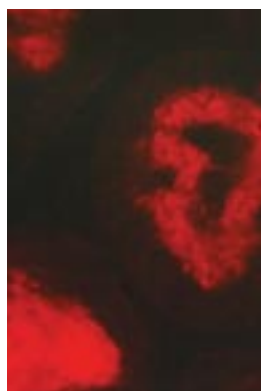


> Le clonage d'un canal chlorure dans l'organe électrique de la torpille en 1990 a permis l'identification d'une vaste famille de canaux chlorure dont les représentants sont exprimés aussi bien chez les bactéries que dans les plantes ou chez les mammifères. Ces canaux, appelés CIC ou dépendants du voltage, ont une distribution tissulaire très variée et peuvent s'exprimer dans la membrane plasmique comme sur les membranes des organites intracellulaires. Leur découverte récente fait que de nombreux aspects de l'organisation, des propriétés électrophysiologiques et des fonctions de ces canaux restent indéterminés. Nous faisons le point dans cet article sur les données actuelles en insistant sur trois fonctions physiologiques principales : le contrôle de l'excitabilité musculaire, la participation à l'absorption de chlorure dans le tube rénal et l'implication dans les phénomènes d'endocytose. <

Fonctions physiologiques des canaux chlorure de la famille CIC

Jacques Teulon, Alain Vandewalle



Inserm U.426 et U.478, IFR 02,
Faculté de médecine Xavier
Bichat, 75780 Paris Cedex 18,
France.

teulon@bichat.inserm.fr

La famille des canaux CIC (*chloride channel*) a été fondée à la même époque à la suite du clonage du canal Cl^- de la raie torpille (CIC-0) par Thomas J. Jentsch *et al.* [3-7] (→). Les canaux CIC sont exprimés dans des organismes aussi variés que les levures, les archéobactéries, les bactéries, les plantes et les animaux (*Figure 1A*) [3, 8]. Il y a par exemple 6 canaux CIC dans le ver nématode *Caenorhabditis elegans*, et 9 canaux CIC différents ont été identifiés chez les mammifères. Ils se regroupent en trois sous-familles principales (*Figure 1A*). Leur structure secondaire n'est pas encore pleinement élucidée (*Figure 1B*) : le modèle initial, qui incluait 13 segments hydrophobes transmembranaires, a été modifié car les segments S9-S12 constituent des régions hydrophobes massives dont l'organisation est difficile à démêler [3, 6]. Des difficultés analogues existent pour le domaine S4 qui, selon les auteurs, est extracellulaire ou transmembranaire [7]. Au total, les CIC auraient 10 à 12 segments transmembranaires et un seul site de glycosylation commun (*Figure 1B*). Il existe un consensus pour admettre que la structure quaternaire est au moins dimérique.

Comparés aux autres canaux ioniques, les canaux Cl^- ont longtemps joué le rôle d'*outsider* intéressant mais marginal. Cela est dû en partie à ce que les conductances Cl^- sont plus difficiles à détecter que d'autres mais aussi, plus fondamentalement, à ce que les fonctions des canaux Cl^- de la membrane plasmique sont discrètes dans la plupart des tissus. Hors du champ du système nerveux et de ses canaux-récepteurs Cl^- de type GABA_A et glycine, deux variétés de tissus font exception : le muscle squelettique, tissu dans lequel il a été montré dès 1960 que la conductance Cl^- représente environ 80 % de la conductance membranaire totale, et les épithéliums [1]. Le rôle pivot des canaux Cl^- dans les structures épithéliales qui absorbent ou sécrètent des ions Cl^- n'a émergé que plus tardivement dans les années 1970-1980. C'est à la fin de cette période que l'isolement du gène dont les mutations sont responsables de la mucoviscidose, codant pour le *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR) [2], a révolutionné le domaine des canaux Cl^- et lui a donné l'ampleur qu'on lui connaît aujourd'hui.

Les CIC ont une distribution tissulaire, cellulaire et sub-cellulaire très diverse (Tableau 1). Ceci laisse présager des fonctions physiologiques variées mais qui, pour l'heure, restent souvent spéculatives. L'objectif de cet article est d'évaluer globalement la place des CIC dans la « physiologie » des canaux Cl^- en nous appuyant sur les trois fonctions qui, chez les mammifères, sont solidement identifiées : stabilisation du potentiel de membrane dans le muscle squelettique (CIC-1), absorption de chlorure dans le tubule rénal (CIC-K2 ou CIC-KB) et accompagnement des flux de protons dans diverses structures (CIC-5). La description de certaines propriétés caractéristiques des canaux CIC nous a cependant paru nécessaire, non seulement parce qu'il serait étrange de parler de canaux ioniques sans se référer à un moment ou à un autre à l'électrophysiologie, mais aussi parce que ces propriétés aident à comprendre certains traits physiopathologiques.

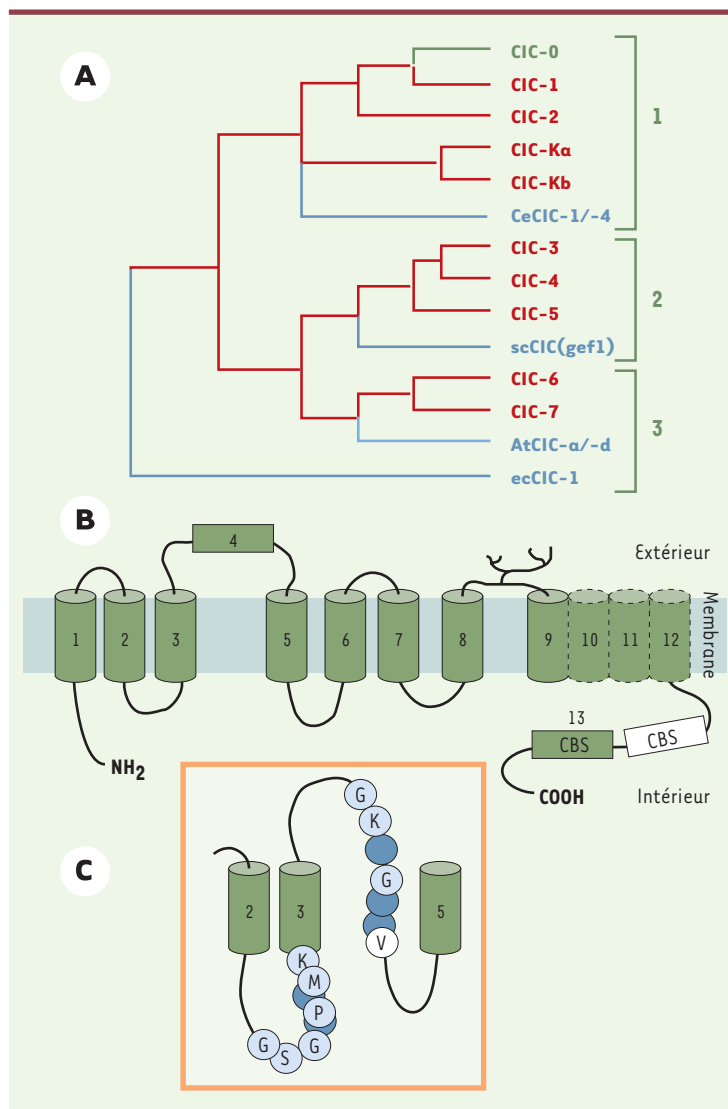
Des canaux ioniques aux propriétés originales

Les propriétés électrophysiologiques des canaux CIC sont principalement connues grâce aux études sur CIC-0, CIC-1 et CIC-2 [4, 6, 9], les données sur les autres CIC étant limitées, contradictoires ou absentes.

Une propriété fondamentale des canaux ioniques est leur sélectivité, c'est-à-dire la capacité de ne laisser passer que certains ions et d'en exclure d'autres. De façon générale, les canaux anioniques (dont les CIC) excluent strictement les cations [7] mais discriminent assez faiblement les différents anions, le rapport de perméabilité entre l'ion le plus perméant et l'ion le moins perméant excédant rarement 10. Le bicarbonate fait exception avec une perméabilité 50 fois plus réduite que celle du Cl^- dans le cas du CIC-1 [10]. L'étude électrophysiologique de canaux CIC-1 mutés a montré qu'une zone du segment S4 est responsable de

Figure 1. La famille moléculaire des canaux chlorure CIC. A.

Arbre phylogénétique des canaux CIC. Trois sous-familles ont été identifiées. Sont représentés les CIC décrits chez l'homme (en rouge) plus ceux d'un certain nombre d'organismes : le ver *Caenorhabditis elegans* (ce), la plante *Arabidopsis thaliana* (At), la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) et la bactérie *Escherichia coli* (ec). CIC-0 est le canal de l'organe électrique de la raie torpille. Les numéros désignent les trois sous-familles des canaux CIC. *Caenorhabditis elegans* possède 6 canaux CIC : quatre appartiennent à la sous-famille 1 tandis que les deux derniers, non représentés sur le diagramme, appartiennent aux sous-familles 2 et 3. **B.** Topologie membranaire. L'analyse hydrophatique a initialement identifié 13 domaines en hélice α mais le segment 13 est en fait intracellulaire. La localisation du segment 4 est controversée. Les motifs appelés CBS, identifiés au départ dans la cystathionine-b synthase [3], n'ont pas de fonction claire. Une mutation dans ces domaines est à l'origine d'un adressage défectueux de la protéine CIC de levure (gef1) mais n'a pas d'effet sur d'autres CIC. La chaîne reliant S8 à S9 est un site de glycosylation pour tous les canaux CIC. **C.** Vue agrandie des segments 2-5 telle qu'elle est postulée par Christoph Fahlke et Alfred George [7]. Noter la localisation transmembranaire du S4 (non identifié en tant que tel ici). Chaque lettre représente un acide aminé (selon le code habituel). Toute substitution d'acide aminé sur les points identifiés en bleu ou blanc entraîne un changement de la sélectivité anionique. En bleu clair sont représentés les acides aminés dont la mutation augmente la perméabilité au sodium. La mutation faux-sens remplaçant une glycine par un acide glutamique en position 230 est une cause de myotonie congénitale, probablement en raison de l'augmentation de la perméabilité au sodium qui en résulte [7].



la faible perméabilité aux cations [7] (Figure 1C). En certains points, la substitution d'un seul acide aminé augmente la perméabilité au sodium d'un facteur 6. Cette découverte est importante pour la compréhension des mécanismes de la sélectivité anionique.

Les canaux CIC ont la particularité de posséder deux pores de conduction par canal [3, 6, 9, 11, 12]. C'est en étudiant le canal Cl^- de l'organe électrique (CIC-0) de la raie torpille [13], purifié et reconstitué dans des bicouches lipidiques artificielles, que Chris Miller a, le premier, observé que les créneaux de courant produits par un seul canal oscillaient entre un niveau fermé et deux niveaux ouverts, l'un étant le double de l'autre (Figure 2A). De ce résultat surprenant - un canal unique ne devrait produire que des créneaux de courant d'une seule amplitude - il a déduit que chaque canal CIC-0 devait comporter deux pores distincts et indépendants, appelés proto-pores.

Des études cristallographiques de canaux CIC de bactéries ont confirmé, de façon plus directe, les résultats électrophysiologiques [14]. Cette structure de canal à double pore est originale puisque, en général, l'ensemble des sous-unités d'un canal ionique contribue à la formation d'un seul pore de conduction [7].

Le canal CIC-0, comme beaucoup de canaux ioniques, s'active rapidement sous l'effet d'une dépolarisation (c'est-à-dire lorsque le potentiel devient moins négatif) (Figure 2C). Cependant, la sensibilité au voltage ne résulte pas de la présence d'un capteur de voltage intégré dans la protéine, comme c'est le cas pour les canaux cationiques dépendants du voltage [6]. L'ouverture de chaque proto-pore du canal est, en fait, contrôlée par le Cl^- lui-même, qui se fixe sur deux sites de liaison situés à l'intérieur même du pore de conduction [6, 9]. La fixation de l'anion sur le site le plus profond est influencée par la différence de potentiel transmembranaire, et c'est ce mécanisme qui confère au proto-pore sa sensibilité au voltage. La diminution de la concentration de Cl^- extracellulaire,

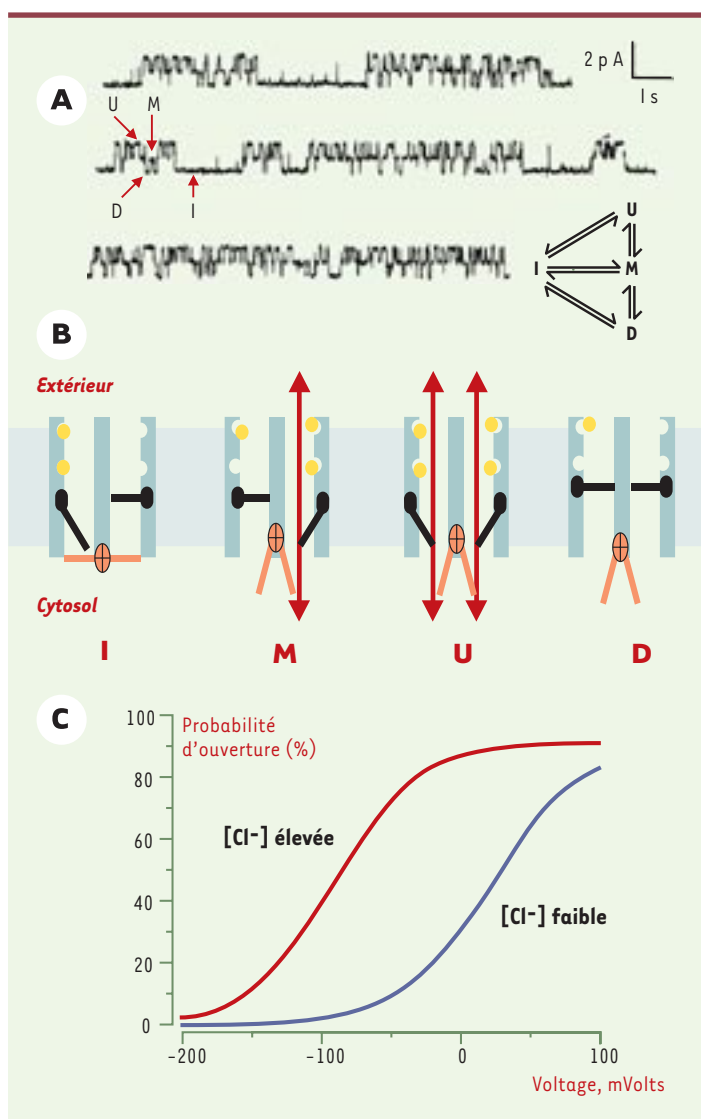


Figure 2. Propriétés électrophysiologiques des CIC. A. Enregistrement en fonction du temps des courants produits par un seul canal Cl^- de l'organe électrique de la torpille, reconstitué dans une bicouche lipidique artificielle. L'ordonnée est exprimée en picoAmpères. L'ouverture d'un seul proto-pore produit un créneau de courant (noté M pour *middle*) dont l'amplitude double quand les deux proto-pores sont ouverts simultanément (noté U pour *up*). D (*down*) : fermé ; I : inactivé (enregistrement reproduit de [13]). B. Vue schématique du fonctionnement du canal CIC-0 (d'après [9, 11, 43]). Le canal est formé de deux proto-pores constituant un seul canal. Chaque proto-pore est fermé par une barrière indépendante (en noir) qui symbolise un changement de conformation ; la fixation de Cl^- (pastilles jaunes) sur des sites situés à l'intérieur du proto-pore facilite l'ouverture de ce dernier. La fixation de l'anion est favorisée par la dépolarisation de la membrane. Une autre barrière (en orange) commande simultanément les deux proto-pores. Les lettres sous chaque schéma renvoient à l'enregistrement montré dans la partie A : I : la barrière commune est fermée. Le canal ne conduit pas, que les barrières des proto-pores soient ouvertes ou non. M : la barrière commune est ouverte. Le canal peut laisser passer des anions. Dans l'exemple illustré, une seule des deux barrières portées par les proto-pores est ouverte. U : la barrière commune est ouverte ainsi que les deux proto-pores. L'intensité du courant est double de celle observée en M. D : la barrière commune est ouverte mais les deux proto-pores sont fermés. Aucun courant ne passe. C. Influence des ions Cl^- extracellulaires sur la probabilité d'ouverture du proto-pore. La probabilité d'ouverture du proto-pore augmente avec la dépolarisation selon le mécanisme expliqué dans la Figure 2A. La diminution de la concentration de Cl^- déplace la courbe d'activation vers des potentiels plus positifs. (adapté de [44]).

en rendant plus difficile la fixation du Cl^- sur les sites de liaison, a pour effet de déplacer la courbe d'activation vers des potentiels plus positifs (Figure 2C). Les CIC-0 possèdent un second mécanisme dépendant du voltage qui, contrairement au premier, contrôle simultanément l'activité des deux proto-pores : il s'agit d'une inactivation induite par des dépolarisations de longue durée (> 20 secondes) et levée par une hyperpolarisation [6, 9] (Figure 2B). Cette inactivation se manifeste par de longues interruptions d'activité (Figure 2A, notées I).

Si tous les canaux CIC dépendent du voltage, le sens de cette dépendance et son intensité sont variables d'un canal à l'autre [4, 6]. Une hypothèse permet de rendre compte de cette diversité : elle considère que tous les CIC possèdent potentiellement les deux mécanismes (activation/inactivation) démontrés pour CIC-0 mais que leurs poids respectifs varient d'un canal à l'autre [9, 15]. À un extrême, l'activation rapide par dépolarisation domine : c'est le cas de CIC-1 (voir plus loin). À l'autre extrême, la levée de l'inactivation par hyperpolarisation domine : c'est le cas du CIC-2 qui est activé aux potentiels très négatifs.

Contrôle de l'excitabilité musculaire par le canal CIC-1

Les mutations du gène codant pour le canal chlorure CIC-1 sont responsables chez l'homme de la myotonie congénitale (ou maladie de Thomsen), qui est une maladie autosomique à caractère dominant, de prévalence très rare, et de la myotonie généralisée, plus fréquente et de caractère récessif [16]. Ces maladies, qui appartiennent à la classe des myotonies non dystrophiques, se manifestent par une raideur musculaire prolongée survenant à la suite d'un mouvement volontaire. Les manifestations en sont aggravées par le repos et améliorées progressivement par l'exercice. Ce phénomène est dû à ce que des trains de potentiels d'action continuent d'être produits après la cessation de l'effort et retardent le relâchement musculaire [16]. Assez curieusement, il existe une lignée de chèvres américaines qui souffre d'une myotonie similaire à caractère dominant. Shirley Bryant *et al.* [17] ont montré que : (1) la conductance Cl^- de la fibre musculaire

était extrêmement réduite chez les chèvres myotoniques ; et que (2) l'inhibition pharmacologique de la conductance Cl^- induisait un phénotype myotonique chez des chèvres normales. Cela indiquait que la myotonie résultait probablement d'une diminution de la conductance Cl^- du muscle squelettique, une hypothèse qui fut confirmée à la même époque sur des biopsies de patients [16]. Le même groupe [18] montra en outre qu'une stimulation électrique d'intensité appropriée produit un seul potentiel d'action dans une fibre musculaire de chèvre normale tandis qu'elle induit une série de potentiels d'action chez la chèvre myotonique (Figure 3A).

Comment expliquer cette influence des canaux Cl^- sur les potentiels d'action ? Dans la fibre musculaire squelettique, la conductance Cl^- représente environ 80 % de la

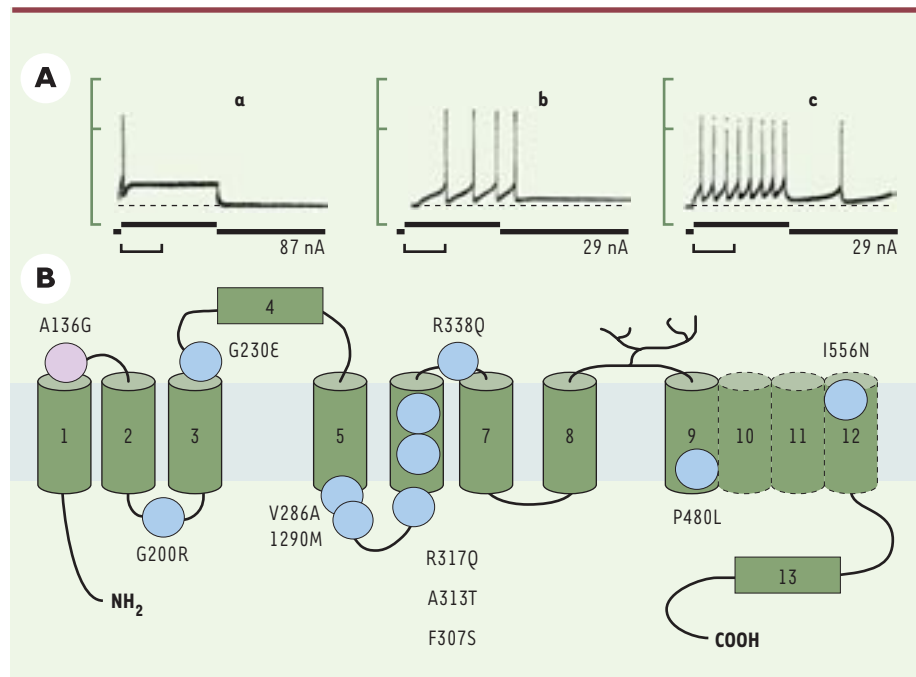


Figure 3. Le canal CIC-1 et la myotonie. A. Enregistrements des potentiels d'action et du potentiel électrotonique induits par une stimulation électrique sur des fibres musculaires intercostales de chèvre. L'intensité de la stimulation électrique appliquée à la fibre musculaire apparaît sous chaque enregistrement et est exprimée en nanoAmpères (reproduit de [18], avec la permission de *J Physiol*). a : fibre témoin, un seul potentiel d'action est observé ; b : fibre provenant d'un animal myotonique, plusieurs potentiels d'action sont déclenchés par une stimulation qui a pourtant une intensité trois fois moindre ; c : fibre témoin, un train de potentiels d'action est observé sur les fibres témoins lorsque le chlorure extracellulaire est remplacé par un anion non perméant (les canaux chlorure ne peuvent plus remplir leur fonction). Cette situation reproduit la réponse observée chez les chèvres myotoniques. B. Représentation schématique du canal CIC-1 et d'un certain nombre de mutations faux-sens détectées chez des patients atteints de myotonie. La première lettre désigne le code de l'acide aminé sauvage, le nombre, la position et la seconde lettre la substitution observée. Ces mutations, à l'exception de G230 (Figure 1C), déplacent la courbe d'activation vers des voltages plus positifs. La mutation représentée en violet inverse la sensibilité au voltage du canal en faisant apparaître un phénomène dominant d'activation par hyperpolarisation [15, 45].

conductance membranaire totale au repos et amortit les variations du potentiel de membrane, contrôlant ainsi l'excitabilité de la fibre et combattant l'effet dépolarisant de l'accumulation de potassium dans les tubules T, accumulation qui se produit lors de l'excitation. Cet effet stabilisateur disparaît lorsque la conductance Cl^- diminue. Un moindre courant de stimulation est alors suffisant pour déclencher des potentiels d'action. On peut remarquer qu'un rôle analogue de stabilisation du potentiel transmembranaire est joué par le canal ClC-0 dans l'organe électrique de la torpille [12].

Une trentaine de mutations pathogènes de ClC-1 ont été décrites chez l'homme [16] (Figure 3B). Ce canal a une activité (probabilité d'ouverture) qui augmente avec la dépolarisation selon un profil qualitativement analogue à celui montré pour le proto-pore de ClC-0 (Figure 2C). Dans le cas de la forme dominante de myotonie, la conséquence de la mutation est, le plus souvent, un déplacement de la courbe de la probabilité d'ouverture vers des potentiels plus positifs ; cela a pour effet de diminuer considérablement la valeur de la conductance Cl^- au potentiel de repos (plus de 50 %) [16]. Une mutation particulière a des effets très différents car elle induit, outre une diminution de la conductance Cl^- (qui n'est pas due à une altération de la dépendance au voltage), une forte augmentation de la perméabilité au sodium (Figure 1C et Figure 3B). Un flux entrant accru de sodium dans la fibre musculaire non stimulée est probablement suffisant pour causer des séries de potentiels d'action à caractère myotonique [1].

Le canal ClC-KB : participation à l'absorption rénale de chlorure

Une autre fonction des canaux Cl^- est le transport trans-épithélial de Cl^- . Ce processus joue un rôle physiologique crucial dans le rein puisque l'ultrafiltration du plasma sanguin par les glomérules des néphrons délivre à l'ensemble des tubules rénaux un liquide (environ 180 litres par jour), riche en NaCl , qui doit être réabsorbé dans sa quasi-totalité. Cette opération s'effectue selon des modalités variables le long du tubule rénal. Dans le tubule proximal, le transport du Cl^- de la lumière du tubule vers l'interstitium est essentiellement para-cellulaire. En revanche, ce transport est trans-cellulaire et implique la présence de canaux Cl^- dans les portions plus distales, branche large ascendante de l'anse de Henle et tube contourné distal (Figure 4A). Dans son principe, le mécanisme du transport est fondé sur l'existence d'un transport couplé de Cl^- dans la membrane apicale et de l'association d'une pompe Na^+ , K^+ -ATPase et de conductances Cl^- dans la membrane basolatérale (Figure 4, B-C). Des études de

patch-clamp (→) ont mis en évidence deux canaux Cl^- dans la partie corticale de la branche large ascendante [19, 20] (Figure 4D) et un troisième dans sa partie médullaire [21]. En revanche, on ne sait rien sur les canaux Cl^- du tubule contourné distal.

Les études de génétique ont révélé que certains patients souffrant d'un syndrome de Bartter portaient des mutations du gène codant pour ClC-KB [22], un canal ClC notamment localisé sur la membrane basolatérale de la branche large ascendante de l'anse de Henle et du tubule contourné distal [23]. Le syndrome de Bartter (→) est une tubulopathie rénale de transmission autosomique récessive, de sévérité variable, affectant les capacités de transport de NaCl de l'anse de Henle et diminuant le pouvoir de concentration urinaire [23]. Outre une excrétion inappropriée de NaCl (c'est-à-dire une fuite rénale de sodium), ce syndrome est caractérisé par une alcalose métabolique, une hypokaliémie d'origine rénale et un hyperaldostérionisme secondaire avec pression artérielle normale. Ces derniers traits sont la conséquence d'une charge de NaCl accrue dans le néphron distal. Un tableau clinique moins sévère, le syndrome de Gitelman (→), est lié à une atteinte du tubule contourné distal. Les mutations inactivatrices du ClC-KB quoique occasionnellement responsables de la forme la plus sévère (syndrome de Bartter anténatal), sont généralement associées à un Bartter dit « classique » ou même à un phénotype mixte Bartter-Gitelman, tous deux moins sévères. En particulier, il n'y a pas de tableau de néphrocalcinose et l'hypercalciurie, marque spécifique du syndrome de Bartter (et d'une atteinte de la branche large ascendante de l'anse de Henle), n'est pas constante [22]. Il est dès lors naturel de penser que l'hétérogénéité clinique provient de ce que l'expression de ClC-KB recouvre ces deux segments tubulaires, la moindre sévérité pouvant être due à la présence de plusieurs systèmes de transport pour l'ion Cl^- .

L'ensemble des données actuelles désigne donc le canal ClC-KB (ClC-K2 chez la souris) comme principal responsable du transport de Cl^- dans ces segments du rein. Deux questions restent sans réponse. La première concerne l'identité moléculaire, non résolue jusqu'à présent, des canaux Cl^- endogènes qui ont été caractérisés par *patch-clamp* (Figure 4D) [19, 20]. La seconde est posée par l'existence, troublante, d'un canal ClC-KA (ClC-K1 chez la souris) ayant 90 % d'analogie avec ClC-KB et localisé dans les mêmes zones du rein. Ce canal n'est impliqué dans aucune maladie humaine. Les souris dont le gène ClC-K1 a été invalidé souffrent d'un diabète insipide néphrogénique qui serait dû à une perméabilité Cl^- réduite de la portion grêle de la branche ascendante de l'anse de Henle [5] (Figure 4A).

(→) m/s
1987, n°9,
p. 538
et
1997, n°10,
p. 1157

(→) m/s
1996, n°10,
p. 1168

(→) m/s
1996, n°4,
p. 541

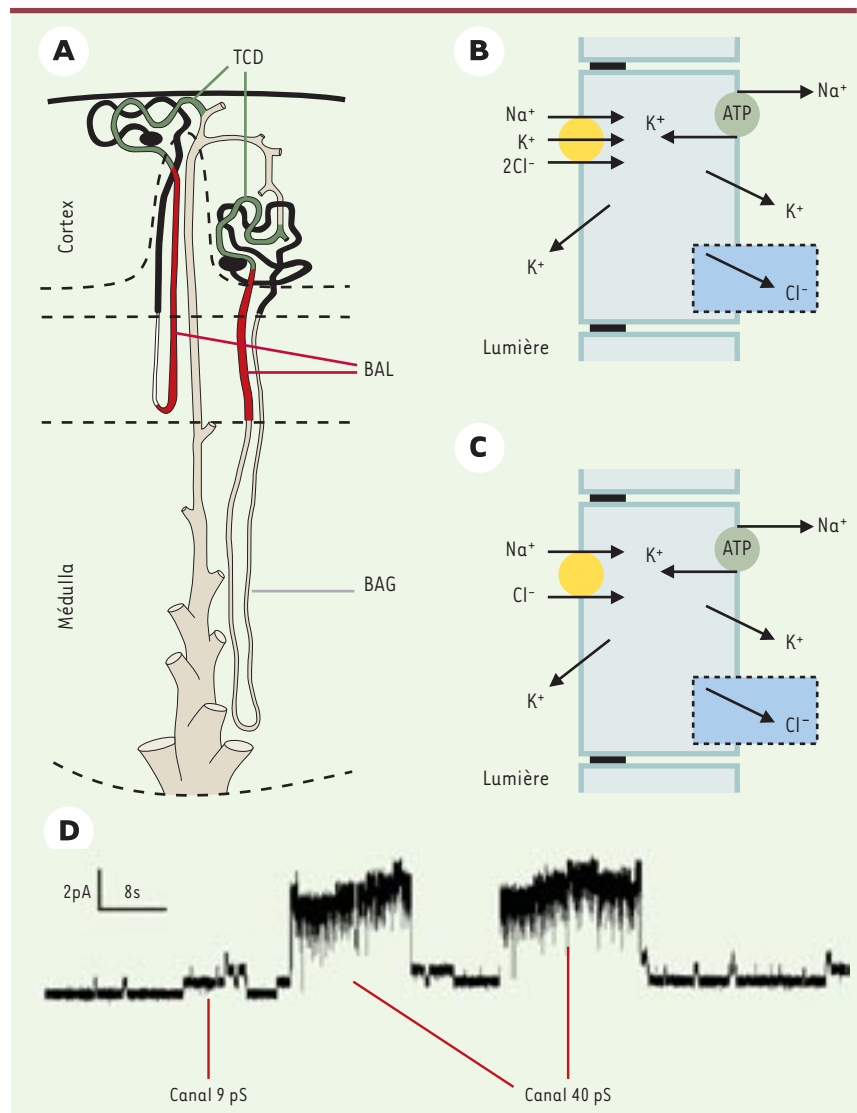
Canal Cl⁻ CIC-5 : participation à l'endocytose rénale des microprotéines

(→) m/s
1996, n°4,
p. 542

Si le rôle physiologique des canaux Cl⁻ CIC-1 et CIC-K est lié à leur localisation dans la membrane cellulaire, l'étude d'une maladie rénale, la maladie de Dent (→), a révélé l'importance fonctionnelle des canaux Cl⁻ qui sont localisés sur les membranes intracellulaires. La maladie de Dent regroupe plusieurs entités de néphrolithiases héréditaires liées au chromosome X (pour revue, voir [24]) se traduisant par une protéinurie et une hypercalciurie accompagnées dans certains cas d'un rachitisme ou d'une ostéomalacie avec hypophosphatémie. Dans la majorité des cas, la maladie se manifeste dès l'enfance et évolue de façon variable vers l'insuffisance rénale. Les protéines excrétées sont essentiellement des protéines de bas poids moléculaire (< 40 000 Daltons) capables de traverser le filtre du glomérule, et l'hypercalciurie est modérée. Une stratégie de clonage positionnel a permis d'identifier un seul gène responsable des quatre formes connues de la maladie. La nature de la protéine codée par ce gène, le canal Cl⁻ CIC-5, a causé une certaine surprise car elle ne donnait pas d'explications immédiates du tableau clinique observé dans la maladie de Dent. Il était cependant connu que les protéines filtrées par le

glomérule sont soustraites de l'urine primitive dans le tube proximal par une endocytose dépendante du récepteur mégaline, puis dirigées vers le compartiment lysosomal pour y être dégradées [25]. Le pH des endosomes est maintenu acide grâce à la présence d'une pompe H⁺-ATPase et l'on supposait par ailleurs qu'une conductance Cl⁻, en parallèle de la pompe H⁺, permettait de neutraliser la charge capacitive de la membrane vésiculaire induite par l'accumulation intravésiculaire de protons [26] (Figure 5A). Ces éléments servant de fil conducteur, on pouvait suspecter que le canal Cl⁻ CIC-5 était impliqué dans les mécanismes d'endocytose et/ou de transcytose. La production d'anticorps spécifiques dirigés contre ce canal a permis de vérifier que le canal Cl⁻ CIC-5 est effectivement exprimé dans les cellules du tubule proximal de rein de rat, au niveau des endosomes périphériques, où il se co-localise préférentiellement avec la pompe H⁺ vacuolaire (Figure 5C) [27]. L'implication du canal Cl⁻ CIC-5 dans les

Figure 4. Absorption transcellulaire de chlorure dans le tubule rénal. **A.** Schéma de deux néphrons du rein (adapté de [46], avec la permission de *Am J Physiol* et de l'auteur). La surface du rein est en haut, la papille en bas. TCD : tube contourné distal ; BAL : portion large de la branche ascendante de l'anse de Henle ; BAG : portion grêle de la branche ascendante de l'anse de Henle. En noir, le tube proximal. **B.** Schéma du transport de NaCl dans la BAL. La lumière du tubule, qui contient l'urine en formation, est à gauche du dessin, l'interstitium à droite. Sont représentés : un co-transport Na⁺-K⁺-2Cl⁻, inhibé par le furosémide, la pompe Na⁺, K⁺-ATPase, des conductances K⁺ et une conductance Cl⁻ basolatérale. Le schéma est simplifié pour faciliter la compréhension. **C.** Schéma du transport de NaCl dans le TCD. Un co-transport Na⁺-Cl⁻, inhibé par les thiazides, est présent sur la membrane apicale. **D.** Enregistrement en *patch-clamp* « canal individuel » de l'activité de deux canaux Cl⁻ dans la membrane basolatérale de la BAL. Ces canaux se différencient par leur conductance élémentaire : 9 picoSiemens dans un cas, 40 picoSiemens dans l'autre cas. L'un des problèmes actuels est d'établir la correspondance entre les trois canaux Cl⁻ endogènes [19-21] et les canaux clonés.



phénomènes d'endocytose des protéines filtrées a ensuite été confirmée plus directement par l'analyse de lignées de souris dont le gène du canal CIC-5 a été invalidé [28]. Plusieurs observations expérimentales et médicales demeurent cependant inexpliquées. En premier lieu, les anomalies du métabolisme du phosphate et du calcium rencontrées au cours de la maladie de Dent ne sont pas

pleinement comprises. De plus, la fonction éventuelle de CIC-5, exprimé au sein du tube collecteur dans les cellules impliquées dans la sécrétion acide, est une inconnue complète [27]. Une interrogation supplémentaire dérive de la présence, inexpliquée à ce jour, du canal CIC-5 dans les cellules intestinales où il se co-localise avec les pompes H^+ vacuolaires dans les endosomes (Figure 5D) [29]. Enfin, les propriétés des canaux CIC-5 ne sont pas idéalement adaptées à un transfert de Cl^- du cytosol vers la lumière de l'endosome. En effet, les CIC-5 sont inhibés à pH acide et semblent promouvoir la sortie de Cl^- vers le cytoplasme plutôt que son entrée dans le compartiment endosomique (voir Figure 5B) [4].

Les autres canaux CIC : des fonctions souvent indéterminées

CIC-2 fait partie, comme CIC-1 et les CIC-K, de la première sous-famille CIC (Figure 1A). Il ne s'ouvre qu'à des potentiels très négatifs assez peu physiologiques. Une activité physiologique est cependant possible en milieu acide ou en milieu hypo-osmolaire ; elle augmente avec la concentration de Cl^- intracellulaire [4]. Un courant Cl^- similaire à celui produit par CIC-2 n'a été décrit que dans quelques types cellulaires [4, 30, 31], mais on admet que CIC-2 est ubiquitaire. Trois fonctions ont été proposées : (1) participation à la sécrétion de HCl dans l'estomac ; (2) contrôle de la concentration du Cl^- intracellulaire dans certains types neuronaux avec pour conséquence la modulation de la réponse inhibitrice GABAergique ; et (3) sécrétion de Cl^- dans les épithéliums. Cette dernière hypothèse jouit d'une certaine popularité. CIC-2 est en effet exprimé dans plusieurs tissus épithéliaux qui sont la cible de la mucoviscidose et il est alors localisé sur la membrane apicale [3, 4, 6]. CIC-2 pourrait donc se substituer au CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) chez les sujets atteints de mucoviscidose [4]. En fait, l'investigation anatomo-physiologique de souris dont le gène *CIC-2* a été invalidé suggère plutôt un rôle dans la barrière hémato-spermiqne (cellules de Sertoli, cellules de Leydig) et dans la couche pigmentée externe de la rétine [32]. Dans ce dernier cas seulement, il a été démontré de façon sûre que le CIC-2 était responsable d'une sécrétion de Cl^- [32].

Les autres canaux CIC, ceux qui appartiennent aux sous-familles 2 et 3 (Figure 1A), se localisent essentiellement sur les membranes des organites intracellulaires : endosomes périmoléaires et lysosomes (CIC-3, CIC-7) [32], vésicules synaptiques (CIC-3) [33], réticulum endoplasmique (CIC-6) [34] et appareil de Golgi (*gef1*, canal CIC de la levure *Saccharomyces cerevisiae*) [3]. Leurs fonctions précises restent à déterminer. L'analyse physiologique des modèles de souris dont les gènes *CIC-3*, *CIC-5* et *CIC-7* ont été invalidés (Tableau 1) a, pour l'instant, produit des résultats mitigés. Comme

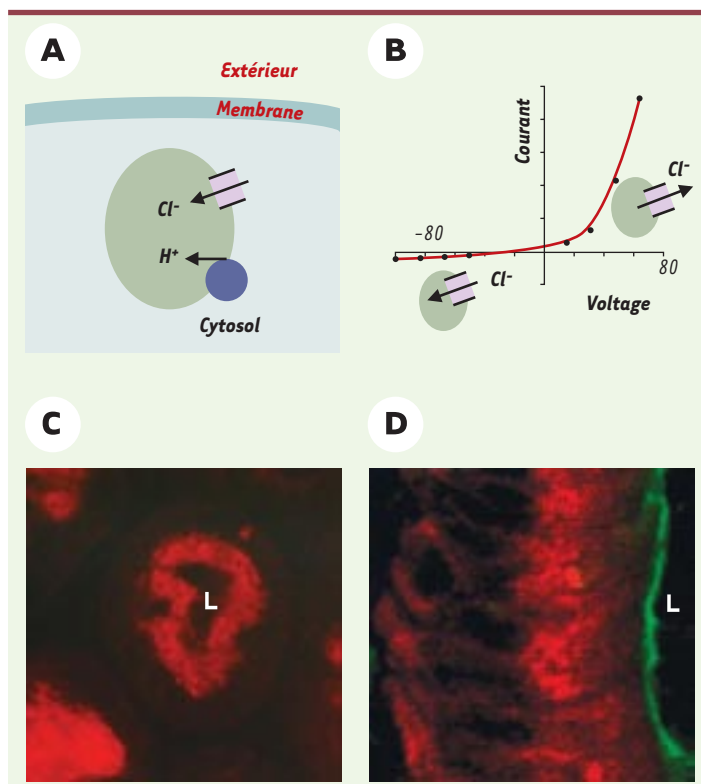


Figure 5. Le canal intracellulaire CIC-5. **A.** La pompe H^+ permet l'acidification des vésicules intracellulaires. En l'absence de canal Cl^- , l'accumulation de charges positives dans la vésicule (par transfert de protons) induirait une différence de potentiel électrique à travers la membrane vésiculaire (positive par rapport au cytoplasme) qui limiterait en retour l'accumulation de protons intravésiculaires. La « charge capacitive » de la membrane vésiculaire par les protons est neutralisée par l'entrée simultanée de Cl^- via CIC-5. **B.** Courbe donnant le courant macroscopique produit par des CIC-5 recombinants exprimés dans l'ovocyte de xénope en fonction du potentiel imposé. Noter que les seuls courants significatifs sont positifs : ils correspondent à une entrée de Cl^- dans la cellule. On admet que l'orientation de CIC-5 dans la membrane vésiculaire est la même que dans la membrane plasmique, c'est-à-dire que le côté cytoplasmique de la protéine reste identique. Dans ces conditions, un courant positif sur le graphe correspond à un flux de Cl^- dirigé du compartiment intravésiculaire vers le cytoplasme. Cela est contraire à ce qui est attendu. **C.** Localisation intracellulaire de CIC-5 dans le tubule contourné proximal de rein de rat. L : lumière tubulaire. **D.** Localisation intracellulaire de CIC-5 dans les entérocytes de rat. Le canal CIC-5 (en rouge) est principalement situé dans des structures vésiculaires concentrées au-dessus du noyau et ne se co-localise pas avec la sucrase-isomaltase (en vert) utilisée comme marqueur de la bordure en brosse. L : lumière de l'intestin.

l'ont souligné Kornak *et al.* [35], les atteintes phénotypiques sont ponctuelles et ne semblent pas affecter les processus d'endocytose dans leur ensemble en dépit d'une large distribution tissulaire de ces canaux. Ainsi, la capacité d'acidification du compartiment lysosomal est conservée chez les souris dont le gène *CIC-7* a été invalidé bien que ce canal soit normalement exprimé dans les lysosomes. Cela suggère la participation d'autres canaux Cl^- , issus soit de la famille *CIC*, soit d'autres familles de canaux Cl^- intracellulaires [3]. A l'heure actuelle, on admet que la fonction des canaux Cl^- intracellulaires est de neutraliser les protons transportés par les pompes vacuolaires H^+ . D'autres fonctions sont cependant envisageables. Dans le cas de *Saccharomyces cerevisiae*, par exemple, il a été suggéré que le Cl^- intravésiculaire catalyserait l'incorporation de cuivre sur une métallo-oxydase, Fet3p, ce qui donne un rôle de modulateur au canal *gef1* via le contrôle de la concentration de Cl^- intravésiculaire [36]. La localisation intracellulaire des *CIC* des deuxième et troisième sous-familles n'est pas obligatoirement exclusive. On a longtemps considéré que *CIC-3* était implanté sur les membranes plasmiques de nombreuses cellules et sous-tendait les courants Cl^- activés par une augmenta-

tion du volume cellulaire [37]. Cette hypothèse est maintenant abandonnée ([32], voir cependant [38]). En revanche, une étude récente place *CIC-4* sur la membrane plasmique apicale de cellules intestinales et suggère qu'il pourrait participer à la sécrétion de Cl^- dans cet épithélium [39]. Une localisation complémentaire sur la membrane plasmique est également démontrée pour *CIC-7*. *CIC-7* est exprimé sur la membrane lysosomale mais aussi sur la bordure plissée des ostéoclastes. Cette membrane plasmique spécialisée porte de nombreuses pompes H^+ -ATPases qui assurent l'acidification des lacunes extracellulaires où s'effectue la résorption osseuse [35](→). Des mutations de *CIC-7* sont responsables d'ostéopétroses chez l'homme [40] et l'invalidation du gène *CIC-7* chez la souris induit une ostéopétrose sévère [35]. Les ostéoclastes ont alors des membranes plissées peu développées et ne forment pas de lacunes de résorption. De plus, à la différence des ostéoclastes issus de souris normales, les ostéoclastes en culture, provenant de souris dont le gène *CIC-7* a été invalidé, sont incapables d'acidifier le milieu extracellulaire [35]. Ce dernier résultat semble confirmer que le canal *CIC-7* est nécessaire au bon fonctionnement des pompes H^+ localisées sur la membrane plissée.

(→) m/s
2001, n°12,
p. 1260

Canal	Chromosome (humain)	Distribution tissulaire	Localisation subcellulaire	Maladie associée	Pathologie des souris invalidées	Fonction proposée
<i>CIC-1</i>	7q32-qter	Muscle squelettique	Membrane plasmique	Myotonies	Myotonies	Stabilisation du potentiel de membrane
<i>CIC-2</i>	3q27-28	Très large	Membrane plasmique Membrane apicale des épithéliums		Dégénérescence rétinienne et testicules	Contrôle $[\text{Cl}^-]$, (?) Sécrétion Cl^- (?)
<i>CIC-KA</i> (<i>CIC-K1</i>)	1p36	Rein, oreille interne	Membrane basolatérale, Membrane apicale (?)		Diabète insipide néphrogénique	Absorption Cl^-
<i>CIC-KB</i> (<i>CIC-K2</i>)	1p36	Rein, oreille interne	Membrane basolatérale	Syndrome de Bartter		Absorption Cl^-
<i>CIC-3</i>	4q32-q33	Très large	Endosomes, vésicules synaptiques (?) Membrane plasmique		Dégénérescence hippocampe et rétine	Shunt pompe H^+
<i>CIC-4</i>	Xp22.3	Muscle squelettique, cœur, cerveau, intestin	Intracellulaire			?
<i>CIC-5</i>	Xp11.22	Rein, cerveau, intestin, foie	Endosomes périphériques Membrane apicale (?)	Maladie de Dent	Phénotype de la maladie de Dent	Shunt pompe H^+
<i>CIC-6</i>	1p36	Muscle squelettique, cerveau, intestin, rein	Intracellulaire			?
<i>CIC-7</i>	16p13	Muscle squelettique, cerveau, foie, rein, poumon, os	Endosomes périmucléaires et lysosomes Membrane de l'ostéoclaste	Ostéopétrose	Ostéopétrose et dégénérescence rétinienne	Shunt de la pompe H^+

Tableau I. Caractéristiques générales des canaux chlorure *CIC* des mammifères. La distribution tissulaire donnée n'est pas exhaustive et peut varier d'une espèce à l'autre. Les mutations de *CIC-7* sont à l'origine de deux formes d'ostéopétrose humaine : une forme à caractère autosomique récessif et une forme à caractère autosomique dominant (maladie d'Albers-Schönberg type II) [35, 40]. La dégénérescence rétinienne n'a pas la même origine dans tous les modèles de souris invalidées : dans le cas de l'invalidation du gène codant pour *CIC-2*, il s'agit d'une dégénérescence de la couche externe pigmentée ; dans le cas de *CIC-3*, d'une dégénérescence de la neuro-rétine et, dans le cas de *CIC-7*, d'une compression du nerf optique qui peut être accompagnée d'une atteinte de la rétine.

La barttine, une sous-unité régulatrice des canaux CIC

Les canaux ioniques sont le plus souvent des complexes protéiques formés de sous-unités conductrices (sous-unités α participant à la formation du pore de conduction) et de protéines régulatrices accessoires (sous-unités β). Dans le cas des canaux CIC, l'existence de protéines régulatrices était supputée mais non prouvée. La découverte récente d'une protéine qui s'associe spécifiquement aux canaux CIC-K (mais pas à CIC-1, CIC-2 ou CIC-5) est donc importante et donne un éclairage nouveau à l'organisation des CIC (\rightarrow). Cette protéine appelée barttine a une structure totalement différente de celle des canaux CIC et comporte seulement deux segments transmembranaires ; elle n'a pas d'activité canal par elle-même mais favorise l'insertion des deux CIC-K dans la membrane plasmique [41, 42]. Cela explique *a posteriori* pourquoi les canaux CIC-K humains et leurs orthologues murins ne produisent pas de courants Cl^- (ou des courants faibles) lorsqu'ils sont exprimés seuls dans l'ovocyte de xénope. Les mutations du gène de la barttine induisent un syndrome de Bartter sévère (forme anténatale), accompagné d'une néphrocalcinose et associé à une surdité neurosensorielle. Chez la souris, la barttine est localisée dans la membrane basolatérale des parties du tube rénal qui expriment les CIC-K et dans les cellules marginales de la strie vasculaire de l'oreille interne (où elle se co-localise également avec ces deux canaux). La barttine est pour l'instant la seule sous-unité régulatrice des canaux CIC qui ait été identifiée mais il est probable que d'autres protéines de ce type seront découvertes à l'avenir.

Conclusions

Au terme de ce tour d'horizon, il faut rappeler que la distribution des canaux CIC est très diverse puisque des canaux CIC ont été découverts, non seulement chez les mammifères, mais aussi dans les plantes, les bactéries, la levure ou chez *Caenorhabditis elegans*. Il ne fait aucun doute que les recherches sur ces canaux sont susceptibles de nous apprendre beaucoup sur la physiologie de ces organismes et, par ricochet, sur le fonctionnement et les propriétés des CIC des mammifères. Cela est particulièrement vrai de *Caenorhabditis elegans* qui, avec son répertoire limité de cellules et ses 6 canaux CIC, constitue un outil d'analyse de premier choix.

En second lieu, en l'état actuel des connaissances, la contribution des CIC aux processus physiologiques se déroulant sur la membrane plasmique est relativement modeste comparée à celle des autres canaux Cl^- . Le CFTR et les canaux Cl^- activés par le calcium intracellulaire (Cl^-)

Ca^{2+}) jouent un rôle majeur dans les épithéliums sécrétant du Cl^- sous les contrôles respectifs de l'AMP cyclique et du calcium [1, 2]. Les canaux Cl^- sont, de plus, exprimés dans le tissu cardiaque et dans le muscle lisse. Un autre canal, le canal Cl^- activé par une augmentation du volume cellulaire a été observé dans de très nombreux types cellulaires, au point qu'on le pense ubiquitaire [37]. C'est donc plutôt sur les membranes des organites intracellulaires que le rôle des canaux Cl^- CIC apparaît potentiellement le plus vaste et le plus original.

Enfin, les canaux CIC ne sont pas seulement intéressants par leurs fonctions physiologiques mais aussi par l'originalité de leur organisation : double pore, modulation de l'activité par l'anion perméant. Gageons que les recherches futures apporteront leur lot de découvertes stimulantes et nous aideront à mieux comprendre les arcanes du fonctionnement des canaux Cl^- et de la sélectivité anionique, un problème fondamental et non résolu de la biophysique des canaux. \diamond

SUMMARY

Physiological functions of CIC chloride channels

The cloning of a chloride channel from the electric organ of the Torpedo fish in 1990 allowed the discovery of a vast molecular family of chloride channels with a widespread expression in organisms such as bacteria, plants and mammals. These channels, named CIC or voltage-dependent chloride channels, are located both on the plasma membrane and the membranes of various intracellular organelles. Due to their recent discovery, their structural organization, electrophysiological properties, and functions are not totally understood. This article reviews what is currently known on the CIC chloride channel family and puts emphasis on three main functions : control of muscle excitability, chloride absorption in the renal tubule and involvement in endocytosis. \diamond

RÉFÉRENCES

1. Teulon J. Propriétés et fonctions des canaux chlorure des épithéliums. In : Clérici C, Friedlander G, eds. *Biologie et pathologie des épithéliums*. Paris : Éditions EDK, 2000 : 97-106.
2. Edelman A, Fanen P. CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), une protéine multifonctionnelle. In : Clérici C, Friedlander G, eds. *Biologie et pathologie des épithéliums*. Paris : Éditions EDK, 2000 : 69-79.
3. Jentsch TJ, Friedrich T, Schriever A, Yamada H. The CIC chloride channel family. *Pflüg Arch* 1999 ; 437 : 783-95.
4. Wills NK, Fong P. CIC chloride channels in epithelia: recent progress and remaining puzzles. *News Physiol Sci* 2001 ; 16 : 161-6.
5. Uchida S. *In vivo* role of CLC chloride channels in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000 ; 279 : F802-8.
6. Maduke M, Miller C, Mindell JA. A decade of CIC chloride channels: structure, mechanism, and many

- unsettled questions. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2000 ; 29 : 411-38.
7. Fahlke C. Ion permeation and selectivity in CIC-type chloride channels. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001 ; 280 : F748-57.
 8. Schriever AM, Friedrich T, Pusch M, Jentsch TJ. CIC chloride channels in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* 1999 ; 274 : 34238-44.
 9. Foskett JK. CIC and CFTR chloride channel gating. *Annu Rev Physiol* 1998 ; 60 : 689-717.
 10. Rychkov GY, Pusch M, Roberts ML, Jentsch TJ, Bretag AH. Permeation and block of the skeletal muscle chloride channel, CIC-1, by foreign anions. *J Gen Physiol* 1998 ; 111 : 653-65.
 11. Pusch M. Knocking on channel's door. The permeating chloride ion acts as the gating charge in CIC-0. *J Gen Physiol* 1996 ; 108 : 233-6.
 12. Hussy N, Forestier C, Vavasseur A, Becq F, Valmier J. Les canaux chlorure ou comment un poisson électrique éclaire la pathologie humaine. *Med Sci* 1999 ; 15 : 1003-7.
 13. Miller C, White MM. Dimeric structure of single chloride channels from Torpedo electroplax. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984 ; 81 : 2772-5.
 14. Dutzler R, Campbell EB, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R. X-ray structure of a CIC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity. *Nature* 2002 ; 415 : 287-94.
 15. Pusch M, Jordt SE, Stein V, Jentsch TJ. Chloride dependence of hyperpolarization-activated chloride channel gates. *J Physiol* 1999 ; 515 : 341-53.
 16. Lehmann-Horn F, Jurkat-Rott K. Voltage-gated ion channels and hereditary disease. *Physiol Rev* 1999 ; 79 : 1317-72.
 17. Bryant SH, Morales-Aguilera A. Chloride conductance in normal and myotonic muscle fibres and the action of monocarboxylic aromatic acids. *J Physiol* 1971 ; 219 : 367-83.
 18. Adrian RH, Bryant SH. On the repetitive discharge in myotonic muscle fibres. *J Physiol* 1974 ; 240 : 505-15.
 19. Guinamard R, Chraïbi A, Teulon J. A small conductance Cl⁻ channel in the mouse thick ascending limb that is activated by ATP and protein kinase A. *J Physiol (Lond)* 1995 ; 485 : 97-112.
 20. Paulais M, Teulon J. cAMP-activated chloride channel in the basolateral membrane of the thick ascending limb of the mouse kidney. *J Membr Biol* 1990 ; 113 : 253-60.
 21. Reeves WB, Winters CJ, Andreoli TE. Chloride channels in the loop of Henle. *Annu Rev Physiol* 2001 ; 63 : 631-45.
 22. Jeck N, Konrad M, Peters M, Weber S, Bonzel KE, Seyberth HW. Mutations in the chloride channel gene, *CLCNKB*, leading to a mixed Bartter-Gitelman phenotype. *Pediatr Res* 2000 ; 48 : 754-8.
 23. Blanchard A, Poussou R, Paillard M. Syndromes de Bartter et Gitelman : deux syndromes, quatre gènes. *Med Ther Endocrinol* 2000 ; 2 : 301-9.
 24. Scheinman SJ. X-linked hypercalciuric nephrolithiasis: clinical syndromes and chloride channel mutations. *Kidney Int* 1998 ; 53 : 3-17.
 25. Leheste JR, Rolinski B, Vorum H, et al. Megalin knockout mice as an animal model of low molecular weight proteinuria. *Am J Pathol* 1999 ; 155 : 1361-70.
 26. Mellman I, Fuchs R, Helenius A. Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Annu Rev Biochem* 1986 ; 55 : 663-700.
 27. Gunther W, Luchow A, Cluzeaud F, Vandewalle A, Jentsch TJ. CIC-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.
 28. Piwon N, Gunther W, Schwake M, Bosl MR, Jentsch TJ. CIC-5 Cl⁻ channel disruption impairs endocytosis in a mouse model for Dent's disease. *Nature* 2000 ; 408 : 369-73.
 29. Vandewalle A, Cluzeaud F, Peng KC, et al. Tissue distribution and subcellular localization of the CIC-5 chloride channel in rat intestinal cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001 ; 280 : C373-81.
 30. Noulin JF, Fayolle-Julien E, Desaphy JF, Poindessault JP, Joffre M. Swelling and cAMP on hyperpolarization-activated Cl⁻ conductance in rat Leydig cells. *Am J Physiol* 1996 ; 271 : C74-84.
 31. Fritsch J, Edelman A. Modulation of the hyperpolarization-activated Cl⁻ current in human intestinal T84 epithelial cells by phosphorylation. *J Physiol* 1996 ; 490 : 115-28.
 32. Stobrawa SM, Breiderhoff T, Takamori S, et al. Disruption of CIC-3, a chloride channel expressed on synaptic vesicles, leads to a loss of the hippocampus. *Neuron* 2001 ; 29 : 185-96.
 33. Poulain B. Libération des neurotransmetteurs. In : Tritsch D, Chesnoy-Marchais D, Feltz A, eds. *Physiologie du neurone*. Paris : Doin, 1998 : 529-68.
 34. Buyse G, Trouet D, Voets T, et al. Evidence for the intracellular location of chloride channel (CIC)-type proteins: co-localization of CIC-6a and CIC-6c with the sarco/endoplasmic-reticulum Ca²⁺ pump SERCA2b. *Biochem J* 1998 ; 330 : 1015-21.
 35. Kornak U, Kasper D, Bosl MR, et al. Loss of the CIC-7 chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man. *Cell* 2001 ; 104 : 205-15.
 36. Davis-Kaplan SR, Askwith CC, Bengtzen AC, Radisky D, Kaplan J. Chloride is an allosteric effector of copper assembly for the yeast multicopper oxidase Fet3p: an unexpected role for intracellular chloride channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998 ; 95 : 13641-5.
 37. Strange K, Emma F, Jackson PS. Cellular and molecular physiology of volume-sensitive anion channels. *Am J Physiol* 1996 ; 270 : C711-30.
 38. Clapham D. How to lose your hippocampus by working on chloride channels. *Neuron* 2001 ; 29 : 1-3.
 39. Mohammad-Panah R, Ackerley C, Rommens J, Choudhury M, Wang Y, Bear CE. The chloride channel CIC-4 co-localizes with cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and may mediate chloride flux across the apical membrane of intestinal epithelia. *J Biol Chem* 2002 ; 277 : 566-74.
 40. Cleiren E, Bénichou O, Van Hul E, et al. Albers-Schönberg disease (autosomal dominant osteopetrosis, type II) results from mutations in the *CICN7* chloride channel gene. *Hum Mol Genet* 2001 ; 10 : 2861-7.
 41. Birkenhäger R, Otto E, Schürmann MJ, et al. Mutation of *BSND* causes Bartter syndrome with sensorineural deafness and kidney failure. *Nat Genet* 2001 ; 29 : 310-4.
 42. Estévez R, Boettger T, Stein V, et al. Barttin is a Cl⁻ channel beta-subunit crucial for renal Cl⁻ reabsorption and inner ear K⁺ secretion. *Nature* 2001 ; 414 : 558-61.
 43. Chen TY, Miller C. Nonequilibrium gating and voltage dependence of the CIC-0 Cl⁻ channel. *J Gen Physiol* 1996 ; 108 : 237-50.
 44. Pusch M, Ludewig U, Rehfeldt A, Jentsch TJ. Gating of the voltage-dependent chloride channel CIC-0 by the permeant anion. *Nature* 1995 ; 373 : 527-31.
 45. Fahlke C, Rudel R, Mitrovic N, Zhou M, George AL Jr. An aspartic acid residue important for voltage-dependent gating of human muscle chloride channels. *Neuron* 1995 ; 15 : 463-72.
 46. Kaissling B. Structural aspects of adaptive changes in renal electrolyte excretion. *Am J Physiol* 1982 ; 243 : F211-26.

TIRÉS À PART
J. Teulon