

***L*es canaux chlorure ou comment un poisson électrique éclaire la pathologie humaine**

Il est maintenant acquis que les canaux ioniques sont des molécules essentielles au fonctionnement cellulaire. Il en est pour preuve les dizaines d'affections génétiques et/ou acquises, dues à des dysfonctionnements de canaux ioniques, ou encore le nombre de médicaments dont la cible privilégiée est un canal ionique. Le dynamisme de la recherche dans ce domaine a été encore une fois confirmé lors de la neuvième édition du Colloque « Canaux ioniques » qui s'est tenu à La Londe-les-Maures (France) du 20 au 23 septembre 1998. Nous résumons ici, pour les lecteurs de *médecine/sciences*, un thème du colloque (parmi 10) qui a connu une évolution des connaissances particulièrement rapide ces dernières années. Ce thème

traitait des canaux chlorure de la famille des CIC: de nouveaux gènes ont été clonés et de nouvelles « canaloopathies » (maladies liées à leur dysfonctionnement) identifiées, confirmant l'importance fonctionnelle ubiquitaire de cette famille de molécules.

La membrane non innervée des cellules de l'organe électrique de la Torpille contient en abondance des canaux chlorure contrôlés par le potentiel membranaire. Ceux-ci sont mis en jeu par la dépolarisation consécutive à l'activation des récepteurs nicotiques situés aux jonctions neuromusculaires des électrocytes, et contribuent ainsi à la production du courant de décharge de l'organe électrique. Ce canal chlorure a été très étudié dans les années 1980, et le

gène qui le code, le *CIC-0*, a finalement été isolé en 1990 [1]. Par la suite, neuf autres gènes homologues ont été identifiés chez les mammifères (*CIC-1* à 7, *CIC-Ka* et *CIC-Kb*) [2]. Ces différents canaux CIC sont impliqués dans des fonctions diverses: contrôle de l'excitabilité membranaire, transport transépithélial, régulation du volume cellulaire, ou acidification d'organites intracellulaires. Chez l'homme, leur importance fonctionnelle est démontrée par le grand nombre d'affections héréditaires déjà répertoriées qui résultent de mutations spécifiques de certains des gènes codant pour ces canaux (*figure 1*). Il est à noter que des gènes codant pour des protéines de type CIC ont également été identifiés dans des orga-

	Distribution	Fonction	Maladie
	CIC-1	Muscle squelettique	Myotonie de Thomsen Myotonie de Becker
	CIC-2	Ubiquitaire	
	CIC-Ka	Rein	Syndrome de Bartter
	CIC-Kb	Rein	
	CIC-3	Large distribution	Maladie de Dent
	CIC-4	Large distribution	
	CIC-5	Rein (cerveau, foie)	
	CIC-6	Ubiquitaire	
	CIC-7	Ubiquitaire	

Figure 1. « **Arbre généalogique** » de la famille des canaux chlorure CIC des mammifères dépendant du potentiel membranaire. Le dendrogramme (à gauche) indique le degré de similitude entre les différents membres de la famille. Sont également indiquées la distribution tissulaire, la (ou les) fonction(s) proposée(s), ainsi que l'implication dans des maladies génétiques. (D'après [2,13].)

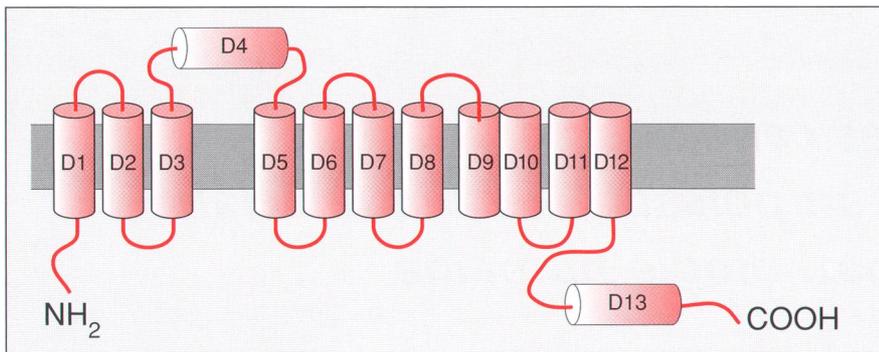


Figure 2. **Modèle de la topologie transmembranaire des canaux de type CIC.** Les extrémités NH_2 et COOH sont localisées au niveau intracellulaire. Ces protéines possèdent 13 domaines hydrophobes (D1-D13) suffisamment longs pour traverser la membrane sous forme d'hélice α . Cependant, D13 est très probablement intracellulaire, et D4 ne semble pas traverser la membrane et aurait une localisation extracellulaire, bien que cette interprétation soit controversée [2]. La région D9-D12 est elle aussi mal définie et pourrait traverser la membrane 3 à 5 fois, donnant 10 ou 12 segments transmembranaires. (D'après [2, 13].)

nismes aussi divers que les levures, les bactéries et les plantes.

Les différents membres de cette famille peuvent être classés en trois sous-familles en fonction des homologies de leur séquence primaire, traduisant le degré de divergence évolutive des gènes qui les codent (figure 1). Une première sous-famille comporte le CIC-1, le CIC-2 ainsi que les CIC-Ka et CIC-Kb. CIC-3, CIC-4 et CIC-5, qui présentent près de 80% d'identité de séquence au niveau protéique constituent le second groupe, et CIC-6 et CIC-7 le troisième. Au niveau structural, la topologie transmembranaire de ces canaux prête encore à discussion [2]. Les canaux chlorure contiennent 13 séquences hydrophobes suffisamment longues pour traverser la membrane sous forme d'hélice α , mais les modèles les plus récents s'accordent à ne trouver que 10 à 12 segments transmembranaires (figure 2). Ces protéines s'associent très probablement en dimères pour former des canaux fonctionnels.

Cette propriété de dimérisation a été fermement établie pour le canal CIC-0 de la Torpille, le mieux caractérisé de cette famille de canaux ioniques. Il contient deux pores identiques et indépendants, formés chacun par une des sous-unités constituant le dimère, sorte de structure en « double canon » (figure 3). Ces deux pores s'ouvrent indépendamment

l'un de l'autre, mais un mécanisme d'ouverture plus lent peut également agir simultanément sur les deux pores. Par analogie, ce modèle pourrait être aussi applicable aux autres membres de la famille CIC. Ainsi, une telle structure dimérique a été récemment proposée pour le canal CIC-1 [3]. Contrairement à ce qui est décrit pour les canaux cationiques, l'ouverture des pores, corrélée au potentiel membranaire, ne semble pas contrôlée par un détecteur de voltage. En fait, l'ouverture rapide et indépendante des deux pores serait gouvernée par la fixation de l'anion chlorure lui-même dans l'embouchure du canal [4, 5]. Les mécanismes contrôlant l'ouverture lente et simultanée des deux pores sont encore moins bien compris, mais semblent également impliquer l'anion concerné par ce flux [5].

Le CIC-1, principalement exprimé dans les cellules musculaires squelettiques, est activé par les dépolarisations membranaires. Il joue un rôle fondamental dans la stabilisation du potentiel membranaire de repos, ainsi que dans la repolarisation du potentiel d'action [2]. Plus de 30 mutations du gène *CIC-1* humain ont été répertoriées et sont responsables de myotonies autosomiques soit récessives, soit dominantes [2, 6] (*m/s 1994, n° 5, p. 603*). Les mutations qui entraînent une perte totale d'expression fonctionnelle de la pro-

téine induisent une myotonie récessive (ou maladie de Becker) (*m/s 1989, n° 2, p. 124*), l'allèle sain assurant la formation de canaux normaux. A l'inverse, la myotonie congénitale dominante (ou maladie de Thomsen) (*m/s 1993, n° 6/7, p. 805*) est associée à des mutations qui n'empêchent pas la formation d'un canal fonctionnel, mais modifient certaines de ses propriétés comme la sensibilité du canal au potentiel membranaire. Ces mutations ont un effet dominant négatif, puisque l'association d'une sous-unité mutée avec une sous-unité de type sauvage suffit à modifier les propriétés du canal [7]. La modification affecte donc la majorité des canaux CIC-1 de l'individu, diminuant ainsi considérablement la conductance chlorure qui assure le maintien du potentiel de repos des cellules musculaires, et minimisant sa participation à la repolarisation du potentiel d'action. L'hyperexcitabilité membranaire qui en résulte est responsable de la raideur musculaire et du retard de relaxation suivant une contraction, principaux symptômes de la myotonie de Thomsen [2].

Le CIC-5, fortement exprimé dans le rein, forme un canal chlorure qui laisse entrer plus facilement les ions chlorure qu'il ne les laisse sortir, propriété encore appelée « à rectification sortante » [2]. Certaines mutations de ce gène entraînent une perte de la fonction du canal, responsable de la symptomatologie associée à la maladie de Dent (*m/s 1996, n° 4, p. 542*). Cette affection est caractérisée par: (1) une hypercalciurie qui engendre des calculs rénaux et entraîne une néphrocalcinose pouvant aller jusqu'à un blocage rénal; et (2) une protéinurie qui concerne les protéines de faible poids moléculaire. Si la relation de cause à effet entre la perte d'un courant chlorure et l'hypercalciurie est difficile à établir, les mécanismes responsables de la protéinurie sont plus faciles à comprendre. Les protéines de faible poids moléculaire sont normalement réabsorbées par endocytose par les cellules du tubule contourné proximal, qui expriment fortement CIC-5. Dans ces cellules, la protéine CIC-5 est localisée principalement dans une région apicale, sous la bordure en

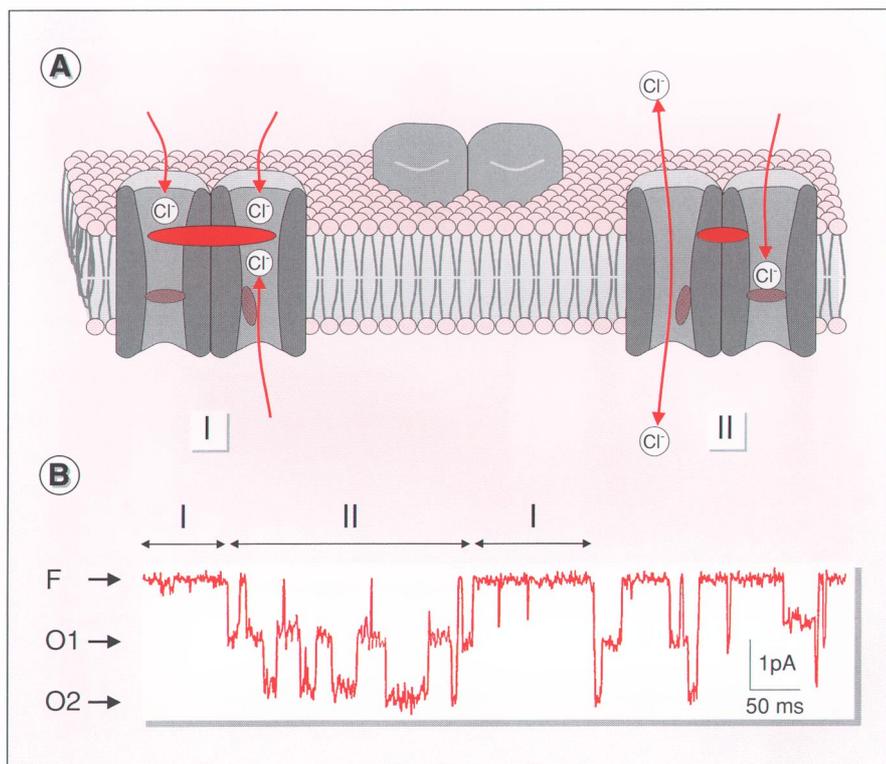


Figure 3. Modèle de fonctionnement des canaux chlorure de type CIC. **A.** Modèle structural de dimère, composé de deux sous-unités identiques, chacune formant un canal ionique. **B.** Enregistrement du courant ionique passant à travers un dimère unique situé sur un fragment de membrane d'ovocyte de xénope exprimant le CIC-0 de la Torpille. Les ouvertures des deux canaux se manifestent par des déflections vers le bas. Les canaux soit sont tous les deux fermés (phase I, niveau de courant F), soit présentent des pics d'activité pendant lesquels la probabilité d'ouverture des deux canaux est grande (phase II, niveaux O1 et O2). Ce type d'activité traduit la présence de deux modes d'ouverture. D'une part, un mode d'ouverture à cinétique lente commun aux deux protopores et induit par l'ion chlorure lui-même. Ce mode, schématisé en A par un mécanisme affectant simultanément les deux canaux (rouge), est responsable des périodes de fermeture longue et des pics d'activité. D'autre part, un mode d'ouverture rapide, indépendant pour chaque canal (porte bistre en A), activé par l'ion chlorure externe et stabilisé par l'ion chlorure interne, et qui est responsable des transitions rapides pendant les pics d'activité (l'enregistrement et le modèle ont été aimablement fournis par Michael Pusch).

brosse, où se trouvent aussi le transporteur de protons et les vésicules d'endocytose (figure 4) [8-10]. Un dysfonctionnement du canal CIC-5 résulterait donc en une réduction du transport de protons dans les vésicules d'endocytose, due à la diminution du flux d'ions chlorure pour contrebalancer la charge protonique. L'acidification des vésicules est donc réduite, limitant l'absorption des protéines. Le CIC-5 serait donc essentiel à l'acidification des vésicules d'endocytose au cours de la phase précoce d'absorption des protéines.

Les canaux CIC-Ka et CIC-Kb ont 90 % d'homologie et sont exprimés presque exclusivement dans le rein, où ils semblent localisés au niveau de la membrane plasmique des cellules épithéliales dans différentes parties du néphron, notamment la branche ascendante de l'anse de Henlé [2]. Un rôle du CIC-Ka dans la concentration de l'urine a été récemment mis en évidence par l'invalidation du gène correspondant chez la souris. Les souris mutantes présentent une augmentation importante de leur diurèse, symptôme qui caractérise le diabète insi-

pide néphrogénique [11]. Par ailleurs, des mutations du gène *CIC-Kb* sont responsables du syndrome de Bartter, affection rare, autosomique récessive caractérisée par une perte de sel au niveau rénal qui conduit à une sévère alcalose hyperkaliémique [12]. Cette découverte suggère que le CIC-Kb pourrait former le canal de la membrane basolatérale de la branche ascendante de l'anse de Henlé, responsable du transport transépithélial des ions chlorure [2, 13].

Le canal CIC-2 est exprimé de manière ubiquitaire, favorise la sortie des ions chlorure (propriété dite à « rectification entrante ») et est activé par l'hyperpolarisation membranaire et l'augmentation de volume cellulaire [2]. Cette dernière propriété laisse penser que CIC-2 pourrait être impliqué dans la régulation du volume cellulaire, dont on sait qu'elle est en partie sous le contrôle des canaux chlorure. L'hypothèse est renforcée par les expériences de surexpression de CIC-2 dans certains types cellulaires [14], mais reste à démontrer dans des cellules non transfectées. De plus, les caractéristiques biophysiques et pharmacologiques du canal CIC-2 diffèrent des propriétés des principaux canaux chlorure sensibles au volume [15, 16], et ne peuvent expliquer les mécanismes de régulation volumique déclenchés par des stimulus hypotoniques [15, 17]. Le rôle du CIC-2 n'est donc pas fermement établi, et pourrait varier en fonction des types cellulaires. Sa participation à la régulation du gradient des ions chlorure dans certains neurones, modulant ainsi l'influence inhibitrice du GABA [18, 19], a été proposée.

L'expression de *CIC-3* dans certaines lignées cellulaires entraîne la présence, dans la membrane plasmique, de canaux chlorure activés en réponse à une augmentation de volume cellulaire [20]. Les propriétés physiologiques et pharmacologiques du canal CIC-3, contrairement à celles du CIC-2, sont remarquablement identiques aux propriétés des principaux canaux chlorure sensibles au volume cellulaire [15, 16]. La seule différence majeure semble être leur régulation par la protéine kinase C (PKC), enzyme cruciale dans la détermination de la sensibilité du canal CIC-3 au volume [20], alors

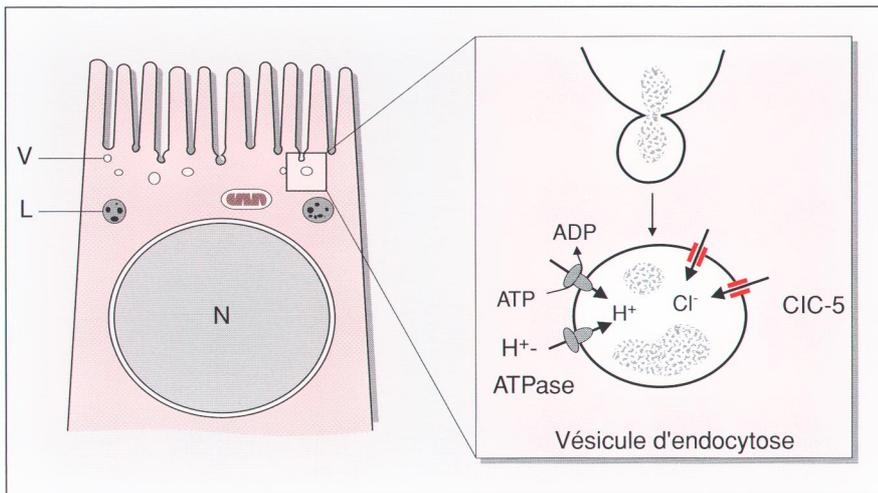


Figure 4. **Illustration du rôle proposé du ClC-5 dans l'acidification des vésicules d'endocytose des cellules épithéliales du tubule contourné proximal du rein.** Les protéines de faible poids moléculaire sont endocytosées au niveau de la membrane apicale, et les vésicules sont progressivement acidifiées par l'intermédiaire de la pompe à protons lors de leur parcours vers les lysosomes, où les protéines sont finalement dégradées. L'acidification nécessite l'entrée d'anions pour neutraliser la charge des protons. L'absence de ClC-5 limite cette acidification, altérant le processus d'endocytose et le trafic des vésicules. V: vésicule d'endocytose; L: lysosome, N: noyau. (D'après [23].)

que la plupart des canaux chlorure sensibles au volume ne sont pas ou peu affectés par la PKC [15, 16]. Le ClC-3 pourrait donc représenter un sous-type de canal activé par le gonflement cellulaire, sensible à la PKC et présent dans certains types cellulaires tels que les myocytes cardiaques ou les muscles lisses vasculaires et entériques [20]. Cependant, cette interprétation reste controversée. En effet, ces résultats n'ont pas pu être reproduits, et les canaux ClC-4 et ClC-5, qui présentent une très forte homologie avec ClC-3, ont des propriétés radicalement différentes [2]. La fonction du ClC-3 dans la régulation du volume cellulaire reste donc à établir de manière définitive, et l'on devra patienter encore un peu pour connaître à coup sûr l'identité des canaux chlorure sensibles au volume.

Le rôle des autres ClC reste plus obscur. L'expression fonctionnelle du ClC-4 n'a été réalisée que très récemment, alors que celle des ClC-6 et des ClC-7 n'est toujours pas obtenue [2]. Dernièrement, l'étude de la localisation subcellulaire de ClC-6 a montré qu'il s'associe au réticulum endoplasmique, ce qui suggère que ClC-6 serait un canal d'organite intracellu-

laire [21]. ClC-7, qui présente une forte homologie avec ClC-6, pourrait également constituer un canal intracellulaire.

Bien que notre connaissance des canaux de type ClC augmente rapidement, de nombreux aspects de leur structure, de leur fonction, ou de leur régulation restent à comprendre. L'image pourrait même être plus complexe si l'on considère la possibilité de formation de canaux hétérodimériques fonctionnels obtenus par l'assemblage de différentes sous-unités, ainsi qu'il a été montré lors de co-expression de ClC-1 et ClC-2 [22]. Quoi qu'il en soit, ces canaux jouent un rôle fondamental dans de nombreuses fonctions cellulaires, comme l'attestent leur distribution cellulaire et subcellulaire, et les maladies liées à leur dysfonctionnement. Les études à venir devraient permettre d'élucider les mécanismes responsables des symptômes de ces maladies génétiques, et pourraient révéler de nouvelles implications pathologiques. L'histoire de la découverte de cette famille de canaux ioniques illustre tout l'intérêt, pour la compréhension de multiples maladies humaines, de l'étude des fonctions des animaux primitifs (comme la Torpille) ■

Note

Cette *mini-synthèse* a été réalisée d'après les conférences de Thomas J. Jentsch et de Michael Pusch, ce dernier ayant contribué à l'élaboration de l'une des figures. Nous nous sommes également largement inspirés de l'excellente récente revue de T. J. Jentsch *et al.* [2], que les lecteurs de *médecine/sciences* sont invités à consulter pour une information plus détaillée sur le sujet.

RÉFÉRENCES

- Jentsch TJ, Steinmeyer K, Schwartz G. Primary structure of *Torpedo marmorata* chloride channel isolated by expression cloning in *Xenopus* oocytes. *Nature* 1990; 348: 510-4.
- Jentsch TJ, Friedrich T, Schriever A, Yamada H. The ClC chloride channel family. *Pflüg Arch* 1999; 437: 783-95.
- Saviane C, Conti F, Pusch M. The muscular chloride channels CLC-1 has a double barreled appearance that is differentially affected in dominant and recessive myotonia. *J Gen Physiol* 1999; 113: 457-67.
- Pusch M. Knocking on channel's door. The permeating chloride ion acts as the gating charge in ClC-0. *J Gen Physiol* 1996; 108: 233-6.
- Pusch M, Jordt SE, Stein V, Jentsch TJ. Chloride dependence of hyperpolarization-activated chloride channel gates. *J Physiol* 1999; 515: 341-53.
- Plassart Schiess E, Gervais A, Eymard B, *et al.* Novel muscle chloride channel (CLCN1) mutations in myotonia congenita with various modes of inheritance including incomplete dominance and penetrance. *Neurology* 1998; 50: 1176-9.
- Pusch M, Steinmeyer K, Koch MC, Jentsch TJ. Mutations in dominant human myotonia congenita drastically alter the voltage dependence of the ClC-1 chloride channel. *Neuron* 1995; 15: 1455-63.
- Günther W, Lüchow A, Cluzeaud F, Vandewalle A, Jentsch TJ. ClC-5, the chloride channel mutated in Dent's disease, colocalizes with the proton pump in endocytotically active kidney cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 8075-80.
- Luyckx VA, Goda FO, Mount DB, *et al.* Intrarenal and subcellular localization of rat ClC5. *Am J Physiol* 1998; 275: F761-9.
- Devuyst O, Christie PT, Courtoy PJ, Beauwens R, Thakker RV. 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: 247-57.
- Matsumura Y, Uchida S, Kondo Y, *et al.* Overt nephrogenic diabetes insipidus in mice lacking the ClC-K1 chloride channel. *Nat Genet* 1999; 21: 95-8.

RÉFÉRENCES

12. Simon DB, Bindra RS, Mansfield TA, *et al.* Mutations in the chloride channel gene CLCNKB cause Bartter's syndrome type III. *Nat Genet* 1997; 17: 171-8.
13. Thakker RV. Chloride channels cough up. *Nat Genet* 1997; 17: 125-7.
14. Xiong H, Li C, Garami E, Wang Y, Ramjeesingh M, Galley K, Bear CE. ClC-2 activation modulates regulatory volume decrease. *J Membr Biol* 1999; 167: 215-21.
15. Strange K, Emma F, Jackson PS. Cellular and molecular physiology of volume-sensitive anion channels. *Am J Physiol* 1996; 270: C711-30.
16. Nilius B, Eggermont J, Voets T, Buyse G, Manopoulos V, Droogmans G. Properties of volume-regulated anion channels in mammalian cells. *Prog Biophys Mol Biol* 1997; 68: 69-119.
17. Bond TD, Ambikapathy S, Mohammad S, Valverde MA. Osmosensitive Cl⁻ currents and their relevance to regulatory volume decrease in human intestinal T₈₄ cells: outwardly *versus*, inwardly rectifying currents. *J Physiol* 1998; 511: 45-54.
18. Staley K, Smith R, Schaack J, Wilcox C, Jentsch TJ. Alteration of GABA_A receptor function following gene transfer of the ClC-2 chloride channel. *Neuron* 1996; 17: 543-51.
19. Clark S, Jordt SV, Jentsch TJ, Mathie A. Characterization of the hyperpolarization-activated chloride current in dissociated rat sympathetic neurons. *J Physiol* 1998; 506: 665-78.
20. Duan D, Cowley S, Horowitz B, Hume JR. A serine residue in ClC-3 links phosphorylation-dephosphorylation to chloride channel regulation by cell volume. *J Gen Physiol* 1999; 113: 57-70.
21. Buyse G, Trouet D, Voets T, *et al.* Evidence for the intracellular location of chloride channel (ClC)-type proteins: co-localization of ClC-6a and ClC-6b with the sarco/endoplasmic-reticulum Ca²⁺ pump SERCA2b. *Biochem J* 1998; 330: 1015-21.
22. Lorenz C, Pusch M, Jentsch TJ. Heteromultimeric ClC chloride channels with novel properties. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 13362-6.
23. George AL Jr. Chloride channels and endocytosis: ClC-5 makes a dent. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 7843-5.

TIRÉS À PART

N. Hussy.

Nicolas Hussy

Biologie des neurones endocrines, Cnrs-UPR 9055, CCIPE, 141, rue de la Cardonille, 34094 Montpellier Cedex 5, France.

Cyrille Forestier

DEVM/LBC C.E.A., Cadarache, 13108 Saint-Paul-lès-Durance, France.

Alain Vavasseur

DEVM/LBC C.E.A., Cadarache, 13108 Saint-Paul-lès-Durance, France.

Frédéric Becq

Physiologie des régulations cellulaires, Cnrs UMR 6558, Université de Poitiers, 40, avenue du Recteur-Pineau, 86022 Poitiers Cedex, France.

Jean Valmier

Laboratoire de médecine expérimentale, Cnrs ERS 155, Institut de biologie, 4, boulevard Henri-IV, 34060 Montpellier, France.

Les auteurs font partie du comité d'organisation du Colloque Canaux Ioniques.
Site web: <http://physio.univ-lyon1.fr/canaux/canaux.htm>

GERDA

Groupe d'Études et de Recherches en Dermato-Allergologie

PARIS

Palais des Congrès
5 au 7 octobre 2000

Dermato-allergo-pédiatrie
Pathologies allergiques des muqueuses

Organisation scientifique :

Dr Annik Pons-Guiraud/10, bd Malesherbes, 75008 Paris, France.
Tél. : 01 42 66 32 01/Fax : 01 42 66 32 13 – E-mail : Annick.Pons-guiraud@wanadoo.fr

Organisation technique :

MELTHEM/95, rue de Lourmel, 75015 Paris, France.
Tél. : 01 44 26 16 48/Fax : 01 45 54 36 21 – E-mail : melthem@club-internet.fr