* 291: 1535-1544.
- Parent et al.**, (1988). "Single-channel analysis of a K channel at basolateral membrane of rabbit proximal convoluted tubule". *Am J Physiol* 254: F105-113.
- Park et al.**, (2017). "Structure of a CLC chloride ion channel by cryo-electron microscopy". *Nature* 541: 500-505.
- Paulais et al.**, (2011). "Renal phenotype in mice lacking the Kir5.1 (*Kcnj16*) K⁺ channel subunit contrasts with that observed in SeSAME/EAST syndrome". *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 10361-10366.
- Paulais et al.**, (2006). "A Na⁺- and Cl⁻-activated K⁺ channel in the thick ascending limb of mouse kidney". *J Gen Physiol* 127: 205-215.
- Paulais et al.**, (2002). "Properties of an inwardly rectifying K(+) channel in the basolateral membrane of mouse TAL". *Am J Physiol Renal Physiol* 282: F866-876.
- Pearce et al.**, (2015). "Collecting duct principal cell transport processes and their regulation". *Clin J Am Soc Nephrol* 10: 135-146.
- Pearson et al.**, (1999). "Expression of a functional Kir4 family inward rectifier K⁺ channel from a gene cloned from mouse liver". *J Physiol* 514 (Pt 3): 639-653.
- Pearson et al.**, (2006). "C-terminal determinants of Kir4.2 channel expression". *J Membr Biol* 213: 187-193.
- Peddareddygar et al.**, (2016). "Focal seizures in a patient with myotonic disorder type 2 co-segregating with a chloride voltage-gated channel 1 gene mutation: a case report". *J Med Case Rep* 10: 167.
- Pegan et al.**, (2005). "Cytoplasmic domain structures of Kir2.1 and Kir3.1 show sites for modulating gating and rectification". *Nat Neurosci* 8: 279-287.
- Perier et al.**, (1994). "Primary structure and characterization of a small-conductance inwardly rectifying potassium channel from human hippocampus". *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 6240-6244.
- Pessia et al.**, (2001). "Differential pH sensitivity of Kir4.1 and Kir4.2 potassium channels and their modulation by heteropolymerisation with Kir5.1". *J Physiol* 532: 359-367.
- Pessia et al.**, (1996). "Subunit positional effects revealed by novel heteromeric inwardly rectifying K⁺ channels". *EMBO J* 15: 2980-2987.
- Peters et al.**, (2003). "Classification and rescue of ROMK mutations underlying hyperprostaglandin E syndrome/antenatal Bartter syndrome". *Kidney Int* 64: 923-932.
- Peters et al.**, (2002). "Clinical presentation of genetically defined patients with hypokalemic salt-losing tubulopathies". *Am J Med* 112: 183-190.
- Peti-Peterdi & Harris**, (2010). "Macula densa sensing and signaling mechanisms of renin release". *J Am Soc Nephrol* 21: 1093-1096.
- Pham et al.**, (2004). "Hypertonicity increases CLC-5 expression in mouse medullary thick ascending limb cells". *Am J Physiol Renal Physiol* 287: F747-752.

- Phillips et al.**, (2012). "Surprises from an unusual CLC homolog". *Biophys J* 103: L44-46.
- Piccollo et al.**, (2010). "Proton block of the CLC-5 Cl⁻/H⁺ exchanger". *J Gen Physiol* 135: 653-659.
- Piccollo & Pusch**, (2005). "Chloride/proton antiporter activity of mammalian CLC proteins CLC-4 and CLC-5". *Nature* 436: 420-423.
- Pineda & Aghajanian**, (1997). "Carbon dioxide regulates the tonic activity of locus coeruleus neurons by modulating a proton- and polyamine-sensitive inward rectifier potassium current". *Neuroscience* 77: 723-743.
- Pinelli et al.**, (2016). "Dual regulation of the native CLC-K2 chloride channel in the distal nephron by voltage and pH". *J Gen Physiol* 148: 213-226.
- Pirozzi et al.**, (1997). "Identification of novel human WW domain-containing proteins by cloning of ligand targets". *J Biol Chem* 272: 14611-14616.
- Piwon et al.**, (2000). "CLC-5 Cl⁻-channel disruption impairs endocytosis in a mouse model for Dent's disease". *Nature* 408: 369-373.
- Planelles**, (2004). "Chloride transport in the renal proximal tubule". *Pflugers Arch* 448: 561-570.
- Plans et al.**, (2009). "Physiological roles of CLC Cl⁻/H⁺ exchangers in renal proximal tubules". *Pflugers Arch* 458: 23-37.
- Plaster et al.**, (2001). "Mutations in Kir2.1 cause the developmental and episodic electrical phenotypes of Andersen's syndrome". *Cell* 105: 511-519.
- Poet et al.**, (2006). "Lysosomal storage disease upon disruption of the neuronal chloride transport protein CLC-6". *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 13854-13859.
- Pook et al.**, (1993). "Dent's disease, a renal Fanconi syndrome with nephrocalcinosis and kidney stones, is associated with a microdeletion involving DXS255 and maps to Xp11.22". *Hum Mol Genet* 2: 2129-2134.
- Poroca et al.**, (2017). "CLC Channels and Transporters: Structure, Physiological Functions, and Implications in Human Chloride Channelopathies". *Front Pharmacol* 8: 151.
- Pountney et al.**, (2001). "Is the molecular composition of K(ATP) channels more complex than originally thought?". *J Mol Cell Cardiol* 33: 1541-1546.
- Preisig-Muller et al.**, (2002). "Heteromerization of Kir2.x potassium channels contributes to the phenotype of Andersen's syndrome". *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 7774-7779.
- Preisig & Alpern**, (1988). "Chronic metabolic acidosis causes an adaptation in the apical membrane Na/H antiporter and basolateral membrane Na(HCO₃)₃ symporter in the rat proximal convoluted tubule". *J Clin Invest* 82: 1445-1453.
- Pressey et al.**, (2010). "Distinct neuropathologic phenotypes after disrupting the chloride transport proteins CLC-6 or CLC-7/Ostm1". *J Neuropathol Exp Neurol* 69: 1228-1246.
- Prie et al.**, (2009). "Latest findings in phosphate homeostasis". *Kidney Int* 75: 882-889.
- Priori et al.**, (2005). "A novel form of short QT syndrome (SQT3) is caused by a mutation in the KCNJ2 gene". *Circ Res* 96: 800-807.
- Puissant et al.**, (2017). "Identifying Candidate Genes that Underlie Cellular pH Sensitivity in Serotonin Neurons Using Transcriptomics: A Potential Role for Kir5.1 Channels". *Front Cell Neurosci* 11: 34.
- Pusch & Zifarelli**, (2015). "CLC-5: Physiological role and biophysical mechanisms". *Cell Calcium* 58: 57-66.
- Quentin et al.**, (2004). "Regulation of the Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger AE2 in rat thick ascending limb of Henle's loop in response to changes in acid-base and sodium balance". *J Am Soc Nephrol* 15: 2988-2997.
- Raab-Graham & Vandenberg**, (1998). "Tetrameric subunit structure of the native brain inwardly rectifying potassium channel Kir 2.2". *J Biol Chem* 273: 19699-19707.

- Raggi et al.**, (2014). "Dedifferentiation and aberrations of the endolysosomal compartment characterize the early stage of nephropathic cystinosis". *Hum Mol Genet* 23: 2266-2278.
- Raja et al.**, (2002). "Responsiveness of hypercalciuria to thiazide in Dent's disease". *J Am Soc Nephrol* 13: 2938-2944.
- Rapedius et al.**, (2007). "H bonding at the helix-bundle crossing controls gating in Kir potassium channels". *Neuron* 55: 602-614.
- Reed et al.**, (2010). "CLC-5 and KIF3B interact to facilitate CLC-5 plasma membrane expression, endocytosis, and microtubular transport: relevance to pathophysiology of Dent's disease". *Am J Physiol Renal Physiol* 298: F365-380.
- Reeves & Shah**, (1994). "Activation of potassium channels contributes to hypoxic injury in proximal tubules". *J Clin Invest* 94: 2289-2294.
- Reinhart et al.**, (1995). "Characterization of carrier females and affected males with X-linked recessive nephrolithiasis". *J Am Soc Nephrol* 5: 1451-1461.
- Remer & Manz**, (1995). "Potential renal acid load of foods and its influence on urine pH". *J Am Diet Assoc* 95: 791-797.
- Ren et al.**, (2001). "Efferent arteriole tubuloglomerular feedback in the renal nephron". *Kidney Int* 59: 222-229.
- Reyes et al.**, (1998). "Cloning and expression of a novel pH-sensitive two pore domain K⁺ channel from human kidney". *J Biol Chem* 273: 30863-30869.
- Rickheit et al.**, (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: 17595-17603.
- Rosenthal & Fromm**, (2014). "Significant water absorption goes paracellular in kidney proximal tubules". *Am J Physiol Renal Physiol* 306: F51-52.
- Roth et al.**, (2012). "OATPs, OATs and OCTs: the organic anion and cation transporters of the SLCO and SLC22A gene superfamilies". *Br J Pharmacol* 165: 1260-1287.
- Rothenberger et al.**, (2007). "Angiotensin II stimulates vacuolar H⁺-ATPase activity in renal acid-secretory intercalated cells from the outer medullary collecting duct". *J Am Soc Nephrol* 18: 2085-2093.
- Roy et al.**, (2015). "Collecting duct intercalated cell function and regulation". *Clin J Am Soc Nephrol* 10: 305-324.
- Ruhe et al.**, (2017). "Overexpression of the Endosomal Anion/Proton Exchanger CLC-5 Increases Cell Susceptibility toward *Clostridium difficile* Toxins TcdA and TcdB". *Front Cell Infect Microbiol* 7: 67.
- Ryan et al.**, (2010). "Mutations in potassium channel Kir2.6 cause susceptibility to thyrotoxic hypokalemic periodic paralysis". *Cell* 140: 88-98.
- Saito et al.**, (2007). "Luminal chloride-dependent activation of endosome calcium channels: patch clamp study of enlarged endosomes". *J Biol Chem* 282: 27327-27333.
- Sakamoto et al.**, (1996). "Identification of a new outwardly rectifying Cl⁻ channel that belongs to a subfamily of the CLC Cl⁻ channels". *J Biol Chem* 271: 10210-10216.
- Sakamoto et al.**, (1999). "Cellular and subcellular immunolocalization of CLC-5 channel in mouse kidney: colocalization with H⁺-ATPase". *Am J Physiol* 277: F957-965.
- Sala-Rabanal et al.**, (2010). "Molecular mechanisms of EAST/SeSAME syndrome mutations in Kir4.1 (KCNJ10)". *J Biol Chem* 285: 36040-36048.
- Salomonsson et al.**, (2017). "Role of renal vascular potassium channels in physiology and pathophysiology". *Acta Physiol (Oxf)*.
- Sands et al.**, (2012). "Urine Concentration and Dilution". *Brenner and Rector's The Kidney 9ème Édition*. Elsevier. 1: 326-352.
- Santarius et al.**, (2006). "Supervised membrane swimming: small G-protein lifeguards regulate PIPK signalling and monitor intracellular PtdIns(4,5)P₂ pools". *Biochem J* 398: 1-13.

- Satoh et al.**, (2016). "A pure chloride channel mutant of CLC-5 causes Dent's disease via insufficient V-ATPase activation". *Pflugers Arch* 468: 1183-1196.
- Schambelan et al.**, (1987). "Adrenocortical hormone secretory response to chronic NH₄Cl-induced metabolic acidosis". *Am J Physiol* 252: E454-460.
- Scheel et al.**, (2005). "Voltage-dependent electrogenic chloride/proton exchange by endosomal CLC proteins". *Nature* 436: 424-427.
- Scheinman**, (1998). "X-linked hypercalciuric nephrolithiasis: clinical syndromes and chloride channel mutations". *Kidney Int* 53: 3-17.
- Scheinman et al.**, (1993). "Mapping the gene causing X-linked recessive nephrolithiasis to Xp11.22 by linkage studies". *J Clin Invest* 91: 2351-2357.
- Schlingmann et al.**, (2004). "Salt wasting and deafness resulting from mutations in two chloride channels". *N Engl J Med* 350: 1314-1319.
- Schmidt-Rose & Jentsch**, (1997). "Transmembrane topology of a CLC chloride channel". *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 7633-7638.
- Schneider et al.**, (2007). "Heterologous expression of the glutamine transporter SNAT3 in *Xenopus* oocytes is associated with four modes of uncoupled transport". *J Biol Chem* 282: 3788-3798.
- Scholl et al.**, (2009). "Seizures, sensorineural deafness, ataxia, mental retardation, and electrolyte imbalance (SeSAME syndrome) caused by mutations in KCNJ10". *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 5842-5847.
- Scholl et al.**, (2006). "Barttin modulates trafficking and function of CLC-K channels". *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 11411-11416.
- Schoolwerth**, (1991). "Regulation of renal ammoniogenesis in metabolic acidosis". *Kidney Int* 40: 961-973.
- Schrock et al.**, (1980). "Glutamine release from hindlimb and uptake by kidney in the acutely acidotic rat". *Biochem J* 188: 557-560.
- Schroeder et al.**, (2003). "pH-responsive stabilization of glutamate dehydrogenase mRNA in LLC-PK1-F⁺ cells". *Am J Physiol Renal Physiol* 285: F258-265.
- Schultheis et al.**, (1998). "Renal and intestinal absorptive defects in mice lacking the NHE3 Na⁺/H⁺ exchanger". *Nat Genet* 19: 282-285.
- Schwake et al.**, (2001). "An internalization signal in CLC-5, an endosomal Cl-channel mutated in dent's disease". *J Biol Chem* 276: 12049-12054.
- Sebastian et al.**, (1980). "Effect of mineralocorticoid replacement therapy on renal acid-base homeostasis in adrenalectomized patients". *Kidney Int* 18: 762-773.
- Seharaseyon et al.**, (2000). "Evidence against functional heteromultimerization of the KATP channel subunits Kir6.1 and Kir6.2". *J Biol Chem* 275: 17561-17565.
- Sekine et al.**, (2014). "Japanese Dent disease has a wider clinical spectrum than Dent disease in Europe/USA: genetic and clinical studies of 86 unrelated patients with low-molecular-weight proteinuria". *Nephrol Dial Transplant* 29: 376-384.
- Sekine et al.**, (2007). "OCRL1 mutations in patients with Dent disease phenotype in Japan". *Pediatr Nephrol* 22: 975-980.
- Sella et al.**, (2008). "Bone disease in primary hypercalciuria". *Clin Cases Miner Bone Metab* 5: 118-126.
- Sepulveda et al.**, (2015). "Molecular aspects of structure, gating, and physiology of pH-sensitive background K₂P and Kir K⁺-transport channels". *Physiol Rev* 95: 179-217.
- Seshadri et al.**, (2006). "Renal expression of the ammonia transporters, Rhbg and Rhcg, in response to chronic metabolic acidosis". *Am J Physiol Renal Physiol* 290: F397-408.
- Sethi et al.**, (2009). "Vitamin A responsive night blindness in Dent's disease". *Pediatr Nephrol* 24: 1765-1770.

- Shi et al.**, (2012). "K(ATP) channel action in vascular tone regulation: from genetics to diseases". *Sheng Li Xue Bao* 64: 1-13.
- Shuck et al.**, (1994). "Cloning and characterization of multiple forms of the human kidney ROM-K potassium channel". *J Biol Chem* 269: 24261-24270.
- Shuck et al.**, (1997). "Cloning and characterization of two K⁺ inward rectifier (Kir) 1.1 potassium channel homologs from human kidney (Kir1.2 and Kir1.3)". *J Biol Chem* 272: 586-593.
- Silva et al.**, (2000). "PTH regulates expression of ClC-5 chloride channel in the kidney". *Am J Physiol Renal Physiol* 278: F238-245.
- Silva et al.**, (2003). "The ClC-5 knockout mouse model of Dent's disease has renal hypercalciuria and increased bone turnover". *J Bone Miner Res* 18: 615-623.
- Simon et al.**, (1997). "Mutations in the chloride channel gene, CLCNKB, cause Bartter's syndrome type III". *Nat Genet* 17: 171-178.
- Simon et al.**, (1996a). "Genetic heterogeneity of Bartter's syndrome revealed by mutations in the K⁺ channel, ROMK". *Nat Genet* 14: 152-156.
- Simon et al.**, (1992). "Effects of barium and 5-(N-ethyl-N-isopropyl)-amiloride on proximal tubule ammonia transport". *Am J Physiol* 262: F36-39.
- Simon et al.**, (1996b). "Gitelman's variant of Bartter's syndrome, inherited hypokalaemic alkalosis, is caused by mutations in the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter". *Nat Genet* 12: 24-30.
- Smith & Lippiat**, (2010). "Direct endosomal acidification by the outwardly rectifying CLC-5 Cl(-)/H(+) exchanger". *J Physiol* 588: 2033-2045.
- Smith et al.**, (2009). "Characterization of Dent's disease mutations of CLC-5 reveals a correlation between functional and cell biological consequences and protein structure". *Am J Physiol Renal Physiol* 296: F390-397.
- Sohara et al.**, (2006). "Physiological roles of AQP7 in the kidney: Lessons from AQP7 knockout mice". *Biochim Biophys Acta* 1758: 1106-1110.
- Soleimani et al.**, (1987). "Stoichiometry of Na⁺-HCO₃⁻ cotransport in basolateral membrane vesicles isolated from rabbit renal cortex". *J Clin Invest* 79: 1276-1280.
- Sonawane et al.**, (2002). "Chloride concentration in endosomes measured using a ratioable fluorescent Cl⁻ indicator: evidence for chloride accumulation during acidification". *J Biol Chem* 277: 5506-5513.
- Souza-Menezes et al.**, (2007). "Absence of ClC5 in knockout mice leads to glycosuria, impaired renal glucose handling and low proximal tubule GLUT2 protein expression". *Cell Physiol Biochem* 20: 455-464.
- Stauber & Jentsch**, (2013). "Chloride in vesicular trafficking and function". *Annu Rev Physiol* 75: 453-477.
- Stauber et al.**, (2012). "Cell biology and physiology of CLC chloride channels and transporters". *Compr Physiol* 2: 1701-1744.
- Steinmeyer et al.**, (1991). "Inactivation of muscle chloride channel by transposon insertion in myotonic mice". *Nature* 354: 304-308.
- Steinmeyer et al.**, (1995). "Cloning and functional expression of rat CLC-5, a chloride channel related to kidney disease". *J Biol Chem* 270: 31172-31177.
- Stern et al.**, (2015). "Involvement of Potassium and Cation Channels in Hippocampal Abnormalities of Embryonic Ts65Dn and Tc1 Trisomic Mice". *EBioMedicine* 2: 1048-1062.
- Stobrawa et al.**, (2001). "Disruption of ClC-3, a chloride channel expressed on synaptic vesicles, leads to a loss of the hippocampus". *Neuron* 29: 185-196.
- Stockklauser & Klocker**, (2003). "Surface expression of inward rectifier potassium channels is controlled by selective Golgi export". *J Biol Chem* 278: 17000-17005.

- Stockklauser et al.**, (2001). "A sequence motif responsible for ER export and surface expression of Kir2.0 inward rectifier K(+) channels". *FEBS Lett* 493: 129-133.
- Stolting et al.**, (2015). "Carboxyl-terminal Truncations of ClC-Kb Abolish Channel Activation by Barttin Via Modified Common Gating and Trafficking". *J Biol Chem* 290: 30406-30416.
- Su & Wang**, (2016). "The expression, regulation, and function of Kir4.1 (Kcnj10) in the mammalian kidney". *Am J Physiol Renal Physiol* 311: F12-15.
- Su et al.**, (2016). "Disruption of KCNJ10 (Kir4.1) stimulates the expression of ENaC in the collecting duct". *Am J Physiol Renal Physiol* 310: F985-993.
- Subramanya & Ellison**, (2014). "Distal convoluted tubule". *Clin J Am Soc Nephrol* 9: 2147-2163.
- Sugimoto et al.**, (1990). "Immunohistochemical study of a rat membrane protein which induces a selective potassium permeation: its localization in the apical membrane portion of epithelial cells". *J Membr Biol* 113: 39-47.
- Sun et al.**, (2006). "Cloning and functional characterization of a superfamily of microbial inwardly rectifying potassium channels". *Physiol Genomics* 26: 1-7.
- Taal et al.**, (2012a). "Brenner and Rector's The Kidney 9ème Édition". 1: 728-2557.
- Taal et al.**, (2012b). "Brenner and Rector's The Kidney 9ème Édition". 1: 94-352.
- Tajima et al.**, (2007). "Barttin binds to the outer lateral surface of the ClC-K2 chloride channel". *Biochem Biophys Res Commun* 362: 858-864.
- Takahashi et al.**, (2014). "Functional coupling of chloride-proton exchanger ClC-5 to gastric H⁺,K⁺-ATPase". *Biol Open* 3: 12-21.
- Takumi et al.**, (1995). "A novel ATP-dependent inward rectifier potassium channel expressed predominantly in glial cells". *J Biol Chem* 270: 16339-16346.
- Tanemoto et al.**, (2005). "PDZ-binding and di-hydrophobic motifs regulate distribution of Kir4.1 channels in renal cells". *J Am Soc Nephrol* 16: 2608-2614.
- Tanemoto et al.**, (2002). "PSD-95 mediates formation of a functional homomeric Kir5.1 channel in the brain". *Neuron* 34: 387-397.
- Tanemoto et al.**, (2000). "In vivo formation of a proton-sensitive K⁺ channel by heteromeric subunit assembly of Kir5.1 with Kir4.1". *J Physiol* 525 Pt 3: 587-592.
- Tanemoto et al.**, (2008). "MAGI-1a functions as a scaffolding protein for the distal renal tubular basolateral K⁺ channels". *J Biol Chem* 283: 12241-12247.
- Tang et al.**, (2016). "Functional and transport analyses of CLCN5 genetic changes identified in Dent disease patients". *Physiol Rep* 4.
- Taniguchi et al.**, (1989). "K⁺ channel currents in basolateral membrane of distal convoluted tubule of rabbit kidney". *Am J Physiol* 256: F246-254.
- Tao et al.**, (2009). "Crystal structure of the eukaryotic strong inward-rectifier K⁺ channel Kir2.2 at 3.1 Å resolution". *Science* 326: 1668-1674.
- Taylor & Curthoys**, (2004). "Glutamine metabolism: Role in acid-base balance". *Biochem Mol Biol Educ* 32: 291-304.
- Tenten et al.**, (2013). "Albumin is recycled from the primary urine by tubular transcytosis". *J Am Soc Nephrol* 24: 1966-1980.
- Teulon et al.**, (1987). "A Ca²⁺-activated cation-selective channel in the basolateral membrane of the cortical thick ascending limb of Henle's loop of the mouse". *Biochim Biophys Acta* 905: 125-132.
- Theilig et al.**, (2008). "Cellular localization of THIK-1 (K(2P)13.1) and THIK-2 (K(2P)12.1) K channels in the mammalian kidney". *Cell Physiol Biochem* 21: 63-74.
- Thiemann et al.**, (1992). "A chloride channel widely expressed in epithelial and non-epithelial cells". *Nature* 356: 57-60.
- Thiery et al.**, (2000). "Developmentally regulated expression of the murine ortholog of the potassium channel KIR4.2 (KCNJ15)". *Mech Dev* 95: 313-316.

- Thomas et al.**, (1995). "Mutations in the sulfonylurea receptor gene in familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy". *Science* 268: 426-429.
- Thomas et al.**, (1996). "Mutation of the pancreatic islet inward rectifier Kir6.2 also leads to familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy". *Hum Mol Genet* 5: 1809-1812.
- Tompkins-Macdonald et al.**, (2009). "Expression of a poriferan potassium channel: insights into the evolution of ion channels in metazoans". *J Exp Biol* 212: 761-767.
- Torrecilla et al.**, (2002). "G-protein-gated potassium channels containing Kir3.2 and Kir3.3 subunits mediate the acute inhibitory effects of opioids on locus ceruleus neurons". *J Neurosci* 22: 4328-4334.
- Torres et al.**, (2012). "Tolvaptan in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease". *N Engl J Med* 367: 2407-2418.
- Traverso et al.**, (2003). "Gating competence of constitutively open CLC-0 mutants revealed by the interaction with a small organic Inhibitor". *J Gen Physiol* 122: 295-306.
- Tsuchiya et al.**, (1992). "ATP is a coupling modulator of parallel Na,K-ATPase-K-channel activity in the renal proximal tubule". *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 6418-6422.
- Tucker & Blantz**, (1978). "Determinants of proximal tubular reabsorption as mechanisms of glomerulotubular balance". *Am J Physiol* 235: F142-150.
- Tucker et al.**, (1997). "Truncation of Kir6.2 produces ATP-sensitive K⁺ channels in the absence of the sulphonylurea receptor". *Nature* 387: 179-183.
- Tucker et al.**, (2000). "pH dependence of the inwardly rectifying potassium channel, Kir5.1, and localization in renal tubular epithelia". *J Biol Chem* 275: 16404-16407.
- Uchida et al.**, (1994). "Molecular cloning of a chloride channel that is regulated by dehydration and expressed predominantly in kidney medulla". *J Biol Chem* 269: 19192.
- Uchida et al.**, (1995). "Localization and functional characterization of rat kidney-specific chloride channel, ClC-K1". *J Clin Invest* 95: 104-113.
- Vallon**, (2011). "The proximal tubule in the pathophysiology of the diabetic kidney". *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 300: R1009-1022.
- Vallon et al.**, (2001). "Role of KCNE1-dependent K⁺ fluxes in mouse proximal tubule". *J Am Soc Nephrol* 12: 2003-2011.
- van den Hove et al.**, (2006). "The loss of the chloride channel, ClC-5, delays apical iodide efflux and induces a euthyroid goiter in the mouse thyroid gland". *Endocrinology* 147: 1287-1296.
- Vandewalle et al.**, (2001). "Tissue distribution and subcellular localization of the ClC-5 chloride channel in rat intestinal cells". *Am J Physiol Cell Physiol* 280: C373-381.
- Veeramah et al.**, (2013). "Exome sequencing reveals new causal mutations in children with epileptic encephalopathies". *Epilepsia* 54: 1270-1281.
- Verrey et al.**, (2009). "Kidney amino acid transport". *Pflugers Arch* 458: 53-60.
- Vidotti et al.**, (2008). "Effect of long-term type 1 diabetes on renal sodium and water transporters in rats". *Am J Nephrol* 28: 107-114.
- Villa-Bellosta et al.**, (2009). "The Na⁺-Pi cotransporter PiT-2 (SLC20A2) is expressed in the apical membrane of rat renal proximal tubules and regulated by dietary Pi". *Am J Physiol Renal Physiol* 296: F691-699.
- Villanueva et al.**, (2015). "Cleft Palate, Moderate Lung Developmental Retardation and Early Postnatal Lethality in Mice Deficient in the Kir7.1 Inwardly Rectifying K⁺ Channel". *PLoS One* 10: e0139284.
- Wade et al.**, (2011). "Differential regulation of ROMK (Kir1.1) in distal nephron segments by dietary potassium". *Am J Physiol Renal Physiol* 300: F1385-1393.
- Wade et al.**, (2006). "WNK1 kinase isoform switch regulates renal potassium excretion". *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 8558-8563.

- Wagner et al.**, (2016). "Proximal Tubules Have the Capacity to Regulate Uptake of Albumin". *J Am Soc Nephrol* 27: 482-494.
- Waldegger et al.**, (2002). "Barttin increases surface expression and changes current properties of CLC-K channels". *Pflugers Arch* 444: 411-418.
- Waldegger & Jentsch**, (2000). "From tonus to tonicity: physiology of CLC chloride channels". *J Am Soc Nephrol* 11: 1331-1339.
- Wang et al.**, (2005). "CLC-5: role in endocytosis in the proximal tubule". *Am J Physiol Renal Physiol* 289: F850-862.
- Wang et al.**, (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: 2937-2945.
- Wang et al.**, (2017). "Genetic Variants Identified from Epilepsy of Unknown Etiology in Chinese Children by Targeted Exome Sequencing". *Sci Rep* 7: 40319.
- Wang & Giebisch**, (1991). "Dual modulation of renal ATP-sensitive K⁺ channel by protein kinases A and C". *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 9722-9725.
- Wang et al.**, (1994). "A novel approach allows identification of K channels in the lateral membrane of rat CCD". *Am J Physiol* 266: F813-822.
- Wang et al.**, (2010). "Regulation and function of potassium channels in aldosterone-sensitive distal nephron". *Curr Opin Nephrol Hypertens* 19: 463-470.
- Wanner et al.**, (2016). "Empagliflozin and Progression of Kidney Disease in Type 2 Diabetes". *N Engl J Med* 375: 323-334.
- Warth et al.**, (2004). "Proximal renal tubular acidosis in TASK2 K⁺ channel-deficient mice reveals a mechanism for stabilizing bicarbonate transport". *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 8215-8220.
- Wartosch et al.**, (2009). "Lysosomal degradation of endocytosed proteins depends on the chloride transport protein CLC-7". *FASEB J* 23: 4056-4068.
- Weiner & Verlander**, (2012). "Renal Acidification Mechanisms". *Brenner and Rector's The Kidney* 9ème Édition. Elsevier. 1: 293-325.
- Weiner & Verlander**, (2013). "Renal ammonia metabolism and transport". *Compr Physiol* 3: 201-220.
- Weinert et al.**, (2014). "Transport activity and presence of CLC-7/Ostm1 complex account for different cellular functions". *EMBO Rep* 15: 784-791.
- Weinert et al.**, (2010). "Lysosomal pathology and osteopetrosis upon loss of H⁺-driven lysosomal Cl⁻ accumulation". *Science* 328: 1401-1403.
- Weinreich & Jentsch**, (2001). "Pores formed by single subunits in mixed dimers of different CLC chloride channels". *J Biol Chem* 276: 2347-2353.
- Weinstein**, (1988). "Modeling the proximal tubule: complications of the paracellular pathway". *Am J Physiol* 254: F297-305.
- Weisz**, (2003). "Acidification and protein traffic". *Int Rev Cytol* 226: 259-319.
- Wellhauser et al.**, (2010). "CLC transporters: discoveries and challenges in defining the mechanisms underlying function and regulation of CLC-5". *Pflugers Arch* 460: 543-557.
- Welling**, (1997). "Primary structure and functional expression of a cortical collecting duct Kir channel". *Am J Physiol* 273: F825-836.
- Welling**, (2016). "Roles and Regulation of Renal K Channels". *Annu Rev Physiol* 78: 415-435.
- Westrick et al.**, (2013). "Axial compartmentation of descending and ascending thin limbs of Henle's loops". *Am J Physiol Renal Physiol* 304: F308-316.
- Whorton & MacKinnon**, (2011). "Crystal structure of the mammalian GIRK2 K⁺ channel and gating regulation by G proteins, PIP₂, and sodium". *Cell* 147: 199-208.
- Whorton & MacKinnon**, (2013). "X-ray structure of the mammalian GIRK2-beta gamma G-protein complex". *Nature* 498: 190-197.

- Williams et al.**, (2010). "Molecular basis of decreased Kir4.1 function in SeSAME/EAST syndrome". *J Am Soc Nephrol* 21: 2117-2129.
- Wong et al.**, (2017). "Phenotypic variability of Dent disease in a large New Zealand kindred". *Pediatr Nephrol* 32: 365-369.
- Wu et al.**, (2004). "An inwardly rectifying potassium channel in apical membrane of Calu-3 cells". *J Biol Chem* 279: 46558-46565.
- Wu et al.**, (2003). "Modeling study of human renal chloride channel (hCLC-5) mutations suggests a structural-functional relationship". *Kidney Int* 63: 1426-1432.
- Xu et al.**, (2000). "Modulation of kir4.1 and kir5.1 by hypercapnia and intracellular acidosis". *J Physiol* 524 Pt 3: 725-735.
- Xu et al.**, (1997). "Localization of the ROMK protein on apical membranes of rat kidney nephron segments". *Am J Physiol* 273: F739-748.
- Yamamoto et al.**, (2015). "Single nucleotide variations in CLCN6 identified in patients with benign partial epilepsies in infancy and/or febrile seizures". *PLoS One* 10: e0118946.
- Yang et al.**, (1995). "Determination of the subunit stoichiometry of an inwardly rectifying potassium channel". *Neuron* 15: 1441-1447.
- Yang et al.**, (2008). "Expression of inwardly rectifying potassium channel subunits in native human retinal pigment epithelium". *Exp Eye Res* 87: 176-183.
- Yao et al.**, (2002). "Expression of KCNA10, a voltage-gated K channel, in glomerular endothelium and at the apical membrane of the renal proximal tubule". *J Am Soc Nephrol* 13: 2831-2839.
- Yaxley & Pirrone**, (2016). "Review of the Diagnostic Evaluation of Renal Tubular Acidosis". *Ochsner J* 16: 525-530.
- Ye et al.**, (2016). "The K⁺ channel KIR2.1 functions in tandem with proton influx to mediate sour taste transduction". *Proc Natl Acad Sci U S A* 113: E229-238.
- Yoo et al.**, (2003). "Cell surface expression of the ROMK (Kir 1.1) channel is regulated by the aldosterone-induced kinase, SGK-1, and protein kinase A". *J Biol Chem* 278: 23066-23075.
- Yu**, (2015). "Claudins and the kidney". *J Am Soc Nephrol* 26: 11-19.
- Yu et al.**, (2016). "Rare Exome Sequence Variants in CLCN6 Reduce Blood Pressure Levels and Hypertension Risk". *Circ Cardiovasc Genet* 9: 64-70.
- Yuan et al.**, (2015). "Potassium channel KCNJ15 is required for histamine-stimulated gastric acid secretion". *Am J Physiol Cell Physiol* 309: C264-270.
- Zdebik et al.**, (2008). "Determinants of anion-proton coupling in mammalian endosomal CLC proteins". *J Biol Chem* 283: 4219-4227.
- Zerangue et al.**, (1999). "A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K(ATP) channels". *Neuron* 22: 537-548.
- Zhang et al.**, (2007). "Renal iron metabolism: transferrin iron delivery and the role of iron regulatory proteins". *J Am Soc Nephrol* 18: 401-406.
- Zhang et al.**, (2011). "The disruption of central CO₂ chemosensitivity in a mouse model of Rett syndrome". *Am J Physiol Cell Physiol* 301: C729-738.
- Zhang et al.**, (2015). "KCNJ10 (Kir4.1) is expressed in the basolateral membrane of the cortical thick ascending limb". *Am J Physiol Renal Physiol* 308: F1288-1296.
- Zhang et al.**, (2017). "ENaC and ROMK activity are inhibited in the DCT2/CNT of TgWnk4PHAI mice". *Am J Physiol Renal Physiol* 312: F682-F688.
- Zhang et al.**, (2014). "KCNJ10 determines the expression of the apical Na-Cl cotransporter (NCC) in the early distal convoluted tubule (DCT1)". *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 11864-11869.
- Zheng et al.**, (2007). "Cellular distribution of the potassium channel KCNQ1 in normal mouse kidney". *Am J Physiol Renal Physiol* 292: F456-466.

- Zhou et al.**, (2007). "Expression of ATP sensitive K^+ channel subunit Kir6.1 in rat kidney". *Eur J Histochem* 51: 43-51.
- Zhu et al.**, (1999). "Suppression of Kir2.3 activity by protein kinase C phosphorylation of the channel protein at threonine 53". *J Biol Chem* 274: 11643-11646.
- Zhuo et al.**, (1986). "Modulation of proximal tubular reabsorption by angiotensin II". *Clin Exp Pharmacol Physiol* 13: 277-281.
- Zhuo & Li**, (2013). "Proximal nephron". *Compr Physiol* 3: 1079-1123.
- Zifarelli**, (2015). "A tale of two CLCs: biophysical insights toward understanding ClC-5 and ClC-7 function in endosomes and lysosomes". *J Physiol* 593: 4139-4150.
- Zifarelli et al.**, (2012). "On the mechanism of gating charge movement of ClC-5, a human $Cl(-)/H(+)$ antiporter". *Biophys J* 102: 2060-2069.
- Zifarelli & Pusch**, (2009a). "Conversion of the 2 $Cl(-)/1 H^+$ antiporter ClC-5 in a $NO_3(-)/H^+$ antiporter by a single point mutation". *EMBO J* 28: 175-182.
- Zifarelli & Pusch**, (2009b). "Intracellular regulation of human ClC-5 by adenine nucleotides". *EMBO Rep* 10: 1111-1116.
- Zitron et al.**, (2004). "Human cardiac inwardly rectifying current IKir2.2 is upregulated by activation of protein kinase A". *Cardiovasc Res* 63: 520-527.
- Zobel et al.**, (2003). "Molecular dissection of the inward rectifier potassium current (IK1) in rabbit cardiomyocytes: evidence for heteromeric co-assembly of Kir2.1 and Kir2.2". *J Physiol* 550: 365-372.
- Zweifach et al.**, (1991). "A Ca-activated K channel from rabbit renal brush-border membrane vesicles in planar lipid bilayers". *Am J Physiol* 261: F187-196.

ANNEXES

I. Nouveaux aspects physiopathologiques de la Maladie de Dent

Les résultats de l'analyse fonctionnelle de la mutation pathogène E211G de ClC-5 s'intègrent dans un contexte de remise en question de l'origine cellulaire de la physiopathologie de la MD. C'est pourquoi, au cours de ma thèse, je me suis intéressé à la possibilité que la MD puisse être non seulement le résultat d'un défaut de la voie endo-lysosomale liée à l'absence de ClC-5 (qui affecte l'endocytose des PBPM dans le TP *via* le pH et/ou le chlorure endosomal), mais aussi le résultat d'une dédifférenciation progressive de la cellule proximale.

Dans le but de caractériser la ou les origines de ces dédifférenciations, j'ai rédigé un projet scientifique intitulé "*Oxidative stress and endoplasmic reticulum stress in Dent's disease*" (voir section Annexes II). Envoyé à la Fondation du Rein dans le cadre de l'appel à projet de "*Recherche translationnelle en néphrologie*", ce document m'a permis d'obtenir le "*Prix Jeune Chercheur*" 2016 de la Fondation et 30.000 € de financement répartis sur 2 ans. Le contexte scientifique de cette étude, ses hypothèses et ses objectifs sont brièvement abordés ici.

1. La Maladie de Dent et la dédifférenciation des cellules proximales

Chez les patients Dent ou les souris invalidées pour *Clcn5*, l'ultrastructure de la cellule proximale est conservée [voir Figure 4]. En revanche, ces cellules montrent des signaux moléculaires de dédifférenciation. En effet, certains transporteurs et récepteurs tels que Napi-IIa, NHE3, GLUT2, la V-ATPase, la Mégaline et la Cubiline ont un adressage subcellulaire ou une expression transcriptionnelle altérée. Certains de ces phénomènes sont considérés secondaires au défaut d'endocytose des PBPM du TP (voir Section Introduction C.III.2). Toutefois, d'autres ne sont pas expliqués, comme l'expression basolatérale de la V-ATPase chez les patients Dent, la réduction dès le niveau transcriptionnel du transporteur basolatéral GLUT2 ou encore la réduction de l'expression de la Mégaline (Piwon *et al.*, 2000; Christensen *et al.*, 2003; Moulin *et al.*, 2003; Souza-Menezes *et al.*, 2007). Chez les souris invalidées pour *Clcn5*, des études transcriptomiques ont montré que plus de 700 gènes, encodants des transporteurs, des enzymes, des protéines matricielles ou des protéines de signalisation intracellulaire pouvaient être transcrits différemment en l'absence de ClC-5. Ces modulations ne sont pas expliquées et beaucoup de ces gènes ne sont pas impliqués dans l'endocytose ou le fonctionnement de la voie endo-lysosomale (Maritzen *et al.*, 2006b; Guggino, 2009).

Ces phénomènes de dédifférenciation pourraient intervenir dans la sévérité de la MD. Par exemple, la disparition de GLUT2 interviendrait dans l'apparition de la glycosurie (Souza-Menezes *et al.*, 2007). Plus important, une perte progressive de la Mégaline au cours d'une dédifférenciation pourrait expliquer l'aggravation au cours du temps de la PiBPM chez les souris invalidées pour *Clcn5* (Gabriel *et al.*, 2017). Inversement, le groupe d'Olivier Devuyst a montré que la greffe de moelle osseuse issue de souris sauvages chez des souris invalidées pour *Clcn5* améliore le phénotype des souris invalidées et rétablit partiellement l'expression proximale de la Mégaline. L'explication viendrait de contacts entre des cellules greffées différenciées en cellules proximales et des cellules dédifférenciées du TP (Gabriel *et al.*, 2017).

2. Existence et origine d'un stress oxydatif dans la Maladie de Dent

L'origine de la dédifférenciation des cellules du TP dans la MD est inconnue. Pour plusieurs raisons, elle est imputée (au moins en partie) à un stress oxydatif proximal. Initialement, l'idée vient de l'étude de la cystinose: cette maladie proximale de surcharge lysosomale en cystine, qui est la première cause génétique de syndrome de Fanconi, progresse en même temps qu'apparaissent des phénomènes de dédifférenciation et de stress oxydatif (Raggi *et al.*, 2014; Elmonem *et al.*, 2016). Plus important, un stress oxydatif a été mis en évidence dans le tissu rénal de patients Dent et de souris invalidées pour *Clcn5*. Il se traduit par l'expression transcriptionnelle et/ou protéique rénale ou la présence urinaire de marqueurs du stress oxydatif tels que la superoxyde dismutase 1, la thioredoxine et l'ACIII. Ces phénomènes s'accompagnent d'une prolifération cellulaire, qui ferait suite à une dédifférenciation (Gailly *et al.*, 2008). Enfin, *in vitro* un tel stress oxydatif peut conduire à une dédifférenciation des cellules proximales ainsi qu'à une répression de l'expression de la Mégaline *via* le facteur de transcription ZONAB (Lima *et al.*, 2010; Raggi *et al.*, 2014; Devuyst & Luciani, 2015).

Il est donc probable qu'un stress oxydatif des cellules proximales conduise ou participe à la dédifférenciation des cellules du TP lors de la MD. Toutefois, les mécanismes à l'origine de ce stress oxydatif sont inconnus. Une première hypothèse consiste à considérer le stress oxydatif comme une conséquence de l'albuminurie. Toutefois, en l'absence de Mégaline, la PiBPM est forte mais l'ACIII peu présente dans l'urine (Gailly *et al.*, 2008). Le stress oxydatif pourrait aussi être secondaire au dysfonctionnement lysosomal observé chez les souris invalidées pour *Clcn5*, qui en limitant l'autophagie des mitochondries aboutirait à la formation de radicaux libres (Christensen *et al.*, 2003; Nielsen *et al.*, 2007; Devuyst & Luciani, 2015).

3. Rôle d'un stress du réticulum endoplasmique dans la Maladie de Dent ?

Le dysfonctionnement de la voie endo-lysosomale pourrait être la cause principale du stress oxydatif présent dans la MD chez les patients porteurs de délétions larges ou les modèles murins invalidés. Ce stress oxydatif serait à l'origine d'une dédifférenciation progressive des cellules proximales, qui contribuerait à la présentation et l'évolution de la MD. Toutefois, il convient de rappeler que l'absence de CLC-5 ne provoque pas de réelle surcharge lysosomale et qu'inversement, la surcharge des lysosomes proximaux consécutive à l'absence de CLC-7 ne provoque pas de phénotype rénal (Moulin *et al.*, 2003; Wartosch *et al.*, 2009).

Par ailleurs, le travail d'analyse des mutations pathogènes de *CLCN5* du laboratoire a conduit à la conclusion que plus de 60 % des mutations ponctuelles de CLC-5 conduisent à sa rétention dans le RE (voir section Introduction C.III.1.b). Ces mutants de classe 1 sont correctement exprimés mais sous une forme immature. Cette observation m'a fait émettre l'hypothèse qu'un stress du RE, caractérisé par une activation des voies de signalisation de l'UPR (*Unfolded Protein Response*) en réponse à un afflux de protéines mal-conformées dans la lumière du RE, pouvait avoir lieu chez les patients porteurs de ces mutations (Hetz, 2012; Oakes & Papa, 2015). De manière intéressante, un tel stress du RE pourrait contribuer à l'apparition du stress oxydatif dans la MD, directement ou *via* une augmentation de la production de radicaux libres par les mitochondries (Chaudhari *et al.*, 2014). En l'absence d'une rétention de CLC-5 (chez les patients porteurs de mutation de classe 2, classe 3 ou de délétions larges), un stress du RE pourrait aussi être provoqué par la protéinurie ou l'albuminurie (Fang *et al.*, 2013; El Karoui *et al.*, 2016). La nécessité d'endocyter l'albumine luminale pour stimuler la voie UPR pourrait, comme pour les troubles de formation de la vitamine D, être le résultat d'une balance entre protéinurie et endocytose résiduelle (voir section Introduction C.III.2.c).

L'objectif du projet est d'évaluer si le stress du RE est impliqué dans la physiopathologie de la MD, l'apparition du stress oxydatif, la dédifférenciation cellulaire et si, *in fine*, il impacte le phénotype rénal. Pour cela, par l'intermédiaire de collaborations avec des plateformes du Muséum National d'Histoire Naturelle et de l'Institut Cochin à Paris, le laboratoire est actuellement engagé dans la création de lignées de souris invalidées et porteuses de mutations classe 1 (N340K) ou de classe 3 (Y272C) de *Clcn5*. Ces souris seront phénotypées et comparées par Imène Sakhi dans le cadre d'une thèse de l'ED394 financée par le Ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation (2017-2020).

II. Projet scientifique de la Fondation du Rein

Résumé du projet

Dent's disease is an X-linked recessive renal tubular disorder characterized by low-molecular-weight proteinuria, hypercalciuria, nephrolithiasis, nephrocalcinosis, and progressive renal failure, inconstantly associated with other proximal tubular dysfunctions. Inactivating mutations of *CLCN5*, the gene encoding the $2\text{Cl}^-/\text{H}^+$ exchanger CIC-5, have been reported in 60% of patients with Dent's disease. In kidneys, CIC-5 is predominantly expressed at the apical membrane of proximal tubule cells and at the membranes of early endosomes. It plays a key role in endosomal acidification by providing a chloride current shunt essential for efficient accumulation of protons by the vacuolar H^+ -ATPase. One explanation to proximal tubule dysfunction is that loss-of-function of CIC-5 in proximal tubule cells might impair endosomal / lysosomal function by reducing endosomal acidification and/or chloride accumulation in the early endosomes. The resulting defective endosomal / lysosomal pathway might induce delayed recycling of apical proteins involved in receptor-mediated endocytosis and might thus disrupt autophagy. As a result, an oxidative stress occurs and leads to apical dedifferentiation and to cell proliferation. Furthermore, by collaborating with the Human Genetics Department at the Hôpital Européen Georges Pompidou in Paris, my laboratory has screened the effects of 25 *CLCN5* mutations in terms of electrical activity, protein subcellular localization, maturation and stability in *X. laevis* and HEK293 cells. It has demonstrated that about 60% of the CIC-5 mutants induce defective protein processing and are retained in the endoplasmic reticulum (ER). By using a CRISPR/Cas9 approach allowing the generation of a knock-in mouse model with a CIC-5 pathogenic mutation inducing ER retention (N340K) and by using patients renal biopsies, my research program is aimed at gaining new insights in proximal tubule cells dysfunctions (especially ER stress and oxidative stress) involved during Dent's disease. Moreover, this mouse model will represent an essential step to develop rational therapeutic strategies. In this view, it will allow to perform further *in vivo* experiments aimed to rescue proximal tubule cell function by chaperones strategy.

Description du projet de recherche

1. Title of the project:

Oxidative stress and endoplasmic reticulum stress in Dent's disease

2. Background:

Dent's disease represents a heterogeneous group of X-linked inherited disorders sharing a renal phenotype characterized mainly by low-molecular-weight protein urinary loss, hypercalciuria and nephrocalcinosis, inconstantly associated with other proximal tubule dysfunctions leading to progressive renal failure. Related to Fanconi syndrome, it tends to be diagnosed in childhood or early adult life and progress until end-stage renal failure between the third and fifth decades of life in 30–80% of affected males¹. Inactivating mutations of *CLCN5* are present in approximately 60% of the patients with Dent's disease type 1. Recently, 15% of patients, exhibiting an extra-renal phenotype including mild mental-retardation, cataract and hypotonia (previously diagnosed as affected by the "oculocerebrorenal syndrome") were classified as Dent's disease type 2. In these patients, mutations in the *OCRL1* gene, encoding a Phospho-Inositide phosphatase, were identified^{2,3}. Finally, 25% of patients with Dent's disease do not harbor mutations in either of these genes, suggesting an involvement of other genes⁴.

The *CLCN5* gene encodes CIC-5, an electrogenic $2\text{Cl}^-/\text{H}^+$ exchanger which possesses 18 alpha-helix and functions as homodimers with separate ion pathways within each subunit. CIC-5 is strongly expressed in the kidney, and at lower levels in the intestine, the adrenal gland, the testis, the thyroid and the liver^{5,6}. In the human and mouse kidneys, CIC-5 expression has been observed in the proximal tubule cells, and at lower levels in the alpha-intercalated cells of the collecting duct and in the thick ascending limb of Henle's loop^{7,8}.

Because CLC-5 colocalizes with the V-type H⁺-ATPase in renal proximal tubule subapical endosomes, the central hypothesis advanced to explain the endocytosis defect in Dent's disease is that CLC-5 may provide a chloride shunt conductance in early endosomes, permitting intraluminal acidification by V-type H⁺-ATPase and thus normal endosomal / lysosomal function. Consequently, loss-of-function of CLC-5 would impair endosomal acidification, a crucial step in normal endosomal function and recycling of endocytic vesicles^{5,8-10}. Alternatively, Novarino et al. paper has recently provided evidence that modulation of the chloride concentration in early endosomes during proton transport by the exchange activity of CLC-5 may actually play a crucial role in endocytosis, independently of the endosomal acidification¹¹. Finally, a small fraction of CLC-5 is also present at the apical surface of proximal tubule cells where it may play a crucial role in mediating protein-protein interactions required for receptor-mediated-endocytosis¹². In the same vein, CLC-5 has been shown to interact directly or indirectly with different proteins involved in receptor-mediated endocytosis such as Cofilin, KIF3B, WWP2, Nedd4.2 and Megalin/Cubilin/Amnioless complex⁴.

More recently, my laboratory has been involved in the systematic screening of 25 CLCN5 missense and nonsense mutations in collaboration with the Human Genetics Department at the Hôpital Européen Georges Pompidou (Paris, France). These mutations have been heterologously expressed in *X. laevis* oocytes and in HEK293 cells, in order to further elucidate their functional consequences. To characterize the conductive properties of the mutated CLC-5, electrophysiological analyses by two-electrode voltage-clamp on *X. laevis* oocytes have been performed. The protein subcellular localization has been found out by luminescence assays on *X. laevis* oocytes and immunofluorescence analysis on HEK293 cells, and protein maturation and stability have been characterized on HEK293 cells by using western-blot and pulse-chase analysis. On the basis of functional data, the CLCN5 mutations have been divided into three different classes (Figure 1).

CLCN5 class 1 mutants represent the most usual CLC-5 defect (60% of the mutations), where unfolded and misprocessed CLC-5 exchangers are retained within the endoplasmic reticulum (ER) under a core-glycosylated form. As a result, mutated CLC-5 are incompletely targeted for early degradation by quality control systems. Class 2 mutants represent 20% of the mutations: they display delayed protein processing and reduced stability of CLC-5. This induces lower cell surface expression and currents of CLC-5 mutants, despite normal trafficking and maturation. Class 3 mutants (20% of the mutations) do not alter the trafficking or stability of CLC-5 at the cell surface and the early endosomes but induce altered electrical activity¹³⁻¹⁵.

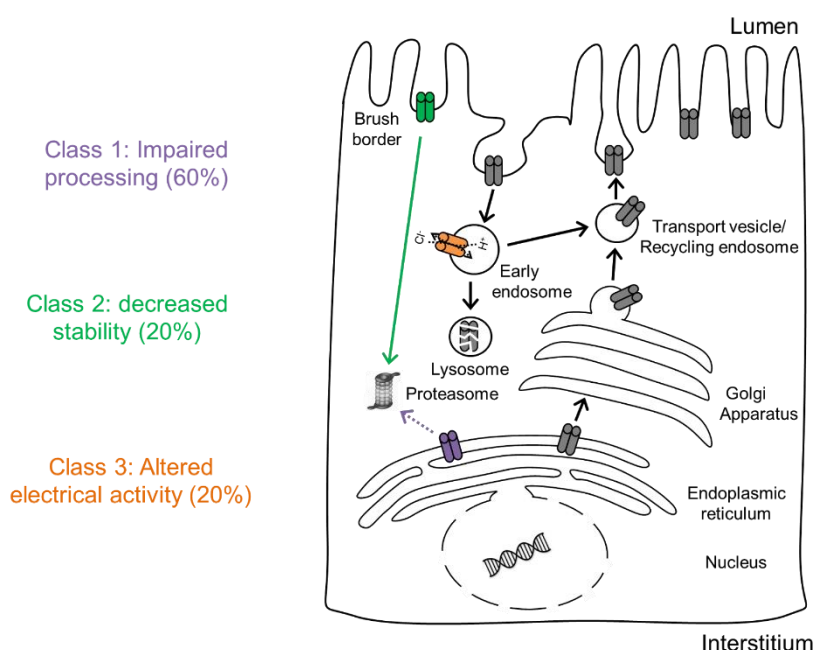


Figure 1: Molecular mechanisms responsible for the loss-of-function of CLC-5 mutated forms occurring during Dent's disease in proximal tubule cells.

Despite the recent progress described above, the precise molecular mechanisms and pathogenic pathways involved in proximal tubule dysfunction in Dent's disease remain largely unknown. One possibility to explain the large proximal tubule defect is that in these cells, impaired endosomal / lysosomal function consecutive to loss-of-function of CIC-5 might compromise albumin-mediated cell prevention against reactive-oxygen species (ROS) damages and autophagy mechanism^{16,17}. Many studies have suggested that defective autophagy sensitizes cells to toxic injuries¹⁸ and facilitate the appearance of oxidative stress. In this view, Gailly et al. have recently reported increased oxidative stress in proximal tubule cells from CIC-5 KO mice and from three patients with Dent's disease¹⁹. These changes might, in turn, induce cell apical dedifferentiation (including repression of expression of the endocytic receptors megalin and cubilin) and cell proliferation⁴.

However, CIC-5 dysfunction might induce other perturbations in proximal tubule cells. As mentioned above, 60% of the CLCN5 mutations lead to ER retention (class 1 mutations). On the one hand, this might lead to a buildup of misfolded proteins in the ER, followed by an ER stress response named UPR (unfolded protein response), as it is observed in numerous genetic and environmental insults such as diabetes, Creutzfeldt-Jacob disease or many forms of cancer²⁰. Moreover, it was demonstrated that ER stress can contribute to renal proximal injury by deregulating lipid homeostasis, a phenomenon which is reminiscent of OCRL1 mutation consequences²¹. On the other hand, independently of a ER retained CIC-5 mutant, oxidative stress could lead by itself to an alteration in the redox status of the ER that disrupt protein disulfide bonds formation and cause ER stress²⁰. Finally, ER stress response might in turn induce oxidative stress in proximal tubule cells as it has been described for example for the diseases cited above²². Therefore, the exact consequences for CIC-5 ER retention and its possible link with oxidative stress observed in the kidneys of patients with Dent's disease must be clearly understood.

In so far, only one study investigated the effect of CIC-5 ER retention on ER stress response²³ and showed that two CIC-5 class 1 mutants (C221R and R718X) do not elicit ER stress response in transiently transfected cells and are well targeted to the proteasome for degradation. At first glance, this conclusion of Bear et al. appears contradictory with our hypothesis. But firstly, we have previously demonstrated that these two CIC-5 mutants only poorly accumulate in ER in comparison to the other class 1 mutants¹³. Secondly, transient transfection is based on a rapid uptake of cDNA which is transcribed into cRNA under control of an artificial and powerful promoter. That may trigger an unbalance between protein-folding demand and ER capacity leading to an ER stress response²⁴. In addition, authors have examined the consequences of these two mutants 24 h after transient transfection in HEK293 and OK cells whereas sufficient CIC-5 expression requires at least 48 h in these cells^{13,14,25,26}.

Therefore, it is essential to be able to examine *in vivo* and over a long time the implications of a misfolded CIC-5 on the proximal tubule function. One way to address this issue is to generate a Knock-In (KI) mouse stably carrying a very good representative class 1 pathogenic missense mutation, such as N340K¹⁴. No current and plasma membrane expression were detectable in *X. laevis* oocytes expressing N340K CIC-5 mutant and a large accumulation of core-glycosylated form occurred in ER of HEK293 cells (Figure 2)¹⁴.

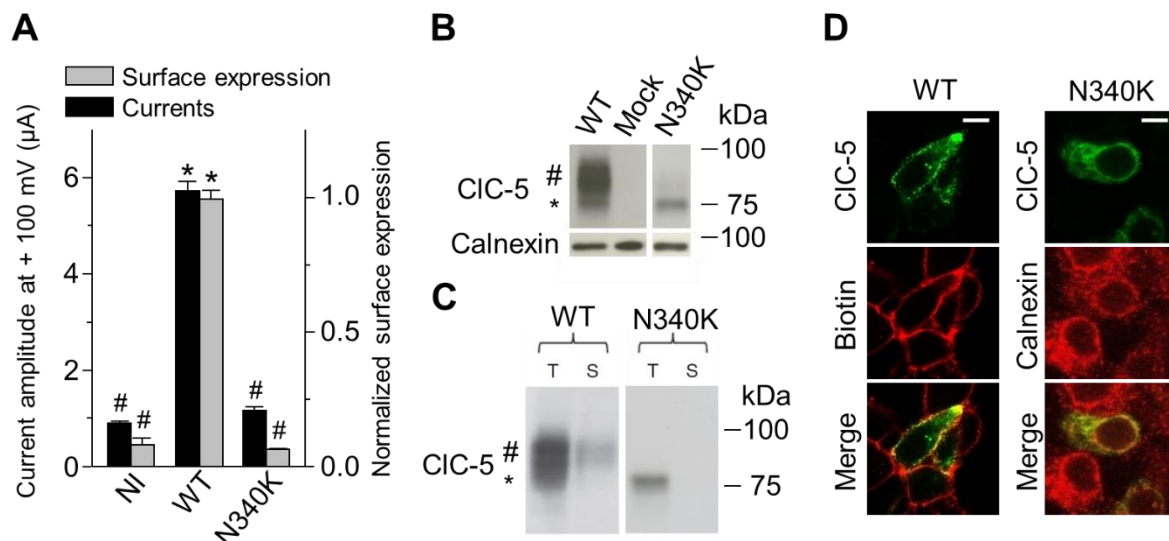


Figure 2. ER retention of the pathogenic CIC-5 N340K mutation.

A. Absence of Current/cell surface expression of N340K CIC-5 in *X. laevis* oocytes by two-electrode voltage-clamp and luminescent assays. Controls oocytes (NI) and N340K CIC-5 oocytes are similar and both different compared with Wild-Type CIC-5 (WT) oocytes. **B.** Western blot analysis of CIC-5 total expression levels in transfected HEK293 cells expressing mock, WT or N340K CIC-5. # and * point CIC-5 complex and core glycosylated forms respectively. **C.** Western blot analysis of the surface biotinylated protein fraction (S) or total cell lysates (T) in transfected HEK293 cells expressing WT or N340K CIC-5. **D.** Immunocytochemical localization of WT and N340K CIC-5 mutation in transfected HEK293 cells. Plasma membrane was stained with biotin, and ER was stained with calnexin. Data from Grand et al. 2011 14, except for C (unpublished data).

3. Aim of the project:

My research program aim to gain more insights in the physiopathology of Dent's disease by studying the *in vivo* functional consequences of the pathogenic N340K CIC-5 mutation in terms of oxidative stress and ER stress of proximal tubular cells. For this purpose, I will **(i)** generate a knock-in mouse model for the N340K CIC-5 mutation with the CRISPR/Cas9 method, **(ii)** evaluate the renal phenotype of this knock-in mouse model, **(iii)** investigate the oxidative stress and the endoplasmic stress in proximal tubule cells of this model and **(iv)** examine the endoplasmic reticulum stress in biopsies from patients with Dent's disease, in collaboration with the Human Genetics Department of the Hôpital Européen Georges Pompidou in Paris, France.

4. Scientific program:

I. Generation of a knock-in CIC-5 mouse by the CRISPR/Cas9 strategy

New transgenesis methods, based on the direct embryo genome editing with endonuclease, have recently allowed to generate several transgenic strains in new species such as rat²⁷. In 2012, the revolutionary and fast "CRISPR/Cas9" approach in genome engineering has been described²⁸⁻³⁰. With the help of the bacterial Cas9 endonuclease and an RNA containing a 20-base-pair recognition sequence ("guide RNA" or gRNA), it is possible to cut precisely both strand of a DNA region recognized by the gRNA (Figure 3). Following the double strand break (DSB), an embryonic DNA repair process occurs by HDR (Homology Directed Repair): a single strand DNA (displaying sequence homology with broken DNA) is used as a template to repair DSB. The DNA template is called ssODN (single-stranded donor oligonucleotides) and can contain point or large mutations. Thus, a single injection of a proper amount of Cas9 mRNA/gRNA/ssODN mix into embryonic cells, followed by their transfer into a pseudo-pregnant female, is enough to generate KI animals with a point mutation in a quick (few months) and in a relatively cheap (~7000 €) manner, compared to the classic homologous recombination method³¹.

Previous studies from two independent *CLCN5* Knock-Out (KO) mouse models have demonstrated that inactivation of *CLCN5* leads to a Dent's disease-like phenotype associated with a severe trafficking defect in proximal tubule cells (including a loss of the endocytic receptors megalin and cubilin at the cell surface) and to an impaired endosomal / lysosomal function^{5,32-34}. Interestingly, one study of *CLCN5* expression along the rat nephron⁷ has revealed that, in contrast to mouse and human, the S2 segment of the proximal tubule of rats do not express large amounts of *CLCN5*. There are also significant differences between rat and human for *CLCN5* expression in extra-renal tissues. For these reasons, the generation of a *CLCN5* Knock-In (KI) or KO rat model for Dent's disease is excluded.

Due to considerable benefits of CRISPR/Cas9 approach in genome editing, we will use this strategy to generate a N340K *CLCN5* KI mouse strain that will allow us to investigate *in vivo* the consequences of class 1 *CLCN5* pathogenic mutations.

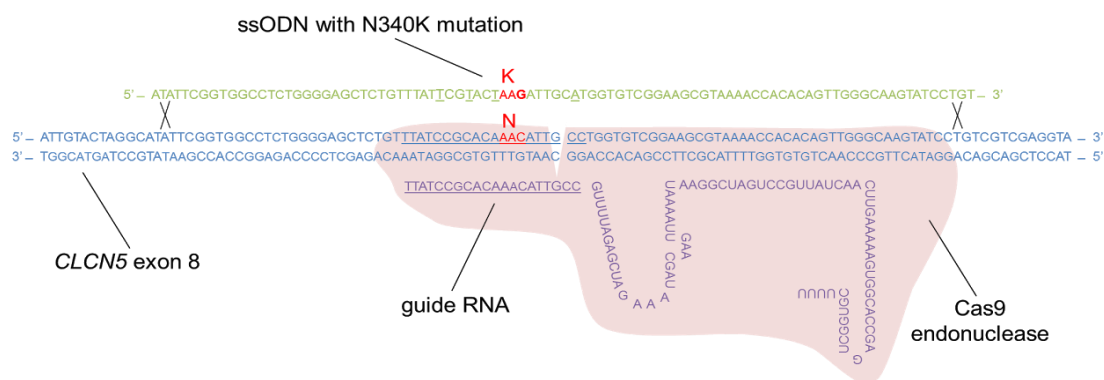


Figure 3. CRISPR/Cas9 strategy allowing the generation of the N340K *CLCN5* Knock-In mouse.

As shown in Figure 3, I have already designed a gRNA close to the N340K codon to obtain a good HDR success rate with no off-target effect and a ssODN with the N340K mutation (which eliminates a BsrDI restriction site and facilitates further genotyping) containing supplemental silent mutations to avoid its recognition by gRNA³¹. We will check *in vitro* the efficiency of these constructions³⁵ by collaborating with the TACGENE genome editing platform of the Museum National d'Histoire Naturelle of Paris (INSERM U1154 / CNRS UMR7196; head : C. Giovannangeli). Subsequently, about 300 C57Bl/6j embryo isolations, injections and transfers will be performed by the Homologous Recombination Platform of the Institut Cochin in Paris (head: M. Do Cruzeiro). All the F0 offsprings will be genotyped by genomic DNA extraction, PCR and enzyme digestion and by direct Sanger sequencing by GATC Biotech services. The offsprings will be then breed to produce F1 mice containing only the N340K mutation. Finally, F2 mice homozygous for N340K *CLCN5* will be generated.

Furthermore, during the recombination process, *CLCN5* KO mice will be also generated³¹. This will allow us to compare ER and oxidative stress in *CLCN5* KO and KI mice.

II. Analysis of the renal phenotype of knock-in mice and comparison with knock-out mice

I will be in charge of establishing the renal phenotype of the N340K KI mouse model in comparison with Wild-Type (WT) and *CLCN5* KO mice. Renal function of mice is routinely investigated in my laboratory: a platform equipped with state-of-the-art machineries is available for regular use and in the animal facility of the Centre de Recherche des Cordeliers, in Paris.

Daily food, water intake as well as body weight and urine secretion data will be collected in metabolic cages for KI, KO and WT mice. Urine and blood samples will be analyzed for ions, protein (including vitamin D), glucose, creatinine and hormone (insulin, PTH, aldosterone) to detect kidney dysfunction as observed in patients with Dent's disease. Urinary volume, osmolarity, calcium, phosphate, sodium, chloride, potassium, magnesium and pH data will be measured. The presence of low molecular weight proteins in the urine (such as vitamin D binding protein, retinol binding protein, and cathepsin B that are lost into the urine of patients) will be also determined more specifically using western-blot analysis¹¹. Venous blood from the retro-orbital plexus of conscious *CLCN5* KI, KO and WT mice will be analyzed and blood pH, concentration of calcium, bicarbonate, sodium, chloride, and magnesium will be measured. Creatinine and potassium concentration will be measured from tail artery samples. Plasma and urine creatinine levels will also allow us to determine the glomerular filtration rate.

Altogether, these parameters will allow us to describe in details the status of the renal function of the *CLCN5* KI mouse and compare it to KO and WT mice. If necessary, *in vivo* susceptibility to ER stress inducers or repressors such as Tunicamycin and Kifunensine could be evaluated in this way²¹.

III. Investigation of the ER stress, oxidative stress and endocytosis of knock-in mice proximal tubule

As already mentioned above, one hypothesis to explain the global proximal tubule dysfunction in patients with Dent's disease is an increased oxidative stress in these cells due to impaired endosomal / lysosomal function¹⁹. This would induce cell proliferation and apical dedifferentiation (with loss of expression of the endocytic receptors megalin and cubilin) via the disruption of the cell junction complex (ZO-1) integrity and overexpression of the transcription factor ZO-1-associated nucleic acid binding protein (ZONAB)³⁶⁻³⁸. In this view, the defective receptor-mediated endocytosis of proximal tubule cells is thought to be firstly caused by the absence of a functional *CLCN5* at the plasma membrane and at the early endosomes, and secondly exacerbated by the appearance of the oxidative stress and cell dedifferentiation. Furthermore, it is already established that the majority of the mutant *CLCN5* accumulate in the ER¹⁵, and that consecutive ER stress can induce oxidative stress by itself with some particular responses such as cell apoptosis²⁰. However, because of the lack of a mouse model reproducing this important part of the pathology, no study has explored the *in vivo* relevance of ER stress in Dent's disease, its potential implication in oxidative stress emergence, and its effect on the endocytosis function of proximal tubule.

Therefore, this part of my research project aims to investigate these crucial aspects by using the *CLCN5* N340K KI, KO and WT mouse models. I will first investigate the protein expression and maturation, and the subcellular localization of the *CLCN5* N340K mutant by western blot and immunofluorescence analysis on microdissected proximal tubules from the KI mouse. Then, using the same strategy, I will explore in the KO and KI mice the ER homeostasis by looking at the expression level, the localization and the phosphorylation status of the principal ER stress markers: IRE1a and PERK (both are supposed to be phosphorylated), BiP (overexpressed) and ATF6 (translocated to Golgi and cleaved) and their cytoplasmic effectors XBP1 (translocated to nucleus) and eIF2a (phosphorylated)^{20,23}. As ER stress may result in cell death, I will also evaluate the inflammasome activity by using a caspase-1 colorimetric assay commercial kit.

Then, I will examine whether oxidative stress, cell proliferation and apical dedifferentiation can be observed in proximal tubule cells of the N340K KI mouse as it has been described for the previous CIC-5 KO mice model and for three patients with Dent's disease¹⁹. For this purpose, I will perform qRT-PCR, western blot and immunostaining on microdissected proximal tubules from WT, KI and KO mice. I will investigate the expression, localization or activity of some markers of oxidative stress (catalase, type I superoxide dismutase, thioredoxin), cell proliferation (PCNA, Ki67, Cyclin E and osteopontin) and the transcription factor ZONAB. I will also investigate the integrity of proximal tubule cell junctions using immunofluorescent microscopy for the ZO-1 protein. Oxidative stress and/or ER stress may affect the intracellular trafficking of proteins (especially secreted and lysosomal proteins) and may participate this way in the disruption of the endosomal / lysosomal pathway⁴. Accordingly, I will investigate by western blot, qRT-PCR and immunostaining the expression levels and the subcellular localization of some crucial proteins involved in this pathway: megalin, cubilin, NHE3, V-type H⁺-ATPase, cathepsin B and OCRL1.

Finally, I will also study the functional impact of the N340K mutation on receptor-mediated endocytosis, with the help of primary culture of proximal tubule cells from our KI mouse. The endocytosis assay, as recently described in several papers³⁹⁻⁴⁰ will be performed on living proximal tubule cells exposed to a fluorescent-labeled endocytic marker (FITC-albumin, a specific marker for receptor-mediated endocytosis) from their apical surface at 37°C for 15 minutes. Cells will be then disintegrated with Triton X-100, and intracellular fluorescence will be measured with a single-beam fluorometer. Growing of primary cell cultures from microdissected proximal tubules obtained in mouse is a well standardized technique^{25,41,42}, and we host in my laboratory all the necessary equipment for the cell culture.

IV. Investigation of the ER stress on biopsies from patients with Dent's disease

Gailly *et al.* have recently described an upregulation at mRNA and protein levels of carbonic anhydrase type III (CAIII is an oxidative stress marker) in end-stage kidney of a patient with Dent's disease harboring the G506E mutation of *CLCN5*. This CAIII overexpression is restricted to proximal tubule cells and is also observed in megalin KO mice, but not in others renal Fanconi syndrome mouse models. They have also shown an increased urinary excretion of CAIII in three patients with Dent's disease¹⁹. Taken together, these results are compatible with the presence of an oxidative stress in proximal tubule cells oxidative during Dent's disease. Interestingly, 3 of the 4 patients investigated in this study are likely to carry a CIC-5 class 1 mutation leading to ER retention. Furthermore, as already mentioned above, oxidative stress may cause or may be the consequence of ER stress.

Consequently, my research program will also include examination of some ER stress markers on renal biopsies from Dent's disease patients. Tissue samples will be provided in collaboration with the Human Genetics Department at the Hôpital Européen Georges Pompidou in Paris. They will be employed to perform mRNA extraction and qRT-PCR analyses of ER stress markers (BiP, CHOP, ATF4 and active XBP1 mRNA splice variant). With the help of cryosectioned samples, translocation of XBP1 to nucleus and PERK phosphorylation could complete the ER homeostasis characterization of proximal tubule cells from Dent's disease patients.

5. Expected impacts:

The underlying mechanisms of the development of Dent's disease are not fully understood, but ER stress and oxidative stress are probably necessary prerequisites for this pathology. My project aims to investigate *in vivo* these cell responses by generating a *CLCN5* KI mouse model. It also aims at investigating ER stress in patients with Dent's disease, in which oxidative stress was already revealed. By getting deeper into the cell biology of the proximal tubule cells in the light of ER and oxidative stress, this study will contribute to get a better understanding of the disease and to adapt its medical treatment. In the long term, our mouse model could be used to develop innovative therapeutic approaches, such as protein refolding using pharmacological chaperones, a strategy used for cystic fibrosis treatment⁴³.

6. References:

- Scheinman SJ. X-linked hypercalciuric nephrolithiasis: clinical syndromes and chloride channel mutations. *Kidney Int* 1998; 53: 3-17.
- Hoopes RR, Jr., Shrimpton AE, Knohl SJ, Hueber P, et al. Dent Disease with mutations in OCRL1. *Am J Hum Genet* 2005; 76: 260-267.
- Shrimpton AE, Hoopes RR, Jr., Knohl SJ, Hueber P, et al. OCRL1 mutations in Dent 2 patients suggest a mechanism for phenotypic variability. *Nephron Physiol* 2009; 112: p27-36.
- Devuyst O, Luciani A. Chloride transporters and receptor-mediated endocytosis in the renal proximal tubule. *J Physiol* 2015; 593: 4151-4164.
- Piwon N, Gunther W, et al. CIC-5 Cl⁻ channel disruption impairs endocytosis in a mouse model for Dent's disease. *Nature* 2000; 408: 369-373.
- van den Hove MF, Croizet-Berger K, Jouret F, Guggino SE, et al. The loss of the chloride channel, CIC-5, delays apical iodide efflux and induces a euthyroid goiter in the mouse thyroid gland. *Endocrinology* 2006; 147: 1287-1296.
- Devuyst O, Christie PT, Courtoy PJ, Beauwens R, et al. Intra-renal and subcellular distribution of the human chloride channel, CLC-5, reveals a pathophysiological basis for Dent's disease. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 247-257.
- Gunther W, Luchow A, Cluzeaud F, Vandewalle A, et al. CIC-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* 1998; 95: 8075-8080.
- Gunther W, Jentsch TJ. The CIC-5 chloride channel knock-out mouse - an animal model for Dent's disease. *Pflugers Arch* 2003; 445: 456-462.
- Hara-Chikuma M, Wang Y, Guggino SE, Guggino WB, et al. Impaired acidification in early endosomes of CIC-5 deficient proximal tubule. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 329: 941-946.
- Novarino G, Weinert S, Rickheit G, Jentsch TJ. Endosomal chloride-proton exchange rather than chloride conductance is crucial for renal endocytosis. *Science* 2010; 328: 1398-1401.
- Stauber T, Weinert S, Jentsch TJ. Cell biology and physiology of CLC chloride channels and transporters. *Compr Physiol* 2012; 2: 1701-1744.
- Grand T, Mordasini D, L'Hoste S, Pennaforte T, et al. Novel CLCN5 mutations in patients with Dent's disease result in altered ion currents or impaired exchanger processing. *Kidney Int* 2009; 76: 999-1005.
- Grand T, L'Hoste S, Mordasini D, et al. Heterogeneity in the processing of CLCN5 mutants related to Dent disease. *Hum Mut* 2011; 32: 476-483.
- Lourd S, Grand T, et al. CIC-5 mutations associated with Dent's disease: a major role of the dimer interface. *Pflugers Arch* 2012; 463: 247-256.
- Devuyst O, Thakker RV. Dent's disease. *Orphanet J Rare Dis* 2010; 5: 28.
- Liu SY, Chen CL, Yang TT, Huang WC, et al. Albumin prevents reactive oxygen species-induced mitochondrial damage, autophagy, and apoptosis during serum starvation. *Apoptosis* 2012; 17: 1156-1169.
- Moreau K, Luo S, Rubinsztein DC. Cytoprotective roles for autophagy. *Curr Opin Cell Biol* 2010; 22: 206-211.
- Gailly P, Jouret F, et al. A novel renal carbonic anhydrase type III plays a role in proximal tubule dysfunction. *Kidney Int* 2008; 74: 52-61.
- Oakes SA, Papa FR. The role of endoplasmic reticulum stress in human pathology. *Annu Rev Pathol* 2015; 10: 173-194.
- Lhotak S, Sood S, Brimble E, Carlisle RE, et al. ER stress contributes to renal proximal tubule injury by increasing SREBP-2-mediated lipid accumulation and apoptotic cell death. *Am J Physiol Renal Physiol* 2012; 303: F266-278.
- Chaudhari N, Talwar P, Parimisetty A, Lefebvre d'Hellencourt C, et al. A molecular web: endoplasmic reticulum stress, inflammation, and oxidative stress. *Front Cell Neurosci* 2014; 8: 213.
- D'Antonio C, Molinski S, Ahmadi S, Huan LJ, et al. Conformational defects underlie proteasomal degradation of Dent's disease-causing mutants of CIC-5. *Biochem J* 2013; 452: 391-400.
- Raden D, Hildebrandt S, Xu P, Bell E, et al. Analysis of cellular response to protein overexpression. *Syst Biol (Stevenage)* 2005; 152: 285-289.
- Reed AA, Loh NY, Terryn S, Lippiat JD, et al. CLC-5 and KIF3B interact to facilitate CLC-5 plasma membrane expression, endocytosis, and microtubular transport: relevance to pathophysiology of Dent's disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010; 298: F365-380.
- Alekov AK. Mutations associated with Dent's disease affect gating and voltage dependence of the exchanger CIC-5. *Front Physiol* 2015; 6: 159.
- Tong C, Li P, et al. Production of p53 gene knockout rats by homologous recombination in embryonic stem cells. *Nature* 2011; 467: 211-213.
- Jinek M, Chylinski K, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 2012; 337: 816-821.
- Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 2013; 339: 823-826.
- Wang H, Yang H, Shivalila CS, Dawlaty MM, et al. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell* 2013; 153: 910-918.
- Inui M, Tamano M, et al. Rapid generation of mouse models with defined point mutations by the CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep* 2014; 4: 5396.
- Wang SS, Devuyst O, Courtoy PJ, Wang XT, et al. 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* 2000; 9: 2937-2945.
- Christensen EI, Devuyst O, Dom G, Nielsen R, et al. Loss of chloride channel CLC-5 impairs endocytosis by defective trafficking of megalin and cubilin in kidney proximal tubules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 8472-8477.
- Nielsen R, Courtoy PJ, Jacobsen C, Dom G, et al. Endocytosis provides a major alternative pathway for lysosomal biogenesis in kidney proximal tubular cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 5407-5412.
- Giovannangeli C, Concordet JP. Editing and investigating genomes with TALE and CRISPR/Cas systems: applications of artificial TALE and CRISPR-Cas systems. *Methods* 2014; 69: 119-120.
- Lima WR, Parreira KS, Devuyst O, Caplanusi A, et al. ZONAB promotes proliferation and represses differentiation of proximal tubule epithelial cells. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21: 478-488.
- Raggi C, Luciani A, Nevo N, Antignac C, et al. Dedifferentiation and aberrations of the endolysosomal compartment characterize the early stage of nephropathic cystinosis. *Hum Mol Genet* 2014; 23: 2266-2278.
- Yu W, Beaudry S, Negoro H, Boucher I, et al. H₂O₂ activates G protein, alpha 12 to disrupt the junctional complex and enhance ischemia reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109: 6680-6685.
- Govrin CM, Wilmer MJ, Piret SE, Harding B, et al. Receptor-mediated endocytosis and endosomal acidification is impaired in proximal tubule epithelial cells of Dent disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110: 7014-7019.
- Lee A, Slattery C, Nikolic-Paterson DJ, Hryciw DH, et al. Chloride channel CIC-5 binds to aspartyl aminopeptidase to regulate renal albumin endocytosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2015; 308: F784-792.
- Terryn S, Jouret F, Vandenabeele F, Smolders I, et al. A primary culture of mouse proximal tubular cells, established on collagen-coated membranes. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; 293: F476-485.
- Wang Y, Cai H, Cebotaru L, et al. CIC-5: role in endocytosis in the proximal tubule. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 289: F850-862.
- Odolczyk N, Fritsch J, Norez C, Serval N, et al. Discovery of novel potent DeltaF508-CFTR correctors that target the nucleotide binding domain. *EMBO Mol Med* 2013; 5: 1484-1501.

III. Physiopathologie du Syndrome de Bartter de type III

Initialement, mon projet de thèse avait pour objectif de déchiffrer les mécanismes physiopathologiques impliqués dans le Syndrome de Bartter de type III. Ce syndrome de Bartter (voir Section Introduction B.II.2.b) est causé par la perte de fonctionnalité du canal chlorure ClC-Kb dont l'orthologue murin s'appelle ClC-K2 (Andrini *et al.*, 2015).

Durant ma thèse, j'ai réalisé l'élevage de lignées de souris exprimant la Cre-recombinase dans la BAL et de souris possédant un gène *Clcnk2* flanqué de séquences lox. Leur croisement aurait dû aboutir à la création d'une lignée invalidée spécifiquement dans la BAL pour ClC-K2, un modèle animal potentiel du syndrome de Bartter de type III. Cependant, pour des raisons indéterminées, la recombinaison de *Clcnk2* n'a eu lieu que dans 15 % des BAL corticales environ. En conséquence, ces souris dont le phénotype général et la composition urinaire n'étaient à première vue pas altérés n'ont pas été conservées.

Par ailleurs, j'ai participé à l'analyse fonctionnelle de 9 mutations pathogènes de ClC-Kb obtenues par Collaboration avec Rosa Vargas-Poussou du Département de Génétique Humaine de l'Hôpital Européen Georges Pompidou à Paris. Cette étude devrait conduire à une classification des mutations de ClC-Kb analogue à celle réalisée au laboratoire pour les mutations de ClC-5 (Grand *et al.*, 2011). Ce travail piloté par le Professeur Jacques Teulon aboutira en principe à la publication d'un article scientifique (actuellement en rédaction) intitulé "*Analysis of CLCNKB mutations at dimer-interface, calcium binding site and pore reveal a variety of functional alterations in ClC-Kb channel leading to Bartter syndrome*" et dont je serai premier co-auteur avec le Dr. Olga Andrini (Université Claude Bernard, Lyon).

Enfin, au cours de ma thèse j'ai participé à la réalisation d'expériences dont les résultats ont été inclus dans deux articles scientifiques, portant sur l'analyse du phénotype de souris invalidées génétiquement pour *Clcnk2* (modèle du Syndrome de Bartter de type III) et sur la recherche d'inhibiteurs de ClC-Kb. Je suis co-auteur de ces deux articles respectivement intitulés "*The ClC-K2 Chloride Channel Is Critical for Salt Handling in the Distal Nephron*" (Hennings *et al.*, 2017) et "*In silico model of the human ClC-Kb chloride channel: pore mapping, biostructural pathology and drug screening*" (Louet *et al.*, Scientific Reports 2017, sous-presse).

IV. Curriculum vitae

1. État civil et contact

YOHAN BIGNON

Né le 24 Mai 1992 — Nationalité française — En concubinage

Doctorant contractuel et Chargé de Mission Enseignement de l'Université Pierre et Marie Curie (UPMC) depuis le 1^{er} Octobre 2014 au sein du laboratoire « Métabolisme et Physiologie Rénale » du Centre de Recherche des Cordeliers.

E-mail : yohan.bignon@gmail.com

2. Diplômes

Niveau de qualification et intitulé du diplôme	Année d'obtention
Habilitation à l'Expérimentation Animale de niveau 1 <i>Université Pierre et Marie Curie (UPMC) - INSERM</i>	2015
Master de Physiologie et Physiopathologie <i>Mention Bien — Prix de la chancellerie des Universités de Paris</i> <i>Université Pierre et Marie Curie (UPMC)</i>	2014
Licence de Biologie Intégrative et Evolutive <i>Mention Très Bien — Bourse au Mérite Universitaire</i> <i>Université François Rabelais de Tours</i>	2012
DEUG de sciences du vivant <i>Mention Très Bien</i> <i>Université François Rabelais de Tours</i>	2011

3. Contrats de Recherche

Fondation du Rein (FRM)

[Avril 2016–Septembre 2017]

« Implication du stress du réticulum endoplasmique et du stress oxydatif dans la maladie de Dent » : Lauréat du Prix Jeune Chercheur 2016 avec allocation de recherche de 30 000 € utilisable en équipement et fonctionnement.

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche **[Septembre 2014-2017]**

« Compréhension des mécanismes moléculaires et physiologiques à l'origine du syndrome de Bartter de type III » : Allocation d'une bourse doctorale et d'enseignement d'une durée de trois ans. Classé 1^{er}/35 à l'oral du concours de l'ED394 de 2014.

4. Laboratoires de Recherche

- 2017-2020 INSERM UMRS_1147 ; Université Paris Descartes ; CARPEM
 Centre Universitaire des Saints Pères
 Centre Interdisciplinaire Chimie Biologie Paris
 Équipe « Médecine personnalisée, Pharmacogénomique, Optimisation Thérapeutique »
Chef d'équipe : Pr. Pierre Laurent-Puig.
Responsable : Dr. Nicolas Pallet.
 45, rue des Saints Pères
 75 006 Paris Cedex 06, France
- 2014-2017 INSERM UMRS_1138 ; Université Pierre et Marie Curie (UPMC) ;
 Université Paris Descartes ; CNRS ERL_8228
 Centre de Recherche des Cordeliers
 Équipe « Métabolisme et Physiologie Rénale »
Chefs d'équipe : Pr. Pascal Houillier & Dr. Aurélie Edwards.
Responsable : Dr. Stéphane Lourdel.
 15, rue de l'Ecole de Médecine
 75 006 Paris Cedex 06, France
- 2013 Département de Pathologie et Immunologie de l'Université de Genève
 Equipe « Connexines et Pathologies Cardiovasculaires »
Chef d'équipe : Pr. Brenda Kwak.
Responsable : Dr. Sandrine Morel.
 1, rue Michel-Servet
 1211 Genève 4, Suisse
- 2012 Institut de Recherche sur la Biologie de l'Insecte, UMR CNRS 7261
 Département Physiologie et Ecologie comportementale
 Équipe « Neuro-éthologie et Physiologie Intégrative »
Chef d'équipe : Pr. Claudio Lazzari.
Responsable : Pr. Claudio Lazzari.
 Avenue Monge, Parc Grandmont
 37 200 Tours, France
- 2011 INSERM UMRS_618 — « Protéases et Vectorisation Pulmonaire »
Chef d'équipe : Pr. Francis Gauthier.
Responsable : Dr. Sylvie Attucci.
 10, Boulevard Tonnellé
 37 032 Tours, France

5. Encadrement d'étudiants et enseignement

a. Encadrement d'étudiants

Imène Sakhi

[Janvier 2017 – Juillet 2017]

Master 2 de Biologie Intégrative (UPMC).

Sujet : « Analyse de mutations pathogènes de l'échangeur 2 chlores/proton ClC-5 impliqué dans la maladie de Dent et design expérimental de souris CLCN5 Knock-In par CRISPR/Cas9 »

Yohan Legueux-Cajgfinger

[Mai 2016 – Juin 2016]

Master 1 de Biologie Intégrative (UPMC).

Sujet : « Analyse et re-adressage de mutations pathogènes de l'échangeur 2 chlores/proton ClC-5 impliqué dans la maladie de Dent »

Feriel Benchenouf

[Mai 2016 – Juin 2016]

Licence 1 de Biologie Géoscience Chimie (UPMC).

Sujet : « Analyse in vitro de mutations pathogènes impliquées dans la maladie de Dent et le syndrome de Bartter de type 3 »

Marc Ambrosini

[Mai 2015 – Juin 2015]

Master 1 de Biologie Intégrative et Physiologie (UPMC).

Sujet : « Analyse fonctionnelle de mutations pathogènes de l'échangeur 2 chlores/proton ClC-5 impliqué dans la maladie de Dent »

b. Activités d'enseignement

Durant mon doctorat entre 2014 et 2017, j'ai réalisé une mission doctorale d'enseignement de 192 heures d'enseignement. Dans ce cadre, j'ai préparé et animé des travaux dirigés et des travaux pratiques à l'interface entre biologie cellulaire, biologie moléculaire et biochimie. Cette mission m'a été attribuée par le Centre de Coordination des Missions Doctorales de l'UPMC après sélection de ma candidature. J'ai également réalisé bénévolement 180 heures de travaux pratiques auprès d'étudiants de Master de l'UPMC, visant à leur montrer comment étudier la fonction rénale de souris traitées ou non par un diurétique et placées en cages à métabolisme.

Mes activités d'enseignement sont résumées dans le tableau suivant :

Cycle	Unité d'Enseignement	TD	TP	Total
L1	1V001 « Organisations cellulaires du vivant » (UPMC)	80	96	176
L1	Mission Enseignant Référent (UPMC)	16	-	16
M1	4B013 « Exploration des fonctions physiologiques du petit animal » (UPMC en bénévolat)	-	180	180
Nombre total d'heures		96	276	372

6. Liste des publications scientifiques en revue à comité de lecture

- **Yohan Bignon***, Olga Andrini*, Sara Bitam, Maxime Louet , Marc Paulais, Naziha Bakouh, Mathilde Keck, Pablo Cid, Francisco Sepúlveda, Gabrielle Planelles, Bruno Villoutreix, Rosa Vargas-Poussou, Jacques Teulon. *Analysis of CLCNKB mutations at dimer-interface, calcium binding site and pore reveal a variety of functional alterations in ClC-Kb channel leading to Bartter syndrome*. Article actuellement en préparation. *Contribution équivalente.
- **Yohan Bignon**, Laurent Pinelli, Nadia Frachon, Olivier Lahuna, Marie-Lucile Figueres, Stéphane Lourdel, Jacques Teulon, Marc Paulais. *Isolated proximal renal tubular acidosis in mice lacking the Kir4.2(Kcnj15) potassium channel*. Prochainement soumis en vue d'une publication.
- **Yohan Bignon**, Alexi Alekov, Nadia Frachon, Olivier Lahuna, Jacques Teulon, Rosa Vargas-Poussou, Stéphane Lourdel. *A novel ClC-5 mutation involved in Dent's disease leads to normal endosomal acidification despite abolished proton transport*. Prochainement soumis en vue d'une publication.
- Maxime Louet, Sara Bitam, Naziha Bakouh, **Yohan Bignon**, Gabrielle Planelles, David Lagorce, Maria Miteva, Dominique Eladari, Jacques Teulon, Bruno Villoutreix. *In silico model of the human ClC-Kb chloride channel: pore mapping, biostructural pathology and drug screening*. Scientific Reports, 2017, sous-presse.
- Christopher Hennings, Olga Andrini, Nicolas Picard, Marc Paulais, Antje K.Huebner, Irma Karen Lopez Cayuqueo, **Yohan Bignon**, Mathilde Keck, Nicolas Cornière, David Böhm, Thomas J. Jentsch, Régine Chambrey, Jacques Teulon, Christian A.Hübner, Dominique Eladari. *The ClC-K2 Chloride Channel Is Critical for Salt Handling in the Distal Nephron*. Journal of the American Society of Nephrology 2017 Jan;28:209-217.
- Paula Zermoglio, Hadrien Martin-Herrou, **Yohan Bignon**, Claudio Lazzari. *Rhodnius prolixus smells repellents: Behavioural evidence and test of present and potential compounds inducing repellency in Chagas disease vectors*. Journal of Insect Physiology 2015 Oct;81:137-44.

7. Liste des communications scientifiques

a. Communications orales

- *Role of the potassium channel Kir4.2.* Journée Scientifique Annuelle du Centre de Recherche des Cordeliers. [Paris, France, 21 Juin 2017].
- *Role of the potassium channel Kir4.2.* French-Swiss Meeting on Renal Physiology and Ion Transport. [Paris, France, 30–31 Mars 2017].

b. Communications affichées

- **Yohan Bignon**, Olivier Lahuna, Nadia Frachon, Jacques Teulon, Rosa Vargas-Poussou, Stéphane Lourdel. *Functional analysis of a novel mutation affecting the gating glutamate of ClC-5 in a patient with Dent's disease.* Experimental Biology Meeting [Chicago IL, États-Unis, 22-26 Avril 2017] 1007.7.E189
- **Yohan Bignon**, Laurent Pinelli, Sami Ayari, Stéphane Lourdel, Marc Paulais, Jacques Teulon. *Investigation on the role of the Kir4.2 K⁺ channel in renal and pancreatic functions.* Federation of the European Societies of Physiology Annual Meeting [Paris, France, 29 Juin au 1^{er} Juillet 2016] YPO.023.
- **Yohan Bignon**, Olga Andrini, Mathilde Keck, Stéphane Lourdel, Rosa Vargas-Poussou, Jacques Teulon. *Functional and molecular analysis of ClC-Kb chloride channel missense involved in Bartter syndrome type III.* Journée annuelle de l'École Doctorale de Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique [Paris, France, 6-7 Mai 2016].
- **Yohan Bignon**, Mathilde Keck, Stéphane Lourdel, Rosa Vargas-Poussou, Jacques Teulon, Olga Andrini. *Functional analysis of CLCNKB mutations causing Bartter syndrome type III.* ASN Kidney Week Annual Meeting [San Diego CA, États-Unis, 5-8 Novembre 2015] FR-PO763.

RÉSUMÉ

Le tubule proximal, premier segment de l'épithélium tubulaire du néphron, participe à la diurèse en modifiant le volume et la composition de l'ultrafiltrat plasmatique généré par le glomérule. Grâce à de nombreux transports transépithéliaux, il réabsorbe la totalité du glucose, des acides aminés et des protéines de bas poids moléculaires, ainsi que 80 % des ions HPO_4^{2-} ou HCO_3^- , 60 % des ions Na^+ , Cl^- , K^+ , Ca^{2+} , 75 % de l'eau et 30 % des ions Mg^{2+} ultrafiltrés.

Durant ma thèse, j'ai étudié les rôles physiologiques et physiopathologiques de deux protéines de transport exprimées dans le tubule proximal, au cours de deux études distinctes.

Dans le cadre de ma première étude, j'ai évalué *in vivo* la fonction rénale de souris n'exprimant pas une protéine appelée Kir4.2, dont le rôle est inconnu. Nos résultats montrent que Kir4.2, associée à Kir5.1, forme un canal potassique basolatéral Kir4.2/Kir5.1 dans le tubule proximal. L'absence de Kir4.2 provoque chez la souris une acidose tubulaire proximale isolée, consécutive à une ammoniogénèse altérée. De fait, la perte de fonctionnalité de Kir4.2 pourrait être à l'origine d'acidoses tubulaires proximales isolées familiales idiopathiques.

Dans le cadre de ma seconde étude, j'ai analysé *in vitro* la fonctionnalité d'un mutant pathogène de l'échangeur $2\text{Cl}^-/\text{H}^+$ ClC-5 impliqué dans la maladie de Dent. Cette maladie, caractérisée par une protéinurie de bas poids moléculaire associées à divers troubles du tubule proximal, serait liée à un défaut d'acidification des endosomes précoces par ClC-5. Toutefois, le mutant de ClC-5 que nous avons étudié, converti en canal chlorure, acidifie autant les endosomes précoces que le ClC-5 sauvage. Surprenants, ces résultats suggèrent que la maladie de Dent puisse être causée par un défaut d'accumulation d'ions chlorure dans l'endosome.

Mots clés : [Tubule Proximal] – [Kir4.2] – [Acidose Proximale] – [ClC-5] – [Maladie de Dent]

ABSTRACT

The proximal tubule is involved in diuresis by modifying the volume and content of the glomerular ultrafiltrate. Using a variety of transepithelial transports systems, it reabsorbs all ultrafiltered glucose, amino-acids and low molecular weight proteins, as well as 80% of HPO_4^{2-} and HCO_3^- ions, about 60% of Na^+ , Cl^- , K^+ , and Ca^{2+} ions, 75% of water and 30% of Mg^{2+} .

During this thesis, I determined the physiological and physiopathological roles of two distinct transport proteins present in proximal tubule.

In the first part, I evaluated the renal function of mice invalidated for the Kir4.2 protein, whose role was undetermined. Our results show that Kir4.2, in association with Kir5.1, form a Kir4.2/Kir5.1 potassium channel at the basolateral membrane of proximal tubular cells. Furthermore, Kir4.2-null mice exhibit a reduced ammoniogenesis leading to an isolated proximal renal tubular acidosis. This study provides the gene encoding Kir4.2 as a candidate gene for the yet unexplained autosomal dominant isolated proximal renal tubular acidosis.

In the second part, the functional consequences of a pathogenic mutation of the $2\text{Cl}^-/\text{H}^+$ exchanger ClC-5, involved in Dent's disease, were evaluated *in vitro*. This disease, characterized by a low-molecular-weight-proteinuria in the context of a general proximal tubule dysfunction, is currently thought to be due to an acidification defect of early endosomes linked to a loss of function of ClC-5. Surprisingly, our results show that ClC-5, converted into a chloride channel by this mutation, indeed acidifies the early endosomes as well as the ClC-5 wild-type. Thus, Dent's disease may originate from a defect in the accumulation of chloride ions into the early endosomes.

Key words : [Proximal Tubule] – [Kir4.2] – [Proximal Acidosis] – [ClC-5] – [Dent's disease]