



Caractérisation des canaux potassiques du tubule contourné proximal et des propriétés régulatrices des canaux chlorure de la membrane basolatérale des cellules intercalaires du tubule connecteur

Laurent Pinelli

► To cite this version:

Laurent Pinelli. Caractérisation des canaux potassiques du tubule contourné proximal et des propriétés régulatrices des canaux chlorure de la membrane basolatérale des cellules intercalaires du tubule connecteur. Urologie et Néphrologie. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2015. Français. <NNT : 2015PA066180>. <tel-01213817>

HAL Id: tel-01213817

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01213817>

Submitted on 9 Oct 2015

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.

THESE

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'université Pierre et Marie Curie

Spécialité : Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique

Présentée par :

Mr Laurent PINELLI

Caractérisation des canaux potassiques du tubule contourné proximal et des propriétés régulatrices des canaux chlorure de la membrane basolatérale des cellules intercalaires du tubule connecteur.

Soutenue le 30 Juin 2015

Devant le jury :

Pr Jean-Claude DUSSAULE	Président du Jury
Dr Juliette Hadchouel	Rapporteur
Pr Romain Guinamard	Rapporteur
Dr Rosa Vargas-Poussou	Examineur
Dr Christophe Duranton	Examineur
Dr Stephane Lourdel	Directeur de thèse
Dr Marc Paulais	Invité

Table des matières

INTRODUCTION	8
I- TRANSPORT DE CHLORURE DE SODIUM ET DE POTASSIUM DANS LE REIN	11
1- Absorption du chlorure de sodium.	11
2- Régulation de l'absorption du sodium dans le néphron distal.	17
3- Transport du potassium	17
a. Réabsorption et sécrétion du potassium	17
b. Régulation de l'excrétion du potassium.....	18
II- LES CANAUX CHLORURE DU NEPHRON.....	21
1- Le CFTR.	21
2- Les canaux chlorures activés par le calcium intracellulaire (CLCA).	22
3- La famille des canaux chlorure CIC.	22
a. Structure générale des CIC.....	23
b. Voltage-dépendance et régulation des CIC	27
c. Rôle physiologiques des CIC	28
III- LES CANAUX CLC-KA(K1) ET CLC-KB(K2)	33
1- Localisation des CIC-K dans le néphron.....	33
2- Physiopathologie des CIC-K.....	34
3- Propriétés électrophysiologiques des CIC-	37
IV- LE ROLE DES CANAUX POTASSIQUES DANS LE REIN	40
V- LES CANAUX POTASSIQUES DU NEPHRON.....	41
1- La famille des canaux potassiques à six domaines transmembranaires.....	42
2- Les canaux potassiques à quatre domaines transmembranaires et à double pore.	45
a. La famille TASK (TWIK-related Acid Sensitive K+)	45
b. Les autres canaux à quatre domaines transmembranaires et à double pore.....	48
3- Les canaux potassiques à deux domaines transmembranaires.....	48
a. Kir1.1 (ROMK).....	51
b. Les Kir 2.x	51
c. Kir3.x.....	52
d. Kir7.1.....	52
e. Kir6.x ou KATP	53
f. Kir4.x et Kir 5.1.....	53
4- Pathologies associées aux canaux Kir4.x/Kir5.1.	61
VI- BUTS DE L'ETUDE	65
MATERIELS & METHODES	66
I- METHODES DE CARACTERISATION DES CANAUX IONIQUES.....	67
1- La Technique du patch-clamp	67
2- Relations courant / tension	70
3- Probabilité d'ouverture	71
4- Mesures électriques	72
5- Préparation du tissu	74
6- Dispositif expérimental.....	75
II- ANALYSE PHENOTYPIQUE DES SOURIS INVALIDEES POUR LA SOUS-UNITE KIR4.2.....	70

1-	<i>Elevage des souris invalidées pour le gène Kcnj15 ou «Kir4.2^{-/-}»</i>	70
2-	<i>Etude phénotypique des souris Kir4.2^{+/+} et Kir4.2^{-/-}</i>	71
III-	ANALYSES MOLECULAIRES ET PROTEIQUES	72
1-	<i>Outils et technique de biologie moléculaire</i>	72
2-	<i>Western blot</i>	74
3-	<i>Immunohistochimie</i>	74
IV-	ANALYSES STATISTIQUES	75
	RÉSULTATS	76
I-	THE NATIVE SMALL-CONDUCTANCE CL ⁻ CHANNEL IN THE MOUSE RENAL TUBULE AS A CLC-K2 CANDIDATE : REGULATION BY VOLTAGE, CHLORIDE, CALCIUM AND PROTONS.	77
1-	<i>Article</i>	77
	<i>The native small-conductance Cl⁻ channel in the mouse renal tubule as a ClC-K2 candidate: regulation by voltage, chloride, calcium and protons.</i>	77
2-	<i>Résumé</i>	115
	LES CANAUX POTASSIQUES RENAIKIR4.2/KIR5.1 : ANALYSE PHENOTYPIQUE ET CARACTERISATION FONCTIONNELLE	117
I-	CARACTERISATION FONCTIONNELLE DES CANAUX POTASSIQUES BASOLATERAUX DES CELLULES DU PCT DE SOURIS	117
1-	<i>Mesure de l'activité des canaux potassiques in situ.</i>	117
2-	<i>Influence du magnésium intracellulaire sur la conductance sortante du canal de 47pS</i>	119
3-	<i>Régulation du canal de 47 pS par le pH intracellulaire.</i>	120
II-	LOCALISATION TISSULAIRE DES SOUS-UNITES KIR4.2 ET KIR5.1 DANS LE REIN DE SOURIS	121
1-	<i>Expression des ARNm codant pour les sous-unités Kir 4.1, Kir4.2 et Kir5.1 dans le néphron de souris.</i> 121	121
2-	<i>Spécificité de l'anticorps anti-Kir4.2</i>	122
3-	<i>Expression protéique des sous-unités Kir4.2 et Kir5.1 dans le rein de souris.</i>	123
4-	<i>Localisation tissulaire de la sous-unité Kir4.2 sur une coupe de rein de souris et sur des tubules proximaux murins isolés</i>	124
III-	ANALYSE PHENOTYPIQUE DES SOURIS WT ET INVALIDEES POUR KIR4.2 (KO).	126
	DISCUSSION	129
I-	THE NATIVE SMALL-CONDUCTANCE CL ⁻ CHANNEL IN THE MOUSE RENAL TUBULE AS A CLC-K2 CANDIDATE: REGULATION BY VOLTAGE, CHLORIDE, CALCIUM AND PROTONS.	130
1-	<i>Effet du Ca²⁺ extracellulaire sur l'activité du canal du 10pS des cellules intercalaires du CNT</i>	130
2-	<i>Influence du pH extra- et intracellulaire sur l'activité du canal du 10pS des cellules intercalaires du CNT.</i> 131	131
3-	<i>Dépendance au voltage et effet du Cl⁻ intracellulaire sur l'activité du canal du 10pS des cellules intercalaires du CNT.</i>	132
4-	<i>Les propriétés du canal sur tissu natif par rapport à celles des ClC en expression hétérologue</i>	133
5-	<i>Importance physiologique de ces mécanismes de régulation.</i>	134
II-	LES CANAUX POTASSIQUES KIR4.2/KIR5.1 : ANALYSE PHENOTYPIQUE ET CARACTERISATION FONCTIONNELLE	135
1-	<i>Caractérisation des canaux potassiques de la membrane basolatérale du PCT de souris</i>	135
2-	<i>Localisation des sous-unités Kir4.2 et Kir5.1 dans le rein de souris.</i>	137
3-	<i>Phénotype des souris invalidées pour le gène Kcnj16.</i>	139
4-	<i>Les hétérotétramères Kir4.2/Kir5.1 impliqués dans la conductance potassique basolatérale des cellules du PCT ?</i>	141
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	142

Index des figures

FIGURE 1 : A. SCHEMA DE L'ARCHITECTURE D'UN REIN HUMAIN. B. REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UN NEPHRON LONG (AGRANDISSEMENT D'UNE PARTIE DU REIN).	10
FIGURE 2 : MECANISMES DE REABSORPTION DU NaCl DANS LE PCT. (A) MECANISMES DE REABSORPTION DANS LA PREMIERE PARTIE DU PCT (SEGMENT S1, S2). (B) MECANISMES DE REABSORPTION DANS LA SECONDE PARTIE DU PCT (SEGMENT S3) (D'APRES [KOEPPEN ET STANTON, 2001]).	13
FIGURE 3 : MECANISMES DE TRANSPORT DU NaCl DANS LA PORTION LARGE ASCENDANTE DE L'ANSE DE HENLE (A) ET LE TUBULE CONTOURNE DISTAL (B) ET (C) (D'APRES [KOEPPEN ET STANTON, 2001]).	14
FIGURE 4 : ARCHITECTURE SIMPLIFIEE DES CELLULES DU CNT ET DU CCD (D'APRES [ELADARI ET AL., 2011])... ..	16
FIGURE 5 : EFFET DES VARIATIONS D'APPORT EN POTASSIUM SUR L'ACTIVITE DE TRANSPORT DES CELLULES DU CCD (D'APRES [WANG ET AL., 2004]).	20
FIGURE 6: STRUCTURE EN DIMERE DES CLC [D'APRES KECK M, 2012].	24
FIGURE 7: STRUCTURE D'UN MONOMERE DE CLC EUKARYOTE	26
FIGURE 8: RESUME DES PRINCIPALES CARACTERISTIQUES DES CLC DE MAMMIFERE.	32
FIGURE 9 : PROTEINES IMPLIQUEES DANS LES DIFFERENTS TYPES DE SYNDROMES DE BARTTER.	36
FIGURE 10 : REGULATION DES CLC-KA ET Kb PAR LE pH (A) ET LE Ca ²⁺ (B) EXTRACELLULAIRES (D'APRES ESTEVEZ ET AL., 2001). LE MOTIF PY DE LA BARTTINE A ETE MUTE AFIN DE DIMINUER L'INTERNALISATION DES COMPLEXES CLC-K/BARTTINE DEPENDANT DE L'UBIQUITINATION.	39
FIGURE 11: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA STRUCTURE DES CANAUX A 6 DOMAINES TRANSMEMBRANAIRES (DT) [D'APRES HEBERT ET AL. 2005].	44
FIGURE 12 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA STRUCTURE DES CANAUX A QUATRE DOMAINES TRANSMEMBRANAIRE ET A DOUBLE PORE [D'APRES HEBERT ET AL., 2005].	47
FIGURE 13 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA STRUCTURE D'UN CANAL Kir MONOMERIQUE [D'APRES HEBERT ET AL., 2005].	50
FIGURE 14 : SENSIBILITE AUX VARIATIONS DE pH INTRACELLULAIRE DES SOUS-UNITES Kir4.1, Kir4.2 ET DES HETEROMERES Kir4.x/Kir5.1 [D'APRES PESSIA ET AL. 2001].	56
FIGURE 15 : MODELE DES PERTURBATIONS DE TRANSPORT DANS LE DCT ET LE CNT LORS DU SYNDROME SESAME/EAST [D'APRES BANDULIK ET AL., 2011].	62
FIGURE 16 : MODELE DE L'AUGMENTATION D'ACTIVITE DU DCT EN L'ABSENCE DE Kir5.1 [D'APRES PAULAIS ET AL., 2011].	64
FIGURE 17 : LES DIFFERENTES CONFIGURATIONS DU PATCH-CLAMP [D'APRES HAMILL ET AL., 1981].	69
FIGURE 18 : VISUALISATION SUR GEL DES DIFFERENTS GENOTYPES DES SOURIS DE LA LIGNEE INVALIDEES POUR <i>KCNJ15</i>	70
FIGURE 19 : CARTES SIMPLIFIEES DES PLASMIDES DE TYPE pCDNA3 (A GAUCHE) ET pBF (A DROITE).	72
FIGURE 20 : CARTE SIMPLIFIEE ET SITES DE RESTRICTIONS DU pCDNA3-Kir4.2.	74
FIGURE 21 : CARACTERISATION <i>IN SITU</i> DES PROPRIETES DES CANAUX POTASSIQUES BASOLATERAUX DU PCT DE SOURIS.	118
FIGURE 22 : CARACTERISATION <i>IN SITU</i> DES PROPRIETES DES CANAUX POTASSIQUES BASOLATERAUX DU PCT DE SOURIS EN PRESENCE DE Ba ²⁺ EXTRACELLULAIRE.	119
FIGURE 23 : CARACTERISATION <i>IN SITU</i> DES PROPRIETES DU CANAL POTASSIQUES DE 47pS.	121
FIGURE 24 : LOCALISATION DES ARNm CODANT POUR Kir4.1, Kir4.2 ET Kir5.1 LE LONG DU NEPHRON DE SOURIS.	122
FIGURE 25 : VERIFICATION <i>IN VITRO</i> DE LA SPECIFICITE DE L'ANTICORPS ANTI-Kir4.2.	122
FIGURE 26 : IMMUNOCYTOCHIMIE REALISEE SUR DES CELLULES HEK293T TRANSFECTEES OU NON PAR LES PLASMIDES pCDNA3 PERMETTANT L'EXPRESSION DE LA SOUS-UNITE Kir4.2, Kir4.1 OU Kir5.1.	123

FIGURE 27 : WESTERN-BLOT ANTI-KIR4.2 ET ANTI-KIR5.1 REALISE SUR DES PROTEINES DE REIN TOTAL ET DE TUBULES PROXIMAUX MICRO-DISSEQUES DE SOURIS WT.....	124
FIGURE 28 : IMMUNOHISTOCHEMIE REALISEE SUR DES COUPES TRANSVERSALES DE REIN DE SOURIS WT.....	125
FIGURE 29 : IMMUNOHISTOCHEMIE REALISEE SUR DES PCT ISOLEES DE SOURIS WT (EN HAUT) ET DE SOURIS KO POUR KIR4.2 (EN BAS).....	126

Index des tableaux

TABLEAU 1 (DEBUT): NOMENCLATURE ET CARACTERISTIQUES DES PRINCIPAUX CANAUX POTASSIQUES ETUDIES [D'APRES LACHHEB 2007].....	59
TABLEAU 2 (FIN): NOMENCLATURE ET CARACTERISTIQUES DES PRINCIPAUX CANAUX POTASSIQUES ETUDIES [D'APRES LACHHEB 2007].....	59
TABLEAU 3 (DEBUT) : LOCALISATION INTRARENAL DES DIFFERENTS CANAUX POTASSIQUES ETUDIES [D'APRES LACHHEB 2007].	60
TABLEAU 4 (FIN): LOCALISATION INTRARENAL DES DIFFERENTS CANAUX POTASSIQUES ETUDIES[D'APRES LACHHEB 2007].	61
TABLEAU 5 : COMPOSITION DES PRINCIPALES SOLUTIONS EXPERIMENTALES POUR L'ETUDE DES CANAUX POTASSIQUES (VALEURS EN mM).	77
TABLEAU 6 : COMPOSITION DES PRINCIPALES SOLUTIONS EXPERIMENTALES POUR L'ETUDE DES CANAUX CHLORURE (VALEURS EN mM)	79
TABLEAU 7 : PARAMETRES BIOLOGIQUES DES SOURIS KIR4.2 ^{+/+} ET KIR4.2 ^{-/-}	127

Liste des abréviations

Les différents segments du néphron :

PCT : Proximal Convoluted Tubule.

PST/PR : Proximal Straight Tubule/Pars Recta.

DTL : Descending Thin Limb.

ATL : Ascending Thin Limb.

MTAL: Medullary Thick Ascending Limb.

CTAL: Cortical Thick Ascending Limb.

DCT : Distal Convoluted Tubule.

CNT: Connecting Tubule.

CCD: Cortical Collecting Duct.

OMCD: Outer Medullary Collecting Duct.

IMCD: Inner Medullary Collecting Duct.

Les différents canaux ioniques et sous-unités :

BK: Big K^+ channel.

CLC: Chloride Channel.

ENaC: Epithelial Na^+ ion Channel.

KCNA: K^+ Cyclic Nucleotide Activated channel.

Kir: K^+ Inwardly Rectifying channel.

KvLQT: K^+ voltage-gated Long QT channel.

ROMK: Renal Outer Medullary K^+ channel.

SUR: Sulfonylurea Receptor.

TASK: TWIK-related Acid Sensitive K^+ channel.

THIK: Tandem pore domain Halothane Inhibited K^+ channel.

TWIK: Tandem of P domains in a Weak Inward rectifying K^+ channel.

CFTR: Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator.

Introduction

Le rein, de par l'élimination finement contrôlée de l'eau et des substances dissoutes, joue un rôle central dans l'homéostasie du milieu intérieur. Chez l'Homme, chaque rein est composé d'environ un million de néphrons, l'unité fonctionnelle du rein. Un néphron est constitué d'un glomérule qui assure l'ultrafiltration du plasma puis d'un tubule organisé en un épithélium assurant le transport des substances dissoutes et de l'eau (figure 1). L'urine en formation s'écoule le long de la lumière du tubule rénal et sa composition est modifiée par des mécanismes de sécrétion et/ou de réabsorption d'eau et de solutés en fonction de situations données.

Le tubule rénal est composé d'une succession de segments morphologiquement différents contenant un ou plusieurs types cellulaires et possédant des propriétés de transport et de régulation spécifiques. Les segments initiaux du néphron assurent quantitativement la majeure partie de la réabsorption d'eau et de solutés tandis que les segments terminaux, eux, sont l'objet de régulations permettant d'ajuster finement la balance entre les apports en eau et en solutés et leur élimination dans l'urine finale.

Deux des fonctions majeures du rein sont de contrôler le contenu en sodium de l'organisme, *via* la régulation de la réabsorption de NaCl, et la kaliémie, *via* la réabsorption/sécrétion de potassium. Ces fonctions sont assurées par l'ensemble des segments du néphron à travers l'intervention de nombreux systèmes de transports ioniques dont les mécanismes d'action sont résumés ci-après.

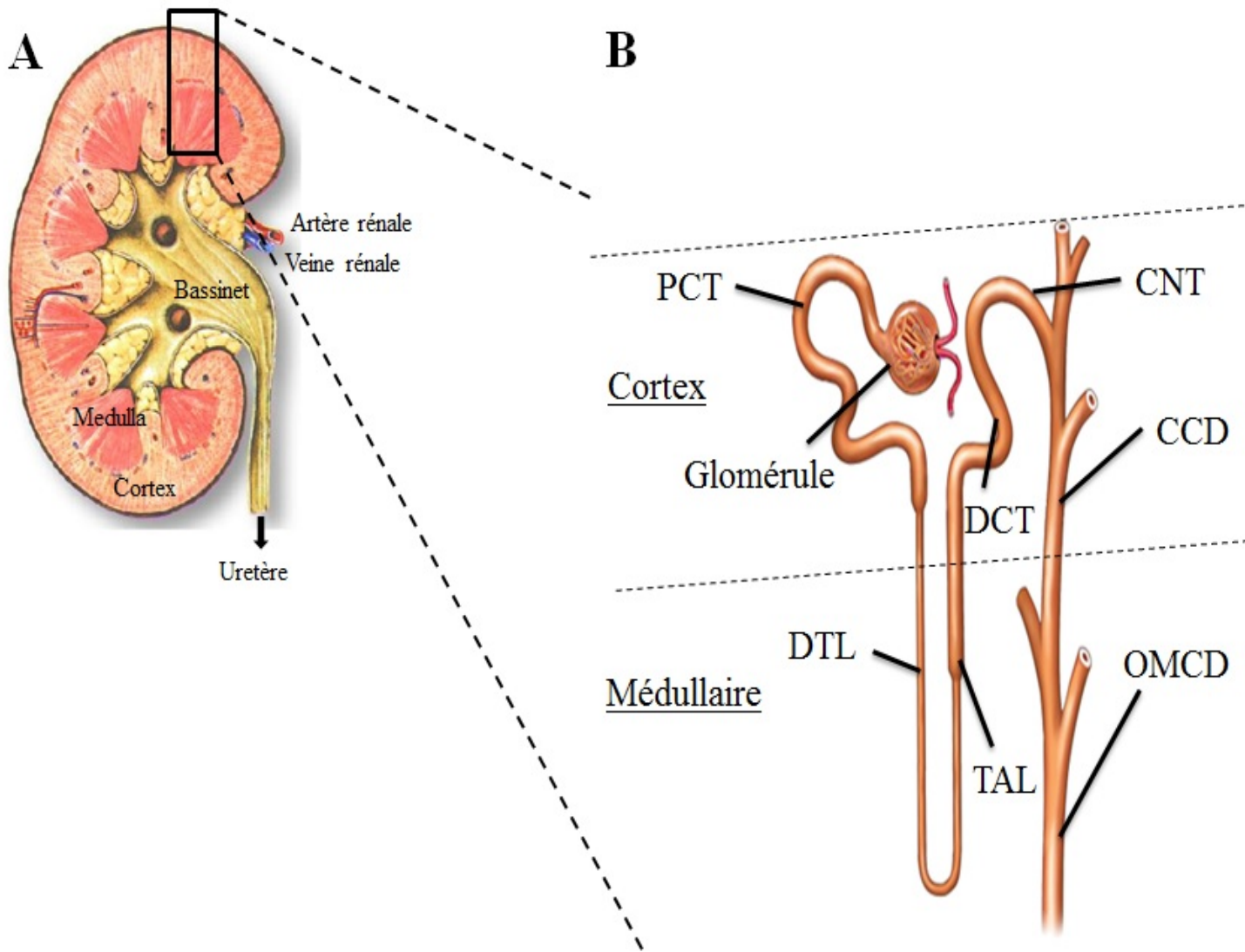


Figure 1 : A. Schéma de l'architecture d'un rein humain. B. Représentation schématique d'un néphron long (agrandissement d'une partie du rein).

I- Transport de chlorure de sodium et de potassium dans le rein

1- Absorption du chlorure de sodium.

Le rein régule le volume extracellulaire en maintenant constante la quantité de sodium de l'organisme. Chez l'Homme, on considère qu'environ 180 litres de plasma sont ultrafiltrés par jour par les glomérules. 65% du sodium filtré est réabsorbé par le tubule contourné proximal, environ 20% l'est par la branche large ascendante de l'anse de Henle, alors qu'un ajustement finement régulé a lieu le long du néphron distal (DCT, CNT et tubule collecteur).

Dans le cas du sodium, la voie transcellulaire est la voie d'absorption prédominante. Le transport vectoriel transcellulaire de NaCl, dans les différents segments du néphron, s'effectue en deux étapes majeures : une entrée apicale et une sortie basolatérale. Nous verrons que l'entrée de sodium peut se faire de diverses manières selon les segments du néphron. La sortie est, quant à elle, effectuée la plupart du temps par la Na^+/K^+ -ATPase basolatérale.

En maintenant une concentration faible en sodium dans la cellule, la Na^+/K^+ -ATPase permet de générer un gradient électrochimique favorable à l'entrée apicale de sodium dans la cellule. Son activité est associée à celle des canaux potassiques basolatéraux. Ainsi, ces derniers jouent un rôle majeur, bien qu'indirect, dans la réabsorption transépithéliale du NaCl en établissant, d'une part, une différence de potentiel transmembranaire négative favorable à la sortie diffusionnelle basolatérale de chlore et, d'autre part, un recyclage continu vers l'interstitium du potassium entré dans la cellule permettant le maintien de l'activité de la Na^+/K^+ -ATPase. Il faut noter que le taux d'expression de la Na^+/K^+ -ATPase est très élevé dans les segments du néphron transportant des quantités importantes de sodium [Vinciguerra et al., 2003].

Dans la première partie du tubule contourné proximal (figure 2A), la réabsorption transcellulaire du sodium se fait par différents co-transporteurs apicaux tels les échangeurs Na^+ -phosphate, Na^+ -glucose et Na^+/H^+ , le cotransporteur $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ et la Na^+/K^+ -ATPase effectuant sa sortie basolatérale. Dans cette partie du néphron, le bicarbonate est préférentiellement réabsorbé, par rapport au chlore, par la voie transcellulaire. Ces mécanismes génèrent une différence de potentiel transépithéliale lumière négative favorisant la diffusion passive du chlore par la voie paracellulaire. Dans la seconde partie PCT (figure 2B), suite à aux réabsorptions massives de chlore et de bicarbonate précédemment

mentionnées, la différence de potentiel transépithéliale devient lumière positive et favorise alors la réabsorption paracellulaire de sodium. Le gradient électrochimique transépithélial demeure, toutefois, favorable à la réabsorption paracellulaire du chlore mais ces ions empruntent aussi la voie transcellulaire par l'intermédiaire d'échangeurs $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, de canaux chlorures et de cotransporteurs K^+-Cl^- basolatéraux.

La branche large de l'anse de Henle participe aux mécanismes de dilution / concentration de l'urine finale en contribuant à la formation du gradient osmotique corticopapillaire. Ce gradient est le résultat d'une réabsorption de NaCl par la TAL sans réabsorption d'eau [Burg, 1982]. Dans ce segment, l'entrée apicale de sodium est couplée à celle du chlore et du potassium *via* le cotransporteur $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ (NKCC2) (figure 3A). Ici encore, la réabsorption basolatérale de NaCl s'effectue par l'action de la Na^+/K^+ -ATPase, couplée à celle de canaux potassiques, et de canaux chlorures. Une caractéristique importante de ce segment est le rôle majeur des canaux potassiques apicaux dans la réabsorption de NaCl. En effet, le recyclage du potassium par les canaux potassiques apicaux ROMK maintient une quantité suffisante de potassium disponible dans la lumière du tubule (figure 3A) [Hebert et Andreoli, 1984 ; Giebisch, 1998] et permet ainsi d'assurer un fonctionnement continu du cotransporteur NKCC2. Ajoutons que, conjointement à l'action des canaux potassiques basolatéraux, ces canaux apicaux maintiennent constante la concentration intracellulaire en potassium. Le sodium, ainsi que de nombreux cations (comme le calcium et le magnésium), sont également réabsorbés par la voie paracellulaire sous l'effet d'une différence de potentiel transépithéliale lumière positive.

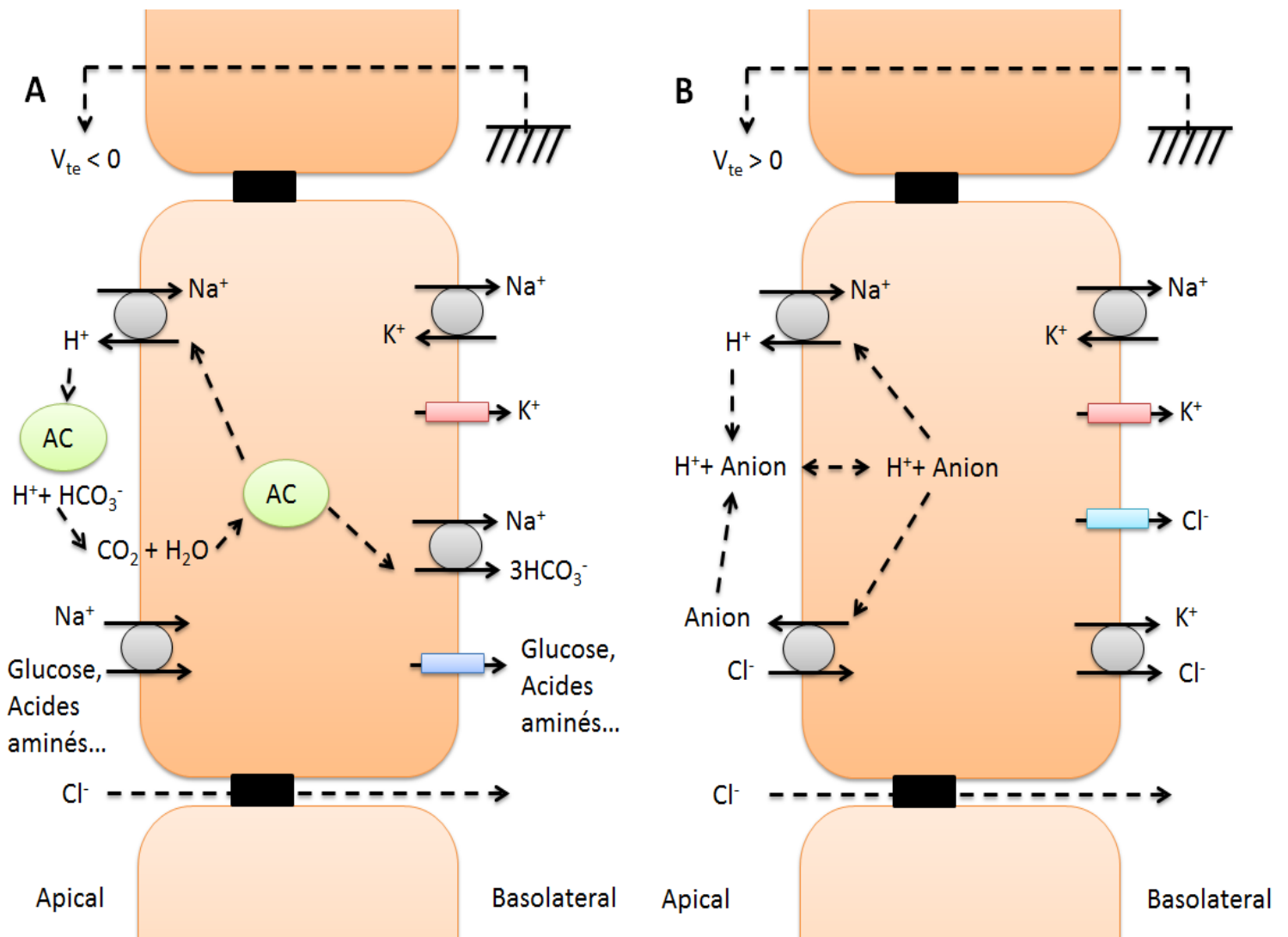


Figure 2 : Mécanismes de réabsorption du NaCl dans le PCT. (A) mécanismes de réabsorption dans la première partie du PCT (segment S1, S2). (B) mécanismes de réabsorption dans la seconde partie du PCT (segment S3) (d'après [Koeppen et Stanton , 2001]).

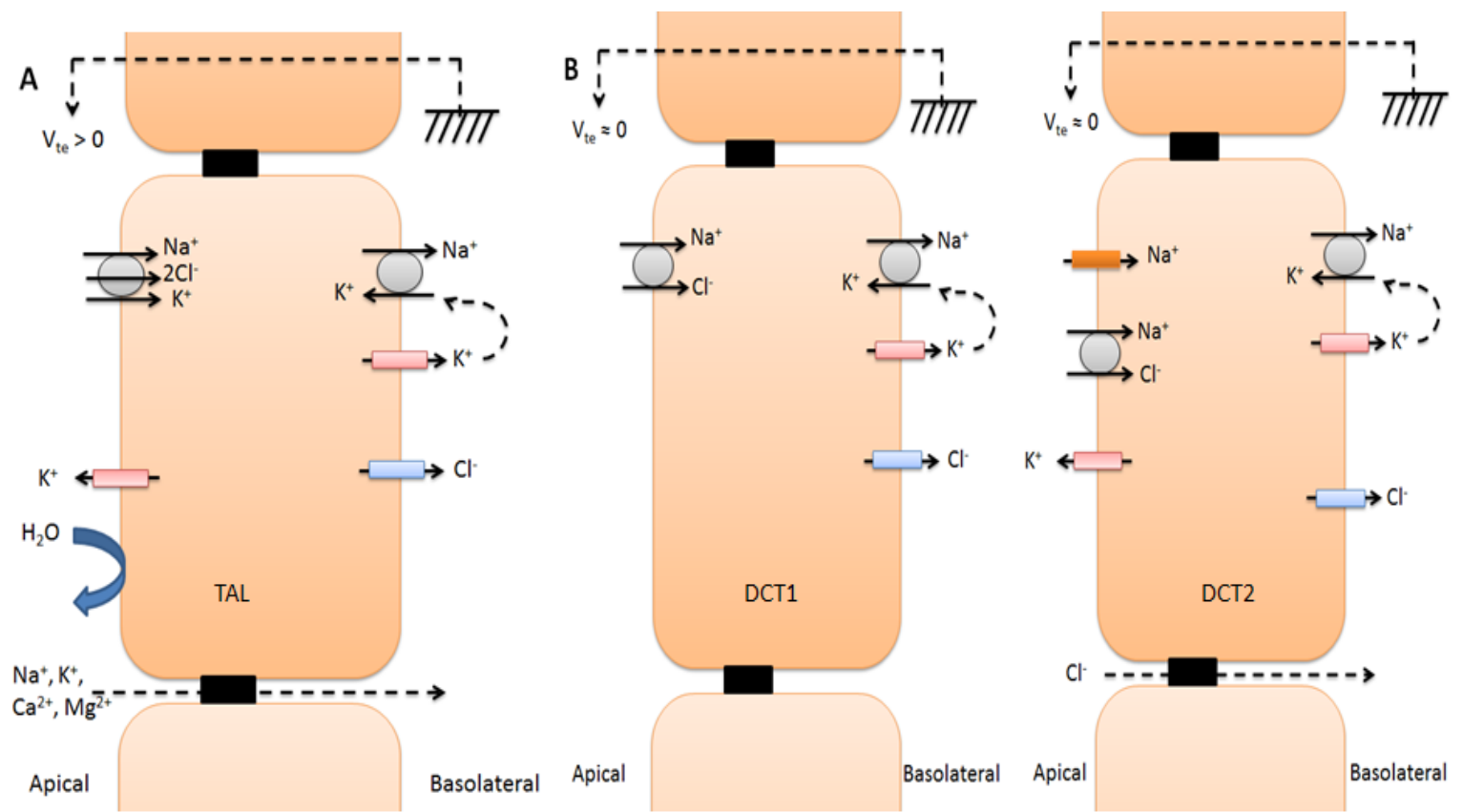


Figure 3 : Mécanismes de transport du NaCl dans la portion large ascendante de l'anse de Henle (A) et le tubule contourné distal (B) et (C) (d'après [Koeppen et Stanton, 2001]).

Le DCT réabsorbe, lui, environ 5 à 10% du NaCl filtré. C'est un segment relativement imperméable à l'eau, accentuant ainsi les phénomènes de dilution de l'urine. La réabsorption se fait par des mécanismes voisins de ceux de la TAL (figure 3B). Dans la partie initiale du DCT (DCT1), en effet, la présence d'un cotransport $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ (NCC) sur la membrane apicale permet l'entrée de NaCl dans la cellule et la sortie basolatérale se fait *via* l'action de la Na^+/K^+ -ATPase et de canaux chlorures. Il faut noter que la partie terminale du DCT (DCT2), région charnière entre le DCT et le CNT, se caractérise par la présence à la fois du cotransport $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ et du canal sodique épithélial (ENaC) sur la membrane apicale (figure 3C) [Reilly et Ellison, 2000 ; Subramanya, 2014].

Le contrôle fin de l'excrétion du NaCl prend place dans les derniers segments du néphron sensibles à l'aldostérone, une hormone minéralocorticoïde synthétisée par les glandes surrénales. Ces segments (le DCT2, le CNT et le canal collecteur) sont constitués de deux types cellulaires majeurs: les cellules principales (figure 4A) et les cellules intercalaires (figure 4B), elles-mêmes subdivisées en trois types cellulaires: α , β et « non α , non β ». Comme nous le verrons plus loin, les cellules principales sont impliquées dans le transport de sodium et de potassium, alors que les cellules intercalaires sont, quant à elles, impliquées dans le transport de protons, de bicarbonates et de chlore.

Le sodium et le chlore sont, comme dans le PCT, réabsorbés séparément (figure 4). Le sodium est réabsorbé transcellulairement dans les cellules principales par l'intermédiaire d'ENaC exprimé au pôle apical et de la Na^+/K^+ -ATPase basolatérale (figure 4A). Les ions chlore, quant à eux, sont réabsorbés par les cellules intercalaires β , sous l'action d'un échangeur $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ apical, de la pendrine, et de canaux chlorure basolatéraux (figure 4B), appartenant à la famille des ClC-K (cf partie II-2). Il a récemment été démontré que le cotransporteur SCL4A8 ou NDCBE (Na-HCO_3) est également impliqué dans le transport du sodium et du bicarbonate par ces cellules [Leviel et al, 2010]. La réabsorption de sodium est à l'origine d'une différence de potentiel transépithéliale négative qui permettrait la diffusion passive de Cl^- par la voie paracellulaire, bien que cette dernière hypothèse reste controversée [Tanaka 1997 ; Hou 2010]

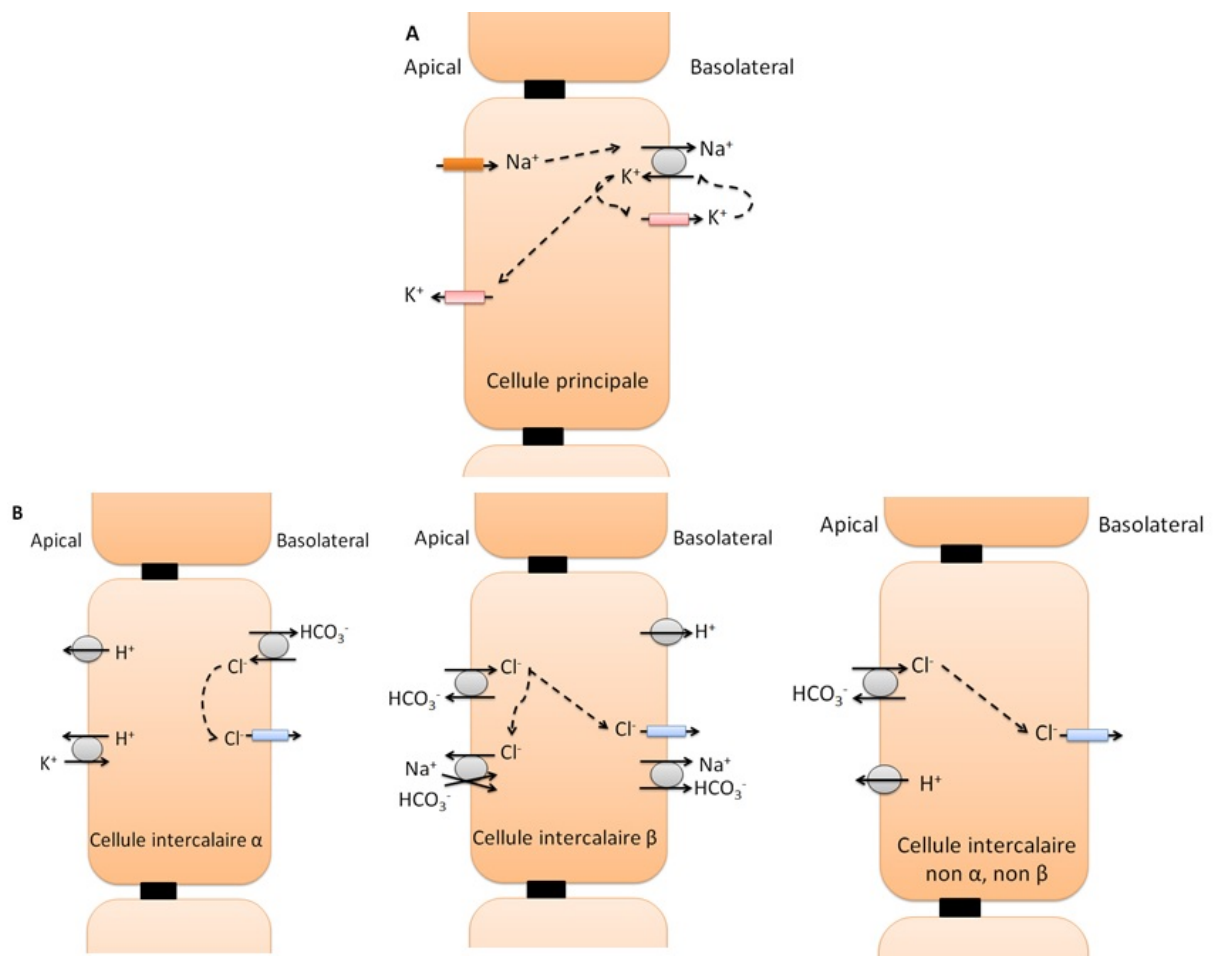


Figure 4 : Architecture simplifiée des cellules du CNT et du CCD (d'après [Eladari et al., 2011]).

2- Régulation de l'absorption du sodium dans le néphron distal.

La réabsorption de NaCl dans le néphron distal est principalement sous le contrôle de l'aldostérone. Lors d'une perte de sodium, une diminution de la volémie ou une augmentation de la kaliémie, l'aldostérone est synthétisée et agit sur les cellules principales du DCT2, du CNT et du canal collecteur *via* le récepteur aux minéralocorticoïdes. Son action augmente rapidement le nombre de canaux ENaC à la membrane apicale des cellules ainsi que de la Na⁺/K⁺-ATPase à la membrane basolatérale [Loffing et al, 2001] puis régule l'expression des gènes codant pour le canal ENaC et pour la Na⁺/K⁺-ATPase, impliqués dans la réabsorption du sodium [Feraille et Doucet, 2001].

3- Transport du potassium.

a. Réabsorption et sécrétion du potassium

Chez l'Homme, la concentration plasmatique en potassium est de l'ordre de 4 à 5mmol.L⁻¹ et est strictement régulée en raison des effets nocifs de perturbations de la kaliémie sur les fonctions des tissus excitables. Le contrôle rénal de la kaliémie se fait en 2 étapes : une réabsorption de potassium par le PCT, suivie d'une sécrétion par le néphron distal, bien que, dans des conditions de restriction potassique, une absorption nette de potassium puisse avoir lieu dans le CCD [Wang et al., 2004].

C'est dans le PCT qu'a lieu la majeure partie de la réabsorption de potassium. Environ 800 mmol de potassium sont filtrés par jour et 80% est réabsorbé par ce segment, essentiellement passivement par la voie paracellulaire, une fraction mineure pouvant également être réabsorbée par la voie transcellulaire [Hebert et al., 2005 ; Weinstein, 1988] notamment *via* le cotransporteur K⁺/Cl⁻ [Giebisch, 2001]. La TAL réabsorbe ensuite environ 10% du potassium filtré principalement par voie paracellulaire. Nous l'avons vu (cf partie I-1), une partie du potassium entre dans les cellules via la protéine NKCC2 est recyclée vers la lumière des tubules par les canaux potassiques ROMK apicaux. Cependant il a été décrit par Greger et son équipe [Greger et al., 1983] qu'une réabsorption du potassium entré dans la cellule *via* NKCC2 avait lieu au niveau basolatéral *via* les canaux potassiques basolatéraux. Les 90% de potassium réabsorbés par le TCP et la TAL constituent une fraction constante de la quantité totale réabsorbée par le néphron.

C'est au niveau du CNT et du CCD qu'a lieu une sécrétion de potassium [Hebert et al, 2005 ; Malnic et al. ,2000 ; Millar et al., 2006]. Dans les cellules principales, le potassium entre du côté basolatéral via la Na^+/K^+ -ATPase et ressort du côté apical *via* les canaux ROMK et BK. Ainsi, une variation de la réabsorption de sodium dans ce segment est à même de moduler l'activité de la Na^+/K^+ -ATPase et ainsi la sécrétion apicale de potassium (figure 4A).

b. Régulation de l'excrétion du potassium

L'excrétion urinaire du potassium est régulée par 2 effecteurs majeurs et étroitement liés qui sont l'aldostérone et la kaliémie.

Dans certains cas, le CCD peut être un lieu de réabsorption du potassium. Elle a possiblement lieu dans les cellules intercalaires *via* l'entrée de potassium au pôle apical sous l'action de la H^+/K^+ -ATPase (figure 4B) mais la façon dont le potassium est réabsorbé du côté basolatéral est encore inconnue et discutée à l'heure actuelle. L'équipe de Wingo a montré l'apparition d'une conductance potassique basolatérale sur les cellules intercalaires du CCD chez le lapin dans le cadre d'une restriction potassique [Wingo et al, 1993]. Cependant, ce résultat n'a pas été confirmé par d'autres équipes. L'équipe d'Alain Doucet a, quant à elle, montré l'induction de la H^+/K^+ -ATPase dans les cellules principales du rat dans les mêmes conditions [Younes-Ibrahim et al., 1995] suggérant ainsi une entrée apicale de potassium dans la cellule. Par ailleurs, une réabsorption de potassium est observée lors d'un régime appauvri en potassium [Koeppen et Stanton, 2001 ; Wang et al., 2004].

En cas d'hypokaliémie, on observe une diminution de l'excrétion urinaire en potassium, due à une inhibition de la sécrétion potassique par les cellules principales du CCD et une stimulation de l'absorption de potassium par les cellules intercalaires (figure 5A). Dans ces conditions, il a été décrit une diminution de l'expression apicale des canaux ROMK et BK [Mennitt et al., 2000 ; Chen et al., 2006 ; Wang et al., 2004, Welling, 2013] ainsi que de l'activité de la Na^+/K^+ -ATPase [Imbert-Teboul et al., 1987 ; Reilly et Ellison, 2000].

A l'inverse, lors d'une hyperkaliémie, l'excrétion urinaire de potassium augmente rapidement et ceci sous l'action de divers mécanismes (figure 5B) :

- Un effet direct de l'hyperkaliémie sur les transports ioniques du CCD [Wang et al., 2004 ; Palmer et al, 1994]. Palmer et ses collaborateurs ont ainsi montré qu'un régime riche en potassium augmentait la sécrétion par

ce dernier en stimulant la Na^+/K^+ -ATPase et les canaux apicaux ROMK et ENaC [Palmer et al., 1994], indépendamment de l'aldostérone.

- L'aldostérone augmente le nombre de Na^+/K^+ -ATPases présentes à la membrane basolatérale des cellules principales du CDD [Blot-Chabaud et al., 1990], à l'origine d'un influx de potassium dans la cellule. D'autres études ont cependant montré que, tout comme pour ENaC, l'aldostérone pouvait stimuler ROMK en augmentant l'expression membranaire de ROMK, dans les cellules principales, afin de permettre la sécrétion de potassium [Yoo et al., 2003 ; Wang, 2006].
- L'aldostérone augmente également le nombre de canaux ENaC à la membrane apicale des cellules principales, et la dépolarisation de la membrane apicale ainsi générée augmente le gradient électrochimique favorable à la sécrétion du potassium. L'absorption accrue de sodium va ainsi permettre une augmentation de la sécrétion luminale de potassium [Halperin, 1998 ; Field, 1984].

Une étude a montré, par ailleurs, qu'une stimulation d'ENaC pouvait suffire à expliquer l'augmentation de la sécrétion potassique en cas d'hyperkaliémie [Schlatter et Schafer, 1987].

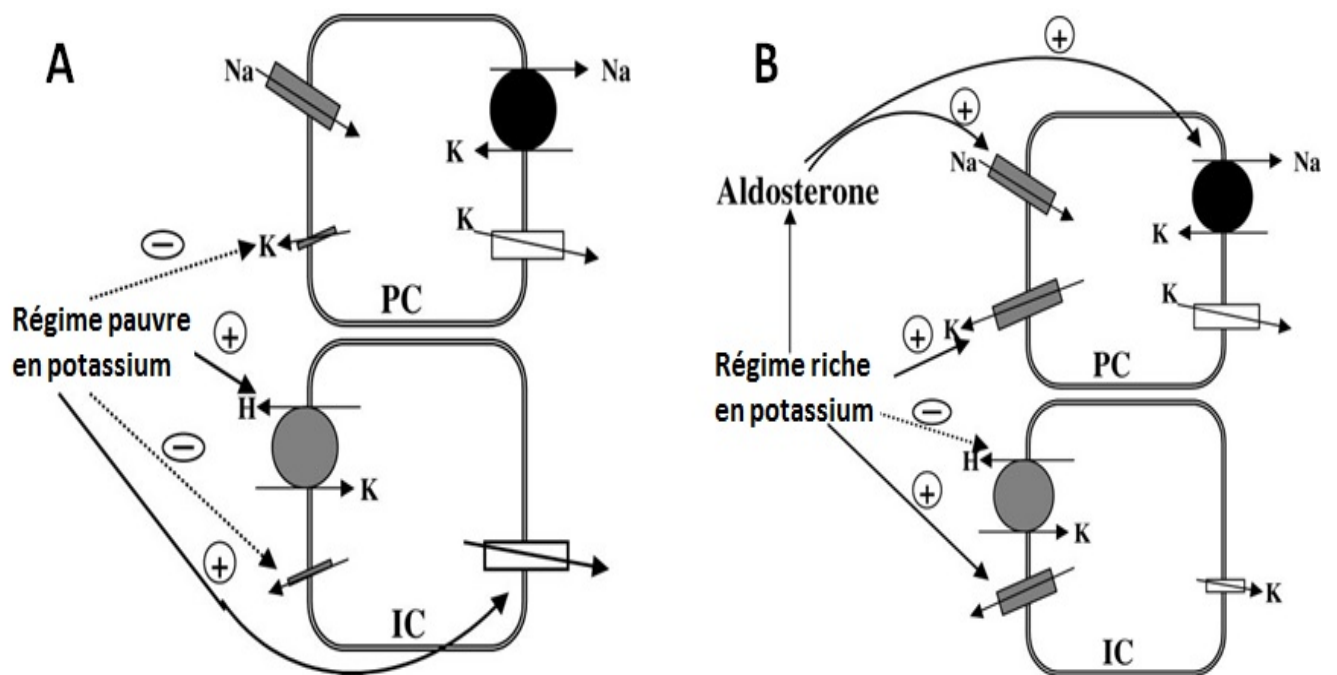


Figure 5 : Effet des variations d'apport en potassium sur l'activité de transport des cellules du CCD (d'après [Wang et al., 2004]).

- A. Lors d'un régime pauvre en potassium, la sécrétion de potassium est diminuée et des mécanismes de réabsorption sont alors mis en place dans les cellules intercalaires du CCD. On observe ainsi une activation de la H^+/K^+ -ATPase et des canaux potassiques basolatéraux et une diminution de l'activité de la Na^+/K^+ et de ROMK.
- B. Lors d'un régime enrichi en potassium, il y a une augmentation de la sécrétion potassique suite à une stimulation des canaux potassiques apicaux et une diminution de l'activité de la H^+/K^+ -ATPase. En parallèle, l'aldostérone va permettre une augmentation de la réabsorption de sodium *via* une augmentation de l'expression membranaire d'ENaC et de la Na^+/K^+ -ATPase dans les cellules principales.
 PC : cellule principale ; IC : cellule intercalaire.

L'importance des canaux ioniques dans le fonctionnement du rein est donc clairement établie. De nombreux canaux ioniques ont pu être décrits suite à la mise au point de la technique du patch-clamp dans le début des années 1980 [Neher et al., 1976 ; Hamill et al., 1981]. Par la suite, les avancées en biologie moléculaire et cellulaire ont permis de déterminer l'identité moléculaire d'une partie des canaux que nous venons de mentionner.

Dans les prochains chapitres, nous nous intéresserons plus particulièrement aux canaux chlorure de la famille des ClC, en nous focalisant sur le groupe des canaux ClC-K, principaux acteurs participant aux mécanismes de transports transépithéliaux de NaCl, et aux canaux potassiques avec en particulier la famille des canaux Kir, famille très présente dans les différents segments du néphron et dont le rôle fondamental d'un de ses membres (Kir1.1 ou ROMK) a pu être décrit précédemment.

II- Les canaux chlorure du néphron.

1- Le CFTR.

Le CFTR est un canal chlorure appartenant à la famille des transporteurs ABC (ATP Binding Cassette), dont les mutations sont à l'origine de la mucoviscidose (une maladie autosomique récessive). L'expression hétérologue de ce canal a permis très tôt d'établir ses propriétés électrophysiologiques : ce canal présente une conductance unitaire d'environ 10pS, est activé par l'AMPc, son activité est indépendante du voltage et sa séquence de perméabilité anionique est $Br^- > Cl^- > F^-$ [Tabcharani et al., 1990 ; Berger et al., 1991 ; Anderson et al., 1991 ; Bear et al., 1992]. En plus de son rôle de canal ionique, cette protéine possède des fonctions de régulation et d'interaction avec d'autres protéines : ainsi son association avec ENaC permettrait l'augmentation de la réabsorption de Na^+ par le colon [Kunzelmann, 2001].

Bien que le rein ne soit pas une cible majeure de la mucoviscidose, une localisation rénale de CFTR a été établie chez le rat et, la souris le lapin et l'Homme par RT-PCR et immunohistochimie. Originellement détecté sur les membranes cellulaires de la TAL et des cellules intercalaires du CCD où son rôle reste obscur, des données indiquant sa présence sur la membrane des endosomes sous-apicaux des cellules du PCT [Crawford et al., 1991 ; Morales et al., 1996 ; Todd-Turla et al., 1996] suggèrent son implication dans des mécanismes d'endocytose par ce segment. En ce sens, il a récemment été démontré qu'une absence de CFTR dans le PCT pouvait entraîner des effets similaires à ceux retrouvés lors de l'absence

de l'échangeur Cl^-/H^+ CIC-5, également exprimé dans les endosomes de ce segment, comme nous le verrons plus loin [Devuyst et al., 2015].

2- Les canaux chlorures activés par le calcium intracellulaire (CLCA).

Le premier membre de cette famille à avoir été identifié est le bCLCA1 isolé à partir des voies aériennes bovines et, depuis, d'autres membres de cette famille ont été mis en évidence dans plusieurs espèces et localisés dans de nombreux tissus [Loewen et Forsyth, 2005]. Chez la souris, il existe 6 membres de la famille des CLCA appelés mCLCA1 à 6. Ils ont été identifiés comme étant des canaux chlorures activés par le calcium intracellulaire. Il faut noter que cette activation par le calcium intracellulaire n'est pas une propriété absolue car un courant reste observable en présence de très faibles concentrations de calcium intracellulaire et l'augmentation d'activité des canaux ne se fait que lors d'une forte augmentation de la concentration en calcium intracellulaire [Gandhi et al., 1998 ; Elble et al., 2002 ; Evans et al., 2004].

La localisation rénale de ces canaux n'est aujourd'hui pas très claire. Une étude a d'abord montré chez la souris par Northern Blot [Gandhi et al., 1998] que mCLCA1 est exprimé dans le rein. D'autres études de RT-PCR ont ensuite permis de déterminer que mCLCA1 serait uniquement présent dans la cTAL [Boese et al., 2000] et mCLCA2 serait lui présent dans le PCT, la TAL et le DCT [Gruber et al., 1998]. Des études par patch-clamp sur des cultures primaires de cellules d'IMCD ont permis de mettre en évidence la présence de courant caractéristique des CLCA mais sans pour autant pouvoir déterminer de quel CLCA il s'agit [Qu et al., 2003]. Plus récemment, des courants de type CLCA ont été identifiés sur une lignée de cellules de la partie médullaire interne du canal collecteur, mais leur rôle reste encore indéterminé [Linley et al., 2009]. Enfin, un modèle mathématique de réponse myogénique des cellules musculaires d'artériole afférente glomérulaire rénale suggère une forte implication de canaux CLCA, mais leur présence dans le tissu natif reste, ici aussi, à déterminer [Edwards et Layton, 2014].

3- La famille des canaux chlorure CIC.

Le premier membre de la famille des CIC, appelé CIC-0, a été mis en évidence suite à son clonage en 1990 à partir de l'organe électrique de la raie torpille *Torpedo marmorata* [Jentsch et al., 1990]. On retrouve les CIC dans tous les phylums, des bactéries aux humains en passant par les levures et les plantes. Ainsi, une isoforme a été identifiée chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, deux chez la bactérie *Escherichia coli*, au moins 3 chez les plantes

et également chez les animaux dont 9 chez les mammifères [Jentsch, 2008]. Tous les CIC ne sont, cependant, pas des canaux ioniques, certains étant ensuite apparus comme étant des échangeurs $2Cl^-/H^+$ [Accardi et al., 2004 ; Scheel et al., 2005 ; Picollo et al., 2005]. Chez les mammifères, les 9 types de CIC décrits (CIC-1 à 7, CIC-K1 et CIC-K2 ou respectivement CIC-Ka / Kb chez l'Homme) sont répartis en 3 sous-familles selon leur localisation cellulaire, leurs propriétés de transport et leur homologie de séquence (Figure 8) [Jentsch et al., 2002] : la première sous-famille regroupe des canaux chlorures exprimés à la membrane plasmique (CIC-1, CIC-2, CIC-Ka et CIC-Kb), les deux autres sous-familles regroupent des échangeurs $2Cl^-/H^+$ essentiellement exprimés dans les vésicules intracellulaires, où l'on distingue les échangeurs CIC-3 à CIC-5 possédant 80% d'homologie, d'une part, et les échangeurs CIC-6 et CIC-7 ne partageant que 45% d'homologie, d'autre part [Jentsch et al., 2002]. Enfin, certains CIC nécessitent la présence d'une sous-unité régulatrice pour être fonctionnels ; c'est le cas par exemple de CIC-2 qui se lie à la sous-unité GlialCAM, des canaux CIC-K qui ont besoin de la Barttine, et de CIC-7 qui se lie à ostm1 [Jeworutzki et al., 2012 ; Estévez et al., 2001 ; Lange et al., 2006].

a. Structure générale des CIC

Avant le clonage de CIC-0, Miller et collaborateurs avaient réussi à purifier les canaux chlorures de la raie torpille et à étudier leur activité électrique en les insérant dans des bicouches lipidiques [Miller et al., 1984]. Ils ont observé des courants ayant 2 niveaux d'amplitude, de durée brève, séparés par des fermetures plus longues durant lesquelles aucune activité n'est observée (Figure 6A). Ils ont alors fait l'hypothèse que ces canaux fonctionnent sous forme de dimères, chaque monomère étant équipé d'un pore (appelé protopore) qui s'ouvre et se ferme rapidement de façon indépendante l'un de l'autre. Le dimère est, lui, contrôlé par une porte commune aux deux protopores et qui fonctionnent de façon plus lente (Figure 6B). Cette hypothèse a pu être confirmée par la suite grâce à des études de cristallographie réalisées au début des années 2000 sur stCIC (*Salmonella typhimurium*), ecCIC-1 (*Escherichia coli*) [Dutzler et al., 2002] et sur CmCIC (*Cyanidioschyzon merolae*) [Feng et al., 2010] (Figure 6C). Certains hétérodimères, tels CIC-0/CIC-1 ou CIC-0/CIC-2, sont fonctionnels [Weinreich et al., 2001].

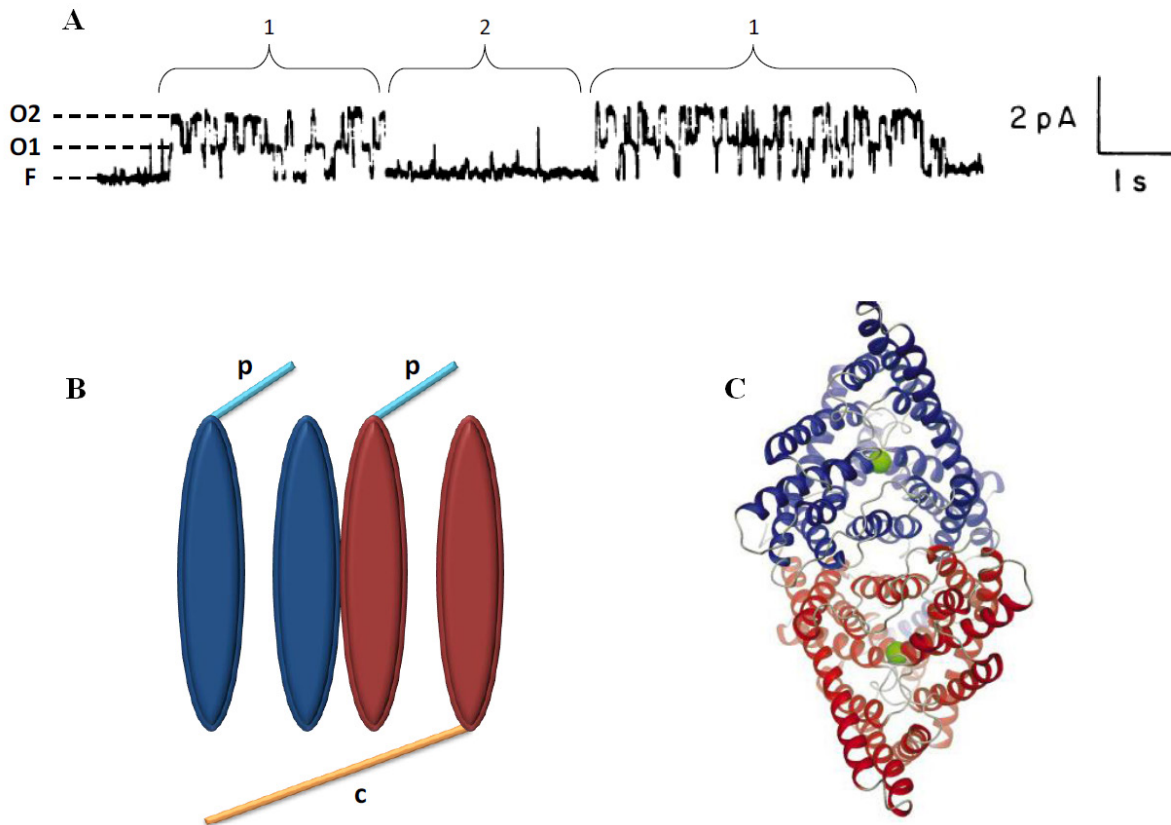


Figure 6: Structure en dimère des CLC [d'après Keck M, 2012]

A: Enregistrement par patch-clamp en canal unitaire de CLC-0 représentant l'état de fermeture du canal (F), un état de demi-ouverture (O1) et un état d'ouverture complète (O2). On constate également des périodes pendant lesquelles les ouvertures et les fermetures sont rapides (1) séparées par des périodes de longues fermetures (2)

B: Structure des dimères de CLC. Chacun des deux protopores est commandé par une porte (p) responsable des ouvertures et fermetures rapides (correspondant aux périodes 1), tandis qu'une porte commune (c) est à l'origine des longues fermetures (correspondant aux périodes 2).

C: Structure de stCLC déterminée par cristallographie (vue du dessus depuis l'espace extracellulaire). Les deux dimères sont représentés en bleu et en rouge, une sphère verte représente un ion chlorure au sein du filtre de sélectivité.

La cristallographie a permis de mieux comprendre la structure tridimensionnelle des ClC. Chacun des monomères est formé de dix-huit hélices α dont seize sont transmembranaires, l'hélice A étant cytosolique et l'hélice R partiellement transmembranaire [Dutzler et al., 2002] (Figure 7). Le monomère montre des motifs répétés formant ainsi un assemblage anti-parallèle des hélices B à I (en vert sur la Figure 7) et J à Q (en bleu sur la Figure 7). Contrairement à stClC et ecClC-1, les ClC d'eucaryotes et d'archées possèdent un long domaine cytoplasmique C-terminal pourvu de deux domaines CBS, pour cystathionine- β -synthase, et dont le(s) rôle(s) reste(nt) incertain(s). Ils pourraient, toutefois, être impliqués dans le trafic intracellulaire des ClC. Par exemple, 3 mutants non-sens du ClC-5, tronquant le domaine CBS2, sont incapables d'atteindre les endosomes et sont retenus dans l'appareil de Golgi [Carr et al., 2003]. D'autres données suggèrent aussi un rôle des domaines CBS dans le contrôle des cinétiques d'ouvertures et de fermetures (« gating ») des ClC. Estévez et al. ont ainsi identifié des mutations ponctuelles spécifiques au sein du CBS2 qui modifient le gating de la porte commune de ClC-0 et ClC-1. En particulier, la mutation du glutamate 763 de ClC-0 abolit le gating de la porte commune sans interférer avec le gating des protopores [Estévez et al., 2004]. Enfin, une dernière hypothèse serait que les domaines CBS fonctionnent comme des capteurs métaboliques en liant l'ATP, l'ADP ou l'AMP intracellulaire. En effet, chez ClC-5, la liaison de ces nucléotides sur les domaines CBS entraîne une potentialisation des courants [Zifarelli et al., 2009]. De plus, chez ClC-1, l'ATP, l'ADP et l'AMP modifient la dépendance au voltage de la porte commune mais pas celle des protopores, et des mutations dans les domaines CBS de ClC-1 éliminent cet effet suggérant que ces métabolites exercent leurs effets en se liant à ces domaines [Bennetts et al., 2005 ; Tseng et al., 2011]. La cristallographie a également révélé l'existence de plusieurs sites de liaison anioniques, trois pour chaque protopore, pouvant être occupés simultanément avec une constante de liaison pour le chlorure comprise entre 4 et 40mM [Lobet et al., 2006].

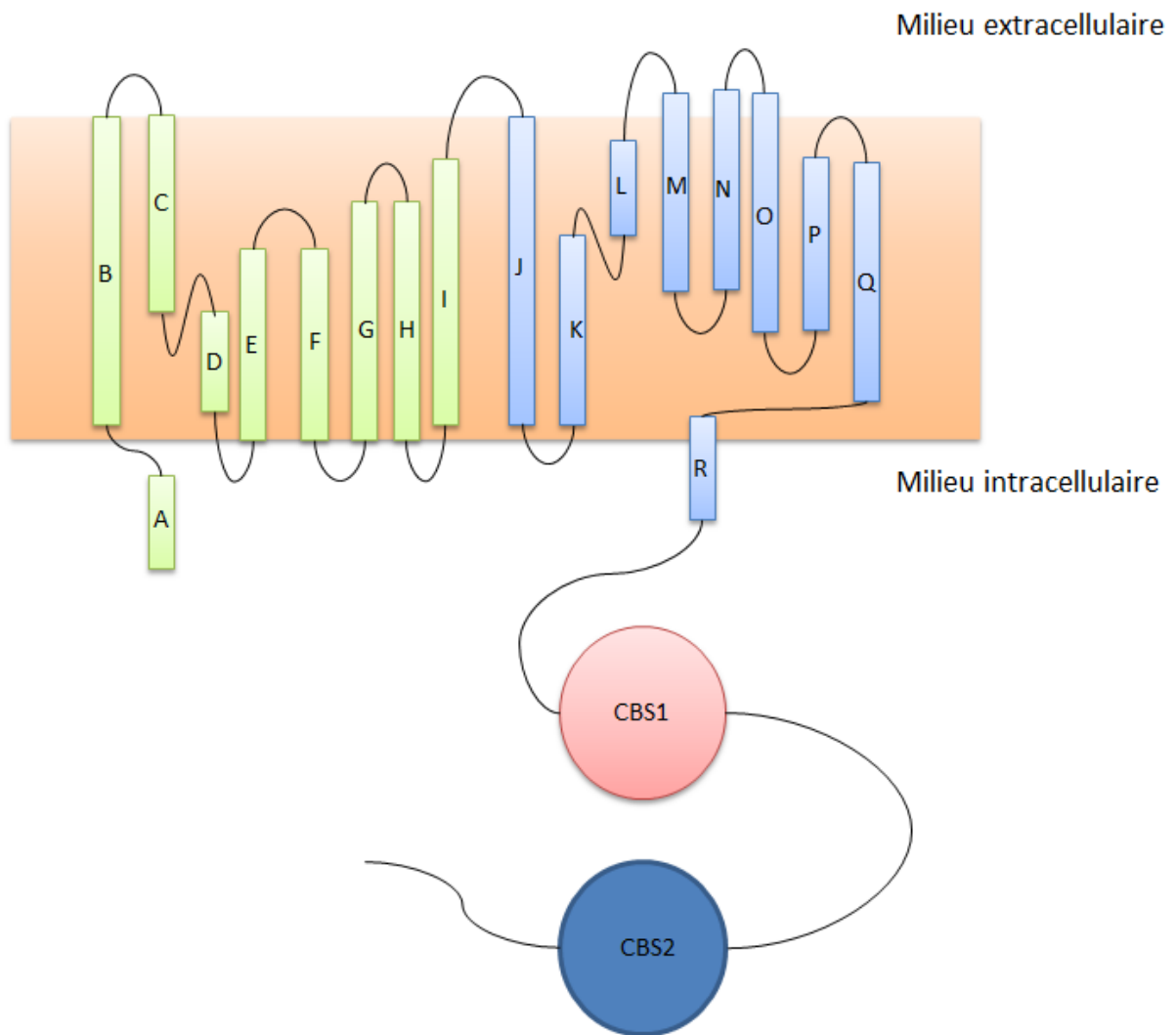


Figure 7: structure d'un monomère de ClC eucaryote

b. Voltage-dépendance et régulation des CIC

Chez les CIC, la voltage-dépendance n'est pas due à la présence, comme pour les canaux cationiques voltage-dépendants, d'un senseur de voltage intrinsèque de la protéine [Noda et al., 1984], mais à la fixation du chlorure sur ses sites à l'intérieur du protopore [Pusch, 1996 ; Pusch, 2004] et à la présence d'un autre glutamate, situé au sein de l'hélice α F, dans le protopore : le « gating glutamate ». En effet, si l'on neutralise le glutamate en position 148 chez ecCIC-1 [Accardi et al., 2004], 224 chez CIC-3 et CIC-4, 211 chez CIC-5 [Li et al., 2002 ; Matsuda et al., 2010; Picollo et al., 2005; Scheel et al., 2005] et 200 chez CIC-6 [Neagoe et al., 2010] on transforme les échangeurs $2Cl/H^+$ en canaux chlorures dont la conductance n'est plus voltage-dépendante. Le « gating glutamate » est présent chez tous les CIC, à l'exception des deux CIC-K où le glutamate est remplacé par une valine (cf partie 5c). Plusieurs équipes ont montré, chez rCIC-K1, que la mutation de cette valine en glutamate ne modifiait pas son gating mais uniquement sa voltage dépendance [Waldegger et al., 2000 ; Fischer et al., 2010]. En effet, lorsqu'on remplace la valine en position 166 par un glutamate, la porte commune s'ouvre lors d'une hyperpolarisation (alors qu'elle s'ouvre lors d'une dépolarisation chez le rCIC-K1 sauvage) et les portes des protopores s'ouvrent lors d'une dépolarisation (alors qu'elles s'ouvrent lors d'une hyperpolarisation chez le rCIC-K1 sauvage). Cette étude démontre donc que le résidu 166 des CIC-K déterminerait uniquement la voltage-dépendance mais pas le gating des CIC-K.

Selon le modèle établi pour CIC-5, les protons se fixent au niveau du « proton glutamate », faisant pivoter la chaîne latérale du « gating glutamate » et ainsi ouvrir le pore [Zdebik et al., 2008]. C'est pourquoi la neutralisation du « proton glutamate » entraîne une absence de courant car les protons ne pouvant plus se lier à celui-ci, la chaîne latérale du « gating glutamate » ne pivote plus et donc obstrue le pore. La neutralisation du « gating glutamate » entraîne, quant à elle, une ouverture constitutive du pore expliquant la forte conductance chlorure observée, tandis que les protons ne peuvent plus être transportés car, tout comme le « proton glutamate », le « gating glutamate » constitue un site de liaison pour les protons.

La régulation des CIC-K par les protons externes diffère de celle du CIC-2 qui, lui, montre un site activateur lié au « gating glutamate » et un site inhibiteur [Niemeyer et al., 2009]. Elle diffère également de celles du CIC-0 et du CIC-1 qui sont activés par un pH acide [Hanke et al., 1983 ; Rychkov et al., 1996]. Les autres CIC sont tous pH-dépendants du fait du « gating glutamate », seuls les CIC-K présentent une valine à la place de ce glutamate signifiant que la

pH-dépendance des ClC-K ne peut être médiée par le même mécanisme. Par contre, les ClC-K sont sensibles au Ca^{2+} extracellulaire, une propriété unique parmi les ClC [Gradogna et al., 2010].

c. Rôle physiologiques des ClC

Les rôles physiologiques des canaux ClC ont été en grande majorité déduits à partir d'analyses phénotypiques de souris génétiquement modifiées (KO) et de pathologies humaines. Ainsi, il existe des souris invalidées pour chacun des 9 gènes ClC, bien que les données pour la souris ClC-K2 KO soient en cours de collection dans le laboratoire et pas encore publiées, et 6 canaux ClC sont impliqués dans des maladies géniques héréditaires humaines (ClC-1, ClC-2, ClC-3, ClC-Kb, ClC-5 et ClC-7).

Le canal ClC-1 est exprimé exclusivement à la membrane plasmique (sarcolemme) des cellules du muscle squelettique [Steinmeyer et al., 1991 ; Lueck et al., 2010] bien qu'il ait été détecté, certes à des niveaux très faibles, dans le rein, le cœur, le foie, le muscle lisse et les cellules gliales [Steinmeyer et al., 1991]. L'étude de ses propriétés conductrices sur des systèmes d'expressions hétérologues a permis de mettre en évidence la présence d'un courant rectifiant entrant ayant une faible conductance d'environ 1 à 2 pS, régulé par les anions intra et extracellulaires et également par le pH intracellulaire [Push et al., 1994 ; Weinreich et al., 2001] et activé lors d'une dépolarisation membranaire [Tang et al., 2011].

La pathologie associée à ClC-1 fut l'une des toutes premières décrites relevant d'un défaut de fonction d'un canal ionique. Ainsi, chez l'Homme, des mutations de *CLCN1*, le gène codant ClC-1, sont à l'origine d'une myotonie congénitale se traduisant principalement par des contractions musculaires involontaires dues à une baisse de la conductance chlorure des cellules musculaires squelettiques [Koch et al., 1992], soulignant le rôle fondamental de ClC-1 sur le contrôle de l'excitabilité du muscle squelettique en permettant la repolarisation des cellules après un potentiel d'action. Il est à noter que plus d'une centaine de mutations de *CLCN1* a été aujourd'hui identifiées dans le cadre de la myotonie congénitale et sont à l'origine de perturbations diverses de ClC-1 allant d'un défaut d'adressage membranaire à l'altération de la cinétique du canal [Tang et al., 2011]. En ce sens, la problématique de la pathologie liée à ClC-1 se rapproche, nous le verrons au chapitre III-2, de celle liée aux canaux ClC-K rénaux pour lesquels de nombreuses mutations à l'origine du syndrome de Bartter de type III ont été identifiées.

A l'inverse du CIC-1, le canal CIC-2 est, lui, exprimé très largement dans l'organisme (cœur, pancréas, rein, cerveau, foie, poumon...) [Thiemann et al., 1992]. Sa conductance unitaire est de 3pS [Weinreich et al., 2001] et il est activé par le gonflement cellulaire, l'hyperpolarisation membranaire et une légère acidité du pH extracellulaire [Bi et al., 2008]. Pendant longtemps, aucune pathologie humaine ne lui a été proprement associée, mais une étude récente rapporte des mutations de CIC-2 chez des patients souffrant d'une forme de leucoencéphalopathie [Depienne et al., 2013], confirmant des observations préalables sur des souris invalidées pour CIC-2 [Blanz, J. et al., 2007]. Par ailleurs, une étude suggère aussi un rôle de CIC-2 dans la survenue de l'épilepsie [Haug et al., 2003], mais ces résultats n'ont pas pu être reproduits [Niemeyer et al., 2004] et une autre publication a montré qu'il n'existait finalement pas de relation directe entre des mutations de CIC-2 et l'épilepsie [Blanz et al., 2007]. L'étude de souris invalidées pour CIC-2 a suggéré, outre son implication dans la leucoencéphalopathie, un rôle de ce canal dans l'homéostasie ionique de la rétine et du testicule [Bösl et al., 2001; Bi et al 2013].

Les rôles physiologiques, les propriétés des CIC-K ainsi que de leur sous-unité régulatrice seront traités plus loin (cf. partie III).

L'échangeur $2\text{Cl}^-/\text{H}^+$ CIC-3 est retrouvé majoritairement dans les lysosomes, les endosomes et les vésicules synaptiques. Son expression est étendue à plusieurs organes (rein, cerveau, foie...) [Jentsch et al., 2008]. Les travaux de Li et al. ont permis de mettre en évidence un courant CIC-3 possédant une rectification sortante importante et une perméabilité au $\text{Cl}^- > \text{I}^-$ [Li et al., 2000]. Des études récentes chez des souris invalidées pour CIC-3 indiquent son possible rôle cardioprotecteur [Xiong et al., 2010] et son implication dans des pathologies inflammatoires intestinales chroniques, telle la maladie de Crohne [Huang et al., 2014]. Dans le rein, CIC-3 a été localisé sous la membrane luminale de tubules proximaux de souris [Maritzen et al. 2008]. Son rôle rénal reste indéterminé, mais une augmentation de son expression chez des rats diabétiques a été récemment observée [Fu et al., 2010].

L'échangeur $2\text{Cl}^-/\text{H}^+$ CIC-4 partage 80% d'homologie avec CIC-3 et est également exprimé dans de nombreux tissus comme le cerveau, le foie, le muscle squelettique et les reins [Jentsch et al., 1995; Van Slengtenhorst et al., 1994]. Il est localisé principalement dans les membranes intracellulaires. Les courants produits par CIC-4 sont semblables à ceux observés pour l'échangeur CIC-3 et sont fortement rectifiants sortants [Friedrich et al., 1999]. Ses fonctions physiologiques sont encore à élucider. En effet, bien qu'il soit succinctement

rapporté que des souris invalidées pour le ClC-4 ne montrent aucun phénotype [Jentsch, 2008], des données suggèrent son implication dans l'acidification endosomale des fibroblastes [Mohammad-Panah et al., 2009].

L'échangeur $2\text{Cl}^-/\text{H}^+$ ClC-5 partage lui aussi 80% d'homologie avec ClC-3 et est majoritairement exprimé au niveau des épithéliums rénal et intestinal [Steinmeyer et al. 1995 ; Vandewalle et al. 2001], bien que sa présence ait été aussi récemment établie dans les cellules pariétales gastriques [Takahashi et al., 2013]. Les courants produits par ClC-5 sont soutenus par un échangeur $2\text{Cl}^-/\text{H}^+$ [Matsuda et al., 2010]. Cette protéine jouerait un rôle important dans l'acidification des endosomes, par neutralisation des charges positives de la H^+ ATPase de type V, ce qui est nécessaire à l'intégrité de l'hippocampe et de la rétine [Stobrawa et al., 2001]. Son rôle dans l'épithélium gastro-intestinal n'est pas clairement établi, mais il a très tôt été suggéré qu'il participerait au processus d'endocytose intestinale [Vandewalle et al., 2001] et plus récemment dans la sécrétion acide gastrique [Takahashi et al., 2013]. Dans le rein, il s'exprime dans les membranes des endosomes précoces des cellules du tubule contourné proximal et dans une moindre mesure dans l'anse de Henle et les cellules intercalaires du canal collecteur [Günther et al., 1998 ; Sakamoto et al., 1999]. Les mutations du gène encodant ClC-5 entraînent la maladie de Dent [Mensour-Hendili et al., 2015] une maladie rénale héréditaire liée à l'X caractérisée notamment par une protéinurie de bas poids moléculaire, une calciurie et des calculs rénaux. A ce jour, plus de 148 mutations de ClC-5 ont été identifiées. Les données récentes de la littérature démontrent que les mutations peuvent être classées en au moins 3 classes [Lourdel et al., 2012]. La première classe de mutations entraîne un défaut d'adressage à la membrane plasmique et aux endosomes précoces. La classe 2 entraîne un retard de la maturation de la protéine et de son adressage à la membrane et la classe 3 entraîne, quant à elle, un défaut dans les propriétés conductrices de l'échangeur sans affecter son adressage. Les études menées sur les souris invalidées pour ClC-5 reproduisent notamment les phénomènes de protéinurie observés chez l'Homme et ont mis en évidence des problèmes d'endocytose par les cellules du tubule proximal traduisant l'importance du ClC-5 dans la modulation du pH des endosomes précoces ou dans son contenu en chlore [Gunther et al., 2003, Hara-Chikuma et al., 2005, Novarino et al., 2010].

ClC-6 représente avec ClC-7 la troisième sous famille des ClC de mammifères. Il s'agit d'un échangeur $2\text{Cl}^-/\text{H}^+$ exprimé dans de nombreux tissus notamment le cerveau, le muscle squelettique et les testicules [Brandt et Jentsch., 1995]. On le retrouve principalement dans les membranes des endosomes tardifs [Poët et al., 2006] et l'analyse de souris invalidées pour

CIC-6 a permis de mettre en évidence un défaut de stockage des lysosomes dans les segments initiaux des axones neuronaux, d'où la sensibilité à la douleur réduite chez ces souris [Poët et al., 2006]. Il est à noter que, malgré la détection initiale de CIC-6 dans le rein humain [Brandt et Jentsch, 1995], cette observation n'a pu être reproduite par le même groupe chez la souris sauvage [Poët et al., 2006]. De plus, les souris CIC-6^{-/-} ne présentent aucun phénotype rénal [Poët et al., 2006], de sorte qu'il semble que la non expression rénale de CIC-6, au moins chez la souris, soit communément admise, ce qui ferait de CIC-6 le seul représentant des CIC absent dans le rein.

CIC-7 a été cloné par homologie avec CIC-6 avec lequel il partage 45% d'identité. Il doit s'associer à la sous-unité Ostm1 pour être actif [Leisle et al., 2011]. Cet échangeur 2Cl⁻/H⁺ s'exprime dans de nombreux tissus, dont le rein [Brandt et Jentsch, 1995], et joue un rôle crucial dans l'acidification des lysosomes [Graves et al., 2008]. L'étude de souris invalidées pour CIC-7 a permis de mettre en évidence son rôle physiologique. En s'exprimant dans la membrane plissée des ostéoclastes, cette protéine permet la neutralisation des charges positives générées par la H⁺-ATPase de type V et permet ainsi l'acidification des lacunes où s'effectuent la résorption osseuse [Kornak et al., 2001]. Ainsi a été faite la relation entre les ostéopétroses humaines récessives et dominantes et la perte de fonction de CIC-7 dans les ostéoclastes [Kornak et al., 2001 ; Cleiren et al., 2001] suite à des mutations du CIC-7 ou à la perte d'Ostm1 [Jentsch et al., 2008]. Dans le rein, bien que sa présence ait été détectée dans tous les segments du néphron, CIC-7 est majoritairement exprimé dans le tubule contourné proximal où il jouerait un rôle central dans la dégradation lysosomale des protéines, sans influencer sur leur endocytose [Wartosch et al., 2009].

L'ensemble des caractéristiques des différents CIC est résumé dans la figure 8.

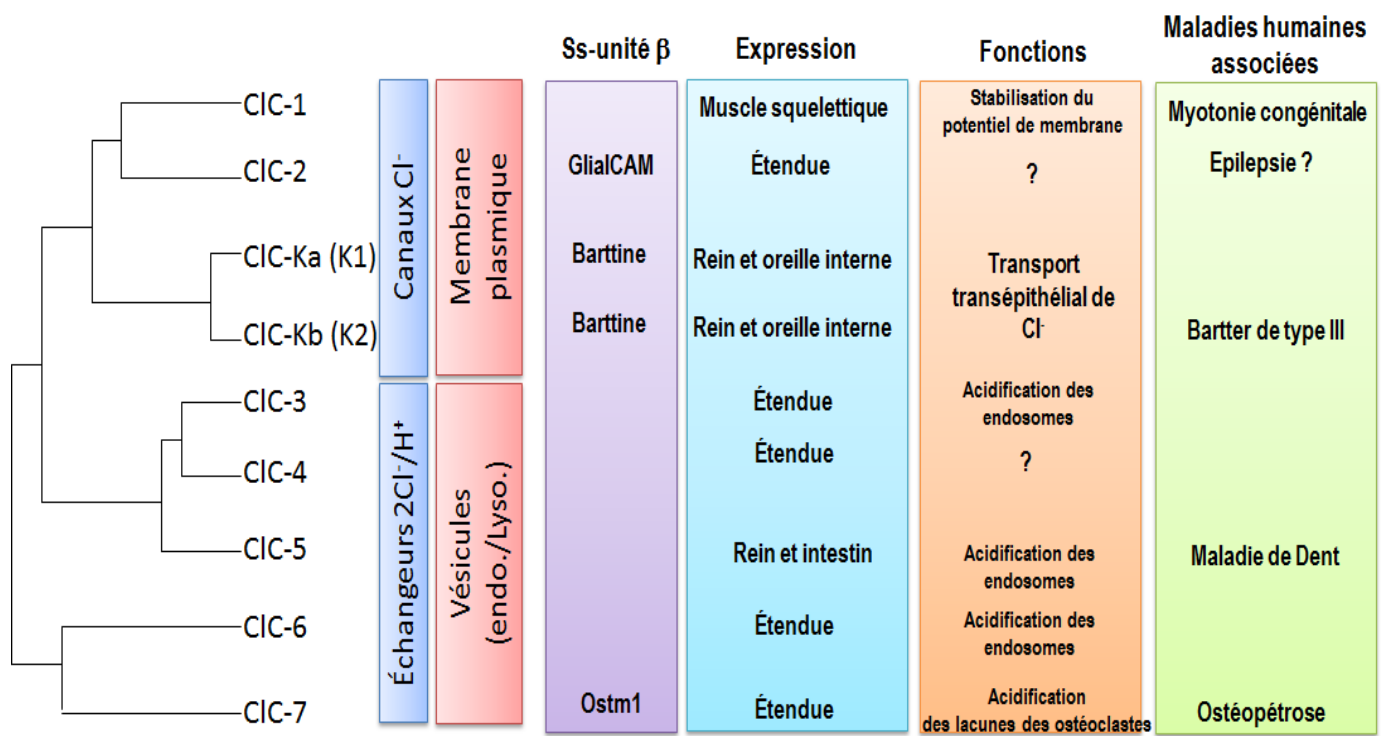


Figure 8: Résumé des principales caractéristiques des ClC de mammifère.

III- Les canaux CIC-Ka(K1) et CIC-Kb(K2)

Ces deux canaux portent le nom de CIC-K car, à l'origine, on les pensait spécifiques au rein (K venant de kidney). Cependant, des études ont montré que ces canaux sont aussi exprimés dans l'oreille interne [Estevez et al., 2001 ; Sage et al., 2001 ; Qu et al., 2006]. Comme nous le verrons plus loin, les données physiopathologiques démontrent qu'ils jouent un rôle majeur au sein de ces deux organes [Stöling et al., 2014]. L'analyse de ces données ainsi que la détermination précise des propriétés et de la localisation de ces canaux dans le néphron sont des enjeux clés pour comprendre leurs rôles physiologiques.

Les canaux CIC-K1 et K2 ont été clonés pour la première fois chez le rat par Uchida et ses collaborateurs en 1993 et 1994 [Uchida et al., 1993 ; Adachi et al. 1994]. Ces deux canaux sont composés par l'association de 687 acides aminés et présentent une homologie de plus de 80%. Leurs homologues humains, appelés respectivement CIC-Ka et Kb, ont été clonés en 1994 [Kieferle et al., 1994]. Par la suite, des études chez la souris ont permis de découvrir un canal présentant près de 90% d'homologie avec le CIC-K1 de rat et un deuxième canal présentant, lui, près de 90% d'homologie avec le CIC-K2 de rat. Ces deux CIC-K de souris présentant entre eux une homologie de 85% [Takeuchi et al., 1995].

Ces canaux, à l'exception de CIC-K1, ne génèrent pas de courant lorsqu'ils sont exprimés seuls dans des systèmes d'expression hétérologue et ont besoin, pour être fonctionnels, de s'associer avec une sous-unité transmembranaire découverte en 2001, la barttine [Birkenhager et al., 2001]. Cette dernière augmente leur adressage à la membrane plasmique et altère un certain nombre de leurs propriétés biophysiques telles que la sensibilité au Ca^{2+} extracellulaire et leur gating (pour CIC-K1) [Estevez et al., 2001 ; Waldegger et al., 2002 ; Scholl et al., 2006 ; L'hoste et al., 2013 ; Fisher et al., 2010 ; Stöling et al., 2014]. Il faut noter que CIC-K1, contrairement au CIC-K2, est actif sans barttine à la membrane plasmique mais voit son expression membranaire moins importante que lors de son association avec cette sous-unité [Estevez et al., 2001 ; Waldegger et al., 2002 ; l'Hoste et al., 2013].

1- Localisation des CIC-K dans le néphron

La détermination de la localisation intrarénale des canaux CIC-K est rendue très difficile du fait qu'il n'existe pas d'anticorps spécifique pour l'un de ces canaux du fait de leur forte homologie de séquence. Pour contourner ce problème, l'équipe japonaise de Kobayashi et coll. a eu l'idée d'utiliser un anticorps anti-CIC-K chez des souris KO pour CIC-K1

[Kobayashi et al., 2001] et également d'exprimer l'EGFP sous le contrôle du promoteur du CIC-Kb [Kobayashi et al., 2002]. Cela leur a permis de déterminer que CIC-K2 (et probablement CIC-Kb) s'exprime à la membrane basolatérale de la TAL, du DCT et des cellules intercalaires du CD. Par ailleurs, le profil d'expression tubulaire de la barttine se révèle être le même que celui des CIC-K [Estevez et al., 2001].

En ce qui concerne CIC-K1, sa localisation est plus controversée. Pour le groupe d'Uchida, son expression est restreinte aux membranes apicales et basolatérales de la portion grêle ascendante de l'anse de Henle [Uchida et al., 1995]. En revanche, une autre étude dans ce segment le localise à la membrane basolatérale uniquement [Vandewalle et al., 1997]. Nous verrons plus loin qu'au laboratoire le groupe de Jacques Teulon a pu identifier chez la souris, par la technique du patch-clamp et par RT-PCR sur segments microdisséqués, un canal chlorure de 10 pS dont les propriétés seraient compatibles avec celles de CIC-K2 sur les membranes basolatérales du DCT et les cellules intercalaires du CNT et du CCD [Lourdel et al., 2003; Nissant et al., 2004 ; Nissant et al., 2006]. Ce même groupe a également détecté la présence d'un canal chlorure de 40 pS sur la membrane basolatérale de la CTAL et du DCT2, correspondant probablement à CIC-K1 [Paulais et al., 1990 ; Nissant et al., 2004].

Ainsi, la localisation cellulaire et membranaire des CIC-K en fait de très bons candidats pour assurer la réabsorption du Cl⁻ par la membrane basolatérale des cellules du néphron distal.

2- Physiopathologie des CIC-K

Le syndrome de Bartter est une pathologie héréditaire à transmission autosomale récessive dont la prévalence est de un pour un million [Devuyst, 2008 ; Deschênes et al., 2011]. Elle se traduit par des perturbations du transport de NaCl par la TAL, une polyurie, un hyperaldostéronisme secondaire, une hypokaliémie, une alcalose métabolique, une hypercalciurie et des variations de pression artérielle de normale à basse [Hebert, 2003 ; Fahlke et al., 2010]. Il existe 2 groupes de syndrome de Bartter nommés anténatal et classique.

Le syndrome de Bartter anténatal, aussi appelé syndrome d'hyperprostaglandine E du fait de très hauts niveaux de prostaglandine E2 dans le sang et l'urine, est la forme la plus sévère [Hebert, 2003]. La perte de sel et d'eau entraîne un polyhydramnios anténatal se traduisant majoritairement par une naissance prématurée. Ces enfants présentent une polyurie postnatale compliquée par de sévères épisodes de déshydratation, des vomissements, des retards de croissance, des faiblesses musculaires, une hypercalciurie et développent parfois une

néphrocalcinose [Briet et al., 2006 ; Brochard et al., 2009 ; Deschenes et al., 2011]. Une des variantes du syndrome de Bartter anténatal, associé à une surdité, est particulièrement sévère et la majorité des patients développe très tôt une insuffisance rénale [Briet et al., 2006].

Le syndrome de Bartter classique est généralement diagnostiqué durant l'enfance et se traduit par des retards de croissance, des faiblesses musculaires, une hyper ou normocalciurie, mais l'insuffisance rénale et la néphrocalcinose sont rares [Briet et al., 2006 ; Brochard et al., 2009].

Des études de génétique humaine ont permis de mettre en évidence différents types de mutations (faux sens, non-sens...) de cinq gènes comme étant à l'origine de différentes formes du syndrome de Bartter. Il a ainsi été décrit 5 types de syndromes de Bartter (figure 9).

Le syndrome de Bartter de type I est la résultante de mutations au niveau du gène *SLC12A* codant pour le co-transporteur NKCC2 exprimé dans la membrane apicale des cellules de la TAL [Simon et al., 1996].

Le syndrome de Bartter de type II est, lui, associé à des mutations pour le gène *KCNJ1* codant pour le canal ROMK à l'origine d'une inactivation du canal de la membrane apicale des cellules de la TAL. Ainsi, une baisse de son activité entraîne une baisse de celle de NKCC2 et donc du transport transcellulaire de NaCl [Simon et al., 1996].

Le syndrome de Bartter de type III est quant à lui caractérisé par une atteinte du transport de NaCl suite à des mutations du gène *CLCNKB* codant pour ClC-Kb [Simon et al., 1997].

Celui de type IVa est associé à des mutations du gène *BSND* codant pour la barttine [Birkenhäger et al., 2001]. Ainsi, la perte de fonction de cette protéine entraîne la forme de syndrome de Bartter la plus sévère car elle impacte aussi bien l'activité des ClC-Ka que celle des ClC-Kb présents dans la TAL et, ainsi, l'un ne peut pas, même partiellement, compenser la perte d'activité de l'autre. Le type IVb, quant à lui, est dû à des mutations touchant, à la fois, ClC-Ka et ClC-Kb et entraîne des pertes de fonctions des canaux.

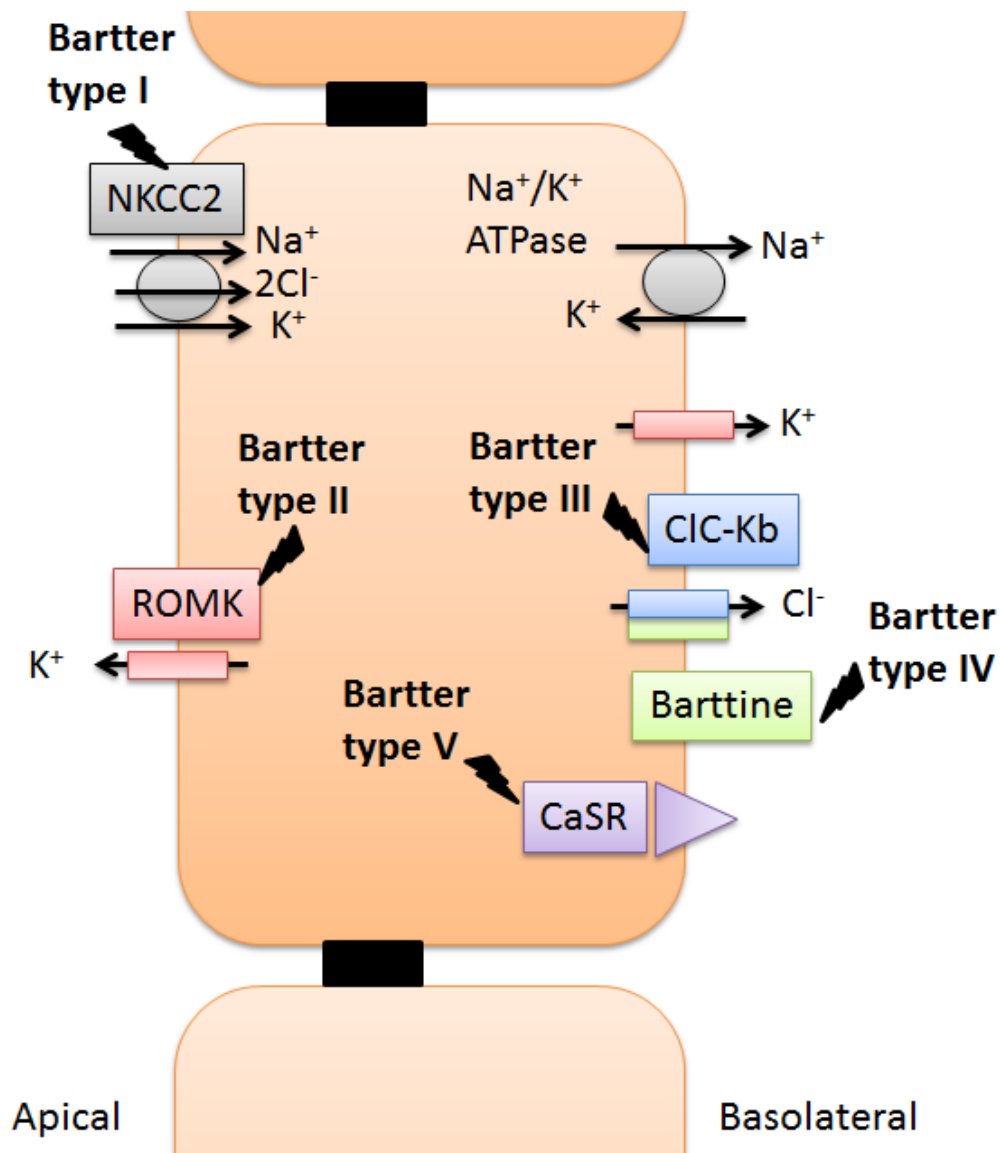


Figure 9 : Protéines impliquées dans les différents types de syndromes de Bartter.

Le syndrome de Bartter de type I provient de mutations du co-transporteur NKCC2, le type II de mutations du canal potassique apical ROMK, le type III de mutations du canal chlorure basolatéral ClC-Kb, le type IV de mutations de la barttine et le type V de mutations de récepteur au calcium CaSR.

Le dernier type de syndrome de Bartter, le type V, est attribué à des mutations du gène *CASR* codant pour le récepteur du calcium CaSR. Ces mutations sont de type gain de fonction. Ainsi, l'activation constitutive de ce récepteur à la membrane basolatérale de la TAL provoquerait une inhibition de NKCC2 et de ROMK [Hebert, 2003].

Certains patients porteurs de mutation pour le gène codant pour ClC-Kb présentent des caractéristiques du syndrome de Gitelman. Ce syndrome diffère du syndrome de Bartter par une hypomagnésémie et une hypocalciurie. Habituellement, ce syndrome est associé à des mutations du cotransporteur NCC de la membrane apicale des cellules du DCT, mais les données actuelles sur le ClC-Kb permettent de lui définir un rôle dans la réabsorption de NaCl par ce segment [Briet et al., 2006].

Aucune mutation du gène *CLCNKA*, codant ClC-Ka, n'a, à ce jour, été associée à une pathologie mais des études chez des souris invalidées pour ce canal gene ont mis en évidence l'apparition d'un diabète insipide néphrogénique [Matsumura et al., 1999]. Celui-ci est la conséquence d'un défaut de concentration de l'urine suite à des perturbations du gradient osmotique cortico-papillaire et à un défaut du transport de chlore dans la portion fine ascendante de l'anse de Henle, les cellules de ce segment possédant ClC-Ka sur la membrane basolatérale [Vandewalle et al., 1997] et possiblement aussi sur la membrane apicale [Uchida et al. 1995]

3- Propriétés électrophysiologiques des ClC-K

Les propriétés des canaux ClC-K ont pu être déterminées grâce à l'expression hétérologue dans l'ovocyte de xénope et dans des lignées cellulaires. Cependant, hormis ClC-K1 actif seul, ces canaux doivent être co-exprimés avec la barttine pour que l'on puisse observer des courants [Estévez et al., 2001 ; Waldeger et al., 2002 ; Scholl et al., 2006 ; Stöling et al., 2014]. Les courants des ClC-K sont amplifiés lors d'une augmentation de la concentration en Ca^{2+} (figure 10A) et du pH (figure 10B) extracellulaires et la barttine ne modifie pas le gating rapide des protopores mais semble plutôt moduler celui de la porte commune [Estévez et al., 2001 ; Gradogna et al., 2010 ; Martinez et al., 2008 ; Uchida et al., 1995 ; Waldegger et al., 2002, Andrini et al., 2014].

En 1990, Marc Paulais a pu décrire au laboratoire un canal de 40pS observé à la membrane basolatérale des cellules de la cTAL [Paulais et al. 1990]. Sa séquence de perméabilité

anionique est $\text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{NO}_3^- > \text{F}^-$. La séquence de perméabilité anionique est semblable à celle du ClC-K1 mais, à ce moment-là, les canaux ClC-K n'étaient pas décrits à l'échelon unitaire et donc les propriétés observées ne permettaient pas de conclure quant à la nature du canal. Plus tard, l'Hoste et collaborateurs ont pu mettre en évidence, sur des systèmes d'expression hétérologues, que les canaux ClC-K1/barttine de souris ont une conductance de 40pS et que ses propriétés électrophysiologiques sont proches de celle décrite pour le canal endogène suggérant fortement que ce canal est un ClC-K1 [l'Hoste et al. 2013].

Les séquences de perméabilités anioniques de ClC-Kb et ClC-Ka sont $\text{Cl}^- > \text{Br}^- \sim \text{NO}_3^- > \text{I}^-$ et $\text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{NO}_3^- > \text{I}^-$, respectivement [Waldegger et al., 2002]. La conductance unitaire du canal ClC-Ka/Barttine est de 26pS et celui du ClC-K1/barttine est de 33pS [Scholl et al., 2006 ; Fischer et al., 2010]. Par ailleurs, la barttine ne modifie pas l'amplitude des courants unitaires et la dépendance au voltage des ClC-K1 chez la souris [l'Hoste et al., 2013]. La conductance unitaire de ClC-Kb (K2) n'a pas encore été étudiée, mais des études menées par le laboratoire ont rapporté la présence de canaux chlorures de 10pS à la membrane basolatérale des cellules du DCT et des cellules intercalaires du CNT/CCD [Lourdel et al., 2003 ; Teulon et al., 2005 ; Nissant et al., 2004 ; Nissant et al., 2006]. Ces données montrent une séquence de perméabilité anionique, une sensibilité au Ca^{2+} (augmentation d'activité du canal en présence de 5mM de Ca^{2+} extracellulaire) et au pH extracellulaires (diminution de l'activité des canaux par les H^+) comparables à celles observées pour le complexe ClC-Kb (K2)/Barttine dans l'ovocyte de *Xenopus*. D'autres propriétés, qui n'ont pas encore été mises en évidence chez les ClC-Kb (K2) clonés, sont : une inhibition de l'activité par le PMA (un inhibiteur de la PKC), une absence de modulation de l'activité par l'AMPc et la PKA, une insensibilité de l'activité au Ca^{2+} intracellulaire et une sensibilité au pH intracellulaire (le canal s'active lors d'une alcalinisation).

L'ensemble de ces propriétés fait de ClC-K2 un candidat pour le canal natif de la membrane basolatérale des cellules du DCT et du CNT/CCD. Malgré tout, la caractérisation plus détaillée des propriétés électrophysiologiques de ce canal reste encore à être réalisée et en particulier l'influence du Ca^{2+} extracellulaire, du pH intra- et extracellulaire et leur influence sur la sensibilité au voltage du canal.

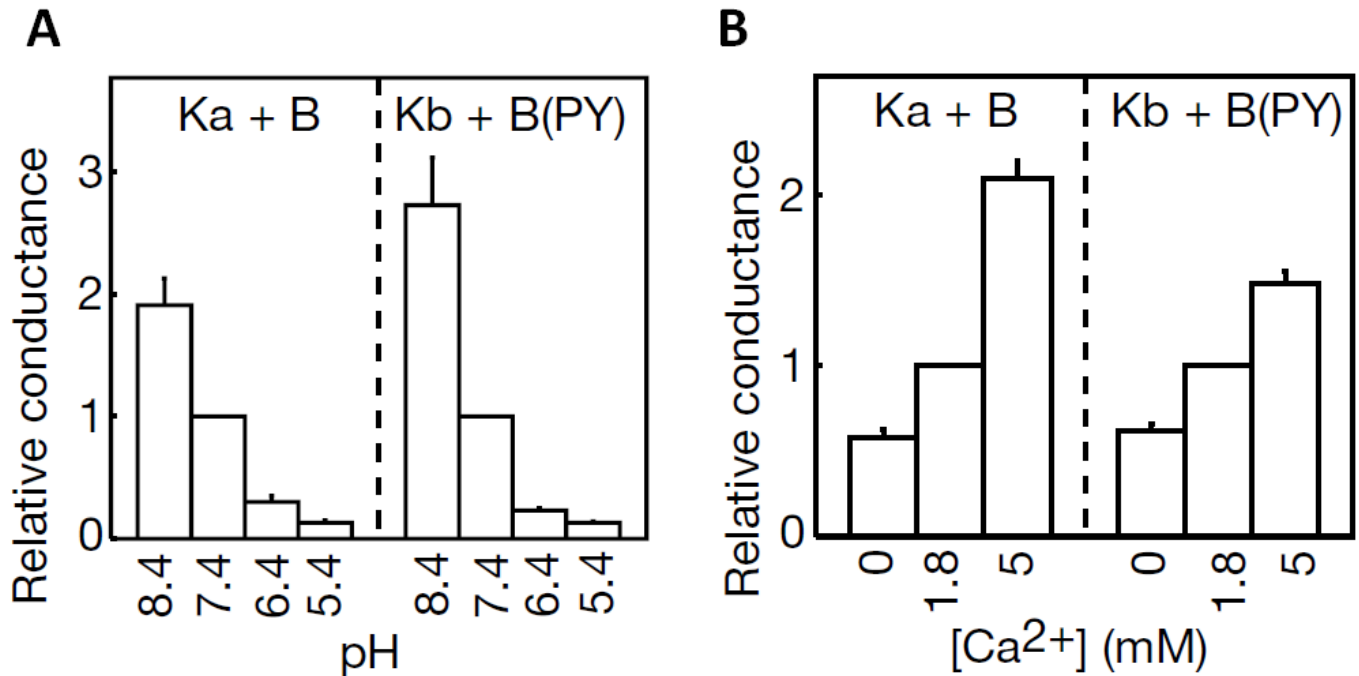


Figure 10 : Régulation des ClC-Ka et Kb par le pH (A) et le Ca²⁺ (B) extracellulaires (d'après Estévez et al., 2001). Le motif PY de la barttine a été muté afin de diminuer l'internalisation des complexes CLC-K/Barttine dépendant de l'ubiquitination.

- (A) Les conductances sous-tendues par les complexes ClC-Ka/barttine et ClC-Kb/barttine(PY) varient avec le pH.
- (B) Une élévation de la concentration extracellulaire en calcium augmente les conductances chlorure sous tendues par les complexes ClC-Ka/barttine et ClC-Kb/barttine(PY).

IV- Le rôle des canaux potassiques dans le rein

Au sein du néphron, les canaux potassiques jouent plusieurs rôles [Giebisch, 1998 ; Hebert et al, 2005 ; Giebisch et Wang, 1996 ; Wang W. 2004 ; Mauerer et al., 1998 ; Giebisch, 2001] :

- Ils permettent la génération du potentiel de membrane négatif.
- Ils sont impliqués dans la régulation du volume cellulaire.
- Ils participent au transport du potassium.
- Ils participent à la réabsorption du Na^+ en assurant le recyclage du potassium à travers les membranes apicales et basolatérales.

Le premier rôle des canaux potassiques (non spécifique au rein) est de participer au maintien de la différence de potentiel transmembranaire à une valeur très négative ($\sim -70\text{mV}$). Comme dit précédemment, cela permet l'établissement d'une différence de potentiel favorable à l'entrée de sodium dans la cellule ou à la sortie de chlore de la cellule. Toute modification de ce potentiel peut ainsi impacter le transport ionique par la voie transcellulaire mais également le transport de molécules telles que le glucose ou les acides aminés dont le transport est couplé à celui du sodium dans le PCT.

Le volume cellulaire peut fréquemment varier. C'est par exemple le cas lors de l'activation de transporteurs dépendants du sodium (comme le transporteur sodium-glucose), ce qui va modifier la concentration intracellulaire en sodium et ainsi modifier le volume cellulaire. Pour compenser ce phénomène, l'activation des canaux potassiques basolatéraux et apicaux et de la Na^+/K^+ -ATPase permettra à la cellule de retrouver un volume cellulaire normal en faisant sortir du potassium.

Les autres fonctions des canaux potassiques sont, quant à elles, plus spécifiques des épithéliums. Comme nous l'avons précédemment mentionné, les canaux potassiques apicaux des cellules principales du CCD (ROMK, BK) sont directement impliqués dans la sécrétion du potassium. C'est l'un des rares cas où ces canaux sont directement impliqués dans un transport transépithélial de potassium. Ils jouent cependant un rôle majeur dans la régulation du transport.

Il a été mentionné précédemment que pour maintenir constante la concentration intracellulaire de potassium en dépit d'un important flux entrant par la Na^+/K^+ -ATPase, le potassium est recyclé vers le compartiment extracellulaire via les canaux potassiques basolatéraux et/ou apicaux. De ce fait, les canaux potassiques basolatéraux doivent pouvoir s'adapter aux variations de transports transcellulaires des espèces ioniques. Des études comme celle de Muto et ses collaborateurs ont montré qu'il existait un couplage entre les canaux potassiques basolatéraux et la Na^+/K^+ -ATPase [Muto et al., 2003]. Dans le tubule proximal, un canal potassique basolatéral d'environ 25pS est sensible à l'ATP : son activité diminue lorsque la concentration intracellulaire en ATP augmente (de l'ordre du mM). En revanche, elle augmente en présence de faibles concentrations en ATP (de l'ordre de 200 μM) [Mauerer et al., 1998]. Ainsi, une augmentation du transport transcellulaire de NaCl conduirait à une activation de la Na^+/K^+ -ATPase et à une diminution locale de la concentration intracellulaire en ATP entraînant l'activation de ce canal potassique par une levée de son inhibition induite par une forte concentration en ATP intracellulaire. Un tel couplage a également été proposé dans le CCD mais celui-ci passerait par le NO (nitric oxide) qui permettrait *via* une voie GMP_c dépendante d'activer les canaux potassiques basolatéraux [Lu et al., 1996].

En conclusion, on peut établir que les canaux potassiques basolatéraux ne sont pas directement impliqués dans le transport transépithélial mais ils sont cependant susceptibles de moduler ce transport.

V- Les canaux potassiques du néphron

Mis à part le canal ROMK, l'intérêt pour les canaux potassiques rénaux, et en particulier les canaux potassiques basolatéraux et leur importance physiologique ne s'est réellement développé qu'à partir de la fin des années 2000 avec notamment les études sur les patients atteints du syndrome SeSAME/EAST dont l'origine se trouve dans des mutations du gène codant pour le canal Kir4.1. Aujourd'hui, beaucoup d'études se concentrent sur la caractérisation des propriétés électrophysiologiques et régulatrices des canaux en expression hétérologue mais très peu s'intéressent à leur fonction physiologique au niveau rénal [Sepulveda et al., 2015]. Nous nous intéresserons dans ce chapitre essentiellement aux différents canaux potassiques moléculairement identifiés le long du tubule rénal et leur rôle

éventuel au niveau du rein en insistant particulièrement sur la famille des canaux à rectification entrante Kir.

Il existe au total trois grandes classes structurales de canaux potassiques, définies d'après leur homologie de séquence. Nous retrouvons ainsi la classe des canaux à six domaines transmembranaires (figure 11), la classe des canaux à double pore et à 4 domaines transmembranaires (figure 12) et la classe des canaux à deux domaines transmembranaires (figure 15).

1- La famille des canaux potassiques à six domaines transmembranaires.

La grande majorité des canaux potassiques de cette famille est essentiellement exprimée dans le cœur, le cerveau et le muscle strié squelettique, mais Slo1.1 (ou Maxi K ou BK pour « Big K⁺ »), KCNA10 (K⁺ Cyclic Nucleotide Activated 10) et KvLQT1 (K⁺ voltage-gated long QT1), sont aussi présents dans le rein [Hebert et al., 2005]. Ces canaux doivent s'associer en tétramères pour être fonctionnels. La représentation schématique des canaux de cette famille est donnée en figure 11-A et celle particulière des maxi-K est donnée en figure 11-B.

Le canal Slo1 a été cloné en 1994 à partir de cerveau humain par Tseng-Crank et collaborateurs [Tseng-Crank et al., 1994]. Ce même groupe a démontré par Northern blot la présence de ce canal dans le rein de l'Homme et de la souris. Les propriétés essentielles de ce canal sont sa dépendance au voltage et sa sensibilité au calcium intracellulaire [Salkoff et al., 2006 ; Cui et al., 1997]. Sa conductance unitaire est d'environ 200-300pS [Hebert et al., 2005]. Ce canal a été retrouvé chez l'Homme à l'aide de la technique du patch-clamp sur la membrane apicale des cellules du tubule proximal en culture primaire [Hirano et al., 2001; Hirano et al., 2002], de la TAL et du CCD [Hebert et al. 2005]. Dans le PCT, ce canal présente une très faible probabilité d'ouverture et est activé par un stress mécanique et une dépolarisation. Ainsi, dans des conditions physiologiques, il ne participerait pas au maintien du potentiel de membrane mais pourrait jouer un rôle dans la stabilisation du potentiel de membrane apicale lors d'une réabsorption massive de Na⁺ qui aurait tendance à dépolariser la membrane [Hebert et al. 2005]. Au niveau de la TAL et du CNT/CCD, ses propriétés restent les mêmes mais il a été proposé qu'il jouerait un rôle dans la régulation du volume cellulaire dans le cas de stress mécanique [Hebert et al., 2005] et également dans la sécrétion de potassium [Frindt et al. 2004, Bailey et al. 2006]. Néanmoins, sa présence n'a jamais été montrée dans la TAL native, mais uniquement sur une lignée cellulaire de TAL médullaire en

culture

[Guggino

et

al.,

1987].

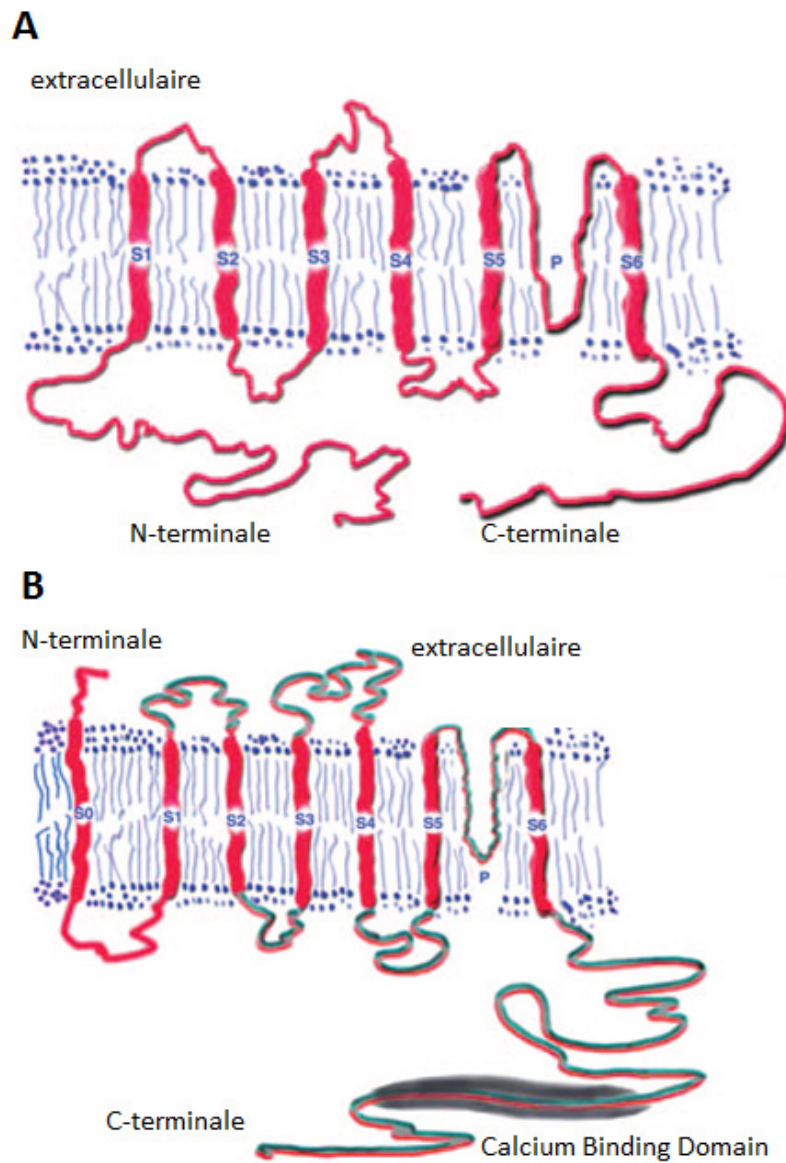


Figure 11: Représentation schématique de la structure des canaux à 6 domaines transmembranaires (DT) [d'après Hebert et al. 2005].

- A. Représentation schématique d'un canal à 6 DT dont les extrémités N et C-terminales sont intracellulaires.
- B. Représentation schématique d'un canal Maxi K. Il possède la même structure que les autres canaux de cette famille avec en plus un segment S₀ qui lui confère la propriété d'avoir sa partie N-terminale extracellulaire. L'extrémité C-terminale comporte un domaine de liaison au calcium.

Le canal *KCNA10* (Kv1.8) possède un site de liaison pour les nucléotides cycliques et présente une faible conductance d'environ 10pS [Lang et al., 2000]. Il est activé lors d'une dépolarisation et présente une activité dans les cellules non excitables. Des études d'immunohistochimie ont permis de le localiser dans le glomérule et la membrane apicale du tubule proximal de rat [Yao et al., 2002]. Tout comme le canal maxi K, Kv1.8 participerait au maintien du potentiel de membrane apical dans les cellules du PCT lors d'une augmentation de la réabsorption du Na⁺ [Hebert et al., 2005].

Le canal KvLQT1 est un canal pouvant s'associer à des sous-unités régulatrices KCNE qui sont au nombre de cinq. Cette association confère au canal des propriétés différentes de celles des homotétramères [Panaghie et al., 2006]. Le canal et la sous-unité KCNE1 sont présents à la membrane apicale du PCT de souris et de rat [Demolombe et al., 2001 ; Sugimoto et al., 1990]. Des études d'hybridation *in situ* ont permis de colocaliser KvLQT1 et KCNE1 dans les cellules du DCT [Demolombe et al., 2001]. Il participerait également au maintien du potentiel de membrane de ces cellules.

Il a également été démontré par la suite au laboratoire par Marc Paulais la présence du canal Slo2.2 sur la membrane basolatérale de la TAL de souris [Paulais et al., 2006]. Ce canal, jusqu'alors uniquement observé sur les membranes de cellules excitables, présente une conductance d'environ 150pS, est régulé par le Na⁺ et le Cl⁻ intracellulaires et participerait à l'établissement de la conductance potassique basolatérale de la TAL.

2- Les canaux potassiques à quatre domaines transmembranaires et à double pore.

A l'origine, ce groupe de canaux a été découvert suite à des études dans les bases de données ADN du motif codant pour le pore des canaux potassiques. Cela a permis de découvrir un canal possédant deux motifs de pore chez la levure *Saccharomyces Cerevisiae* [Ketchum et al., 1995]. De nombreux canaux de ce groupe sont présents dans le rein [Levy et al., 2004 ; Hebert et al., 2005] bien que leur localisation apicale ou basolatérale soit encore à déterminer. La structure de ces canaux est représentée sur la figure 12.

a. La famille TASK (*TWIK-related Acid Sensitive K+*)

La famille des TASK compte 5 membres numérotés de 1 à 5. Les membres 1 à 3 ont pu être identifiés dans le rein par des études de Northern blot et de RT-PCR [Reyes et al., 1998 ; Warth et al., 2004]. Cependant, la localisation exacte des TASK 1 et 3 demeure

imprécise. Il a toutefois été décrit un rôle de TASK1 dans des phénomènes d'hypertension artérielle pulmonaire [Ma et al., 2013] et de TASK3 dans des cas d'hyperaldostéronisme néonatal chez des souris invalidées pour le canal [Bandulik et al., 2013], suggérant ainsi la présence de ce canal dans les glandes surrénales. TASK2, quant à lui, a été décrit dans le PCT suite à des études sur des cultures primaires de cellules de PCT de souris [Warth et al., 2004 ; Barriere et al., 2003] et dans le DCT et le CDD chez l'Homme [Reyes et al., 1998].

Ces canaux sont à rectification entrante sont sensibles aux variations de pH extracellulaire (ils sont activés par une alcalinisation du milieu extracellulaire) [Reyes et al., 1998 ; Kim et al., 2000 ; Lesage et al., 2000 ; Barriere et al., 2003 ; Morton et al., 2005]. Longtemps considérés comme uniquement sensibles au pH extracellulaire, il s'est récemment avéré que TASK2, mais pas TASK1 et TASK3, est aussi sensible au pH intracellulaire [Niemeyer et al. 2010]. Il a par ailleurs été montré que TASK2 possède une conductance d'environ 60pS [Reyes et al., 1998] et est activé suite à une augmentation du volume cellulaire [Warth et al., 2004 ; Barriere et al., 2003]. Une étude sur des souris invalidées pour TASK2 a également permis de démontrer que ce canal jouerait également un rôle important dans la réabsorption du bicarbonate *via* le cotransporteur $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ et qu'il canal serait même régulé indirectement par le bicarbonate puisque son absence provoque une perte de sodium et d'eau non compensée par les segments distaux du néphron [Warth et al., 2004]. L'hypothèse émise est qu'en l'absence de TASK2, l'activité de la Na^+/K^+ -ATPase se trouve diminuée, entraînant une réduction de l'entrée apicale de sodium et donc de la sortie de protons nécessaire à la formation du bicarbonate. Il n'a, cependant, toujours pas été prouvé que le bicarbonate pouvait modifier localement le pH extracellulaire au voisinage des cellules proximales et ainsi modifier l'activité de TASK2.

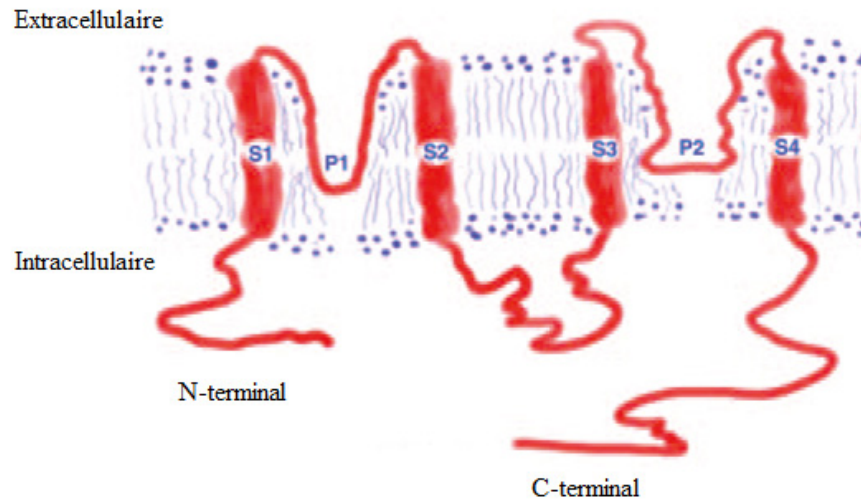


Figure 12 : Représentation schématique de la structure des canaux à quatre domaines transmembranaires et à double pore [d'après Hebert et al., 2005].

Les domaines S1 et S2 forment les deux segments transmembranaires entourant le premier pore P1. Les segments S3 et S4 sont les deux segments transmembranaires entourant le second pore P2.

b. Les autres canaux à quatre domaines transmembranaires et à double pore

Il existe un autre groupe de canaux à quatre domaines transmembranaires et à double pore appelés TWIK. TWIK-1, le premier canal de ce groupe à avoir été identifié a été trouvé dans les reins humains et murins suite à des études par Northern blot [Lesage et al., 1996 ; Orias et al., 1997] et chez le rat par Western blot [Cluzaud et al., 1998]. Des études d'immunofluorescence chez le rat ont permis de le localiser sur les membranes apicales des cellules du PCT, du DCT et du CCD [Cluzaud et al., 1998]. Ses propriétés électrophysiologiques sont proches de celles des canaux potassiques à rectification entrante (cf partie IV-3). Des études sur des souris invalidées pour ce canal ont montré qu'il participe à la réabsorption du phosphate au niveau du PCT [Nie et al. 2005] et au maintien du potentiel de membrane au niveau des cellules principales du CCD [Millar et al. 2006]. Le canal TWIK-2, quant à lui, ne serait présent que dans les glomérules et possède une rectification entrante [Chavez et al., 1999]. Une étude récente a montré que l'invalidation de TWIK-2 chez la souris, entraîne une augmentation de la pression artérielle avec une augmentation de la résistance des vaisseaux périphérique et cela malgré une fonction cardiaque normale [Lloyd et al. 2013].

Il existe un dernier groupe de canaux à double pore appelé THIK et qui comporte 2 membres : THIK-1 et 2. La localisation rénale de ces deux canaux a été trouvée en 2008 suite à des études d'immunohistochimie chez la souris [Theilig et al., 2008]. Il apparaît ainsi que THIK-1 est situé sur la membrane apicale des cellules du PCT et des cellules principales du CNT et du CCD. THIK-2, lui, a été détecté sur la membrane apicale des cellules de la TAL, du DCT et des cellules intercalaires du CNT et du CCD.

3- Les canaux potassiques à deux domaines transmembranaires

Les canaux de ce groupe forment la famille des canaux potassiques à rectification entrante Kir [Jan et al., 1997 ; Hebert et al., 2005 ; Hibino et al., 2010]. Cette famille comporte sept sous-familles appelées Kir1 à Kir7. Parmi ces canaux se trouve notamment le canal ROMK (ou Kir1.1). Il est admis que tous les Kir présentent une structure similaire à celle de ROMK (figure 13) et s'assemblent en homo- ou hétérotétramères pour former des canaux fonctionnels [Hibino et al., 2010]. Il est toutefois important de mentionner que contrairement au canal ROMK, l'étude de la régulation et du rôle physiologique des autres Kir n'est pas un domaine qui a été très étudié jusqu'à ces dernières années avec notamment la découverte

d'une pathologie impliquant les canaux potassiques basolatéraux Kir4.1 (cf 3-f).

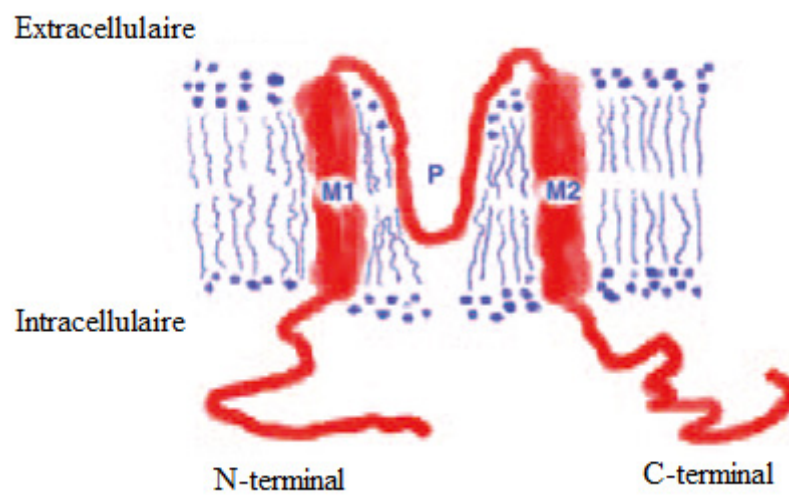


Figure 13 : Représentation schématique de la structure d'un canal Kir monomérique [d'après Hebert et al., 2005].

Les domaines M1 et M2 correspondent aux 2 domaines transmembranaires caractéristiques des canaux KIR et le P représente le pore.

a. Kir1.1 (ROMK)

Le canal ROMK aussi appelé Kir1.1 a été le premier membre de cette famille à avoir été cloné [Ho et al., 1993]. Les travaux sur ce canal étant très nombreux et nous avons mentionné précédemment son importance au niveau rénal et en particulier pour le bon fonctionnement de la TAL (Cf partie III-2), nous nous limiterons donc, ici, à décrire ses principales propriétés.

Comme mentionné précédemment, ROMK s'associe en homotétramère pour former un canal fonctionnel. Des études d'expression hétérologue sur l'ovocyte de xénope ont permis de déterminer que ce canal possède une conductance d'environ 35pS pour les courants entrants (potentiel de membrane négatif) et il présente une rectification entrante faible en comparaison d'autres membres de la famille Kir. Il s'exprime dans le rein exclusivement du côté apical des cellules de la TAL, du DCT et des cellules principales du CNT, CCD et OMCD [Mennitt et al., 2000 ; Boim et al., 1995 ; Tanemoto et al., 2000, Hebert et al., 2005 ; Hibino et al., 2010]. Son identité dans ces segments n'a pu être déterminé qu'à partir de l'étude des souris invalidées pour le canal [Lu et al., 2002].

Comme tous les autres Kir, il est sensible aux variations de pH intracellulaire. Il est inhibé dans le cas d'une acidification [Giebisch et al., 2001 ; Hibino et al., 2010] et est bloqué par des inhibiteurs non spécifiques des Kir : le Ba^{2+} et le Cs^+ . Le canal a été décrit comme inhibé par l'ATP intracellulaire en présence du CFTR mais ces résultats sont discutés [Lu et al., 2006]. Il faut noter la présence d'un site de liaison à l'ATP à l'extrémité C-terminale mais le rôle fonctionnel de cette régulation n'a toujours pas été clairement établi [Hibino et al., 2010 ; Ho et al., 1993].

b. Les Kir 2.x

Le premier membre de ce groupe à avoir été identifié a été cloné à partir de macrophages de souris et a été appelé IRK1 [Kubo et al., 1993]. Par la suite, d'autres Kir2 ont été identifiés par homologie de séquence et le groupe compte aujourd'hui trois autres membres partageant environ 63% d'homologie avec Kir2.1. A l'origine, il était établi que chaque Kir2 formait un canal fonctionnel constitué d'homotétramères mais on sait aujourd'hui que chaque Kir2 peut s'associer avec un autre Kir2 pour former un hétérotétramère fonctionnel et avec des propriétés différentes des homomères [Preisig-Muller et al., 2002]. Il a même été établi que Kir2.1 pouvait s'associer avec d'autres sous-unités Kir, tel Kir5.1 qui régule négativement l'activité du Kir2.1 rénal [Derst et al., 2001].

Dans le rein humain, les canaux Kir2.1 sont exprimés dans le glomérule et les cellules du PCT (données de RT-PCR) [Derst et al., 2001], cependant son rôle n'est à ce jour pas connu. Kir2.2 serait quant à lui exprimé dans les cellules juxtaglomérulaires de rat (données de RT-PCR) [Leichtle et al., 2004]. Des études similaires ont permis de supposer la présence de Kir2.3 dans les cellules principales du CCD de souris [Millar et al., 2006] alors que celle de Kir2.4 reste inconnue. Ce sont des canaux potassiques à rectification entrante forte. Kir2.1 possède une conductance de 23pS [Kubo et al., 1993] et est insensible aux variations de pH intracellulaire [Dahlmann et al., 2004].

c. Kir3.x

Les Kir3 forment un groupe de canaux régulés par les protéines G trimériques et sont activés par le GTP intracellulaire. Il existe quatre membres dans ce groupe numérotés de 1 à 4. Le canal Kir3.4 est le seul à avoir été retrouvé dans le rein par Northern blot [Chan et al., 1996]. Il ne génère pas de courant s'il est exprimé seul dans l'ovocyte de xénope mais il abolit en revanche les courants générés par Kir4.1 s'il est co-exprimé avec ce dernier et va l'entraîner vers une dégradation [Tucker et al., 1996]. Les autres membres des Kir3 sont plutôt retrouvés dans le cerveau et le cœur [Hibino et al., 2010].

d. Kir7.1

Kir7.1 est actuellement le seul membre de son groupe. Il a été cloné pour la première fois en 1998 à partir de cerveau humain [Krapivinsky et al., 1998]. Il est supposé fonctionner en tétramère comme les autres Kir. Aucune donnée n'a cependant été rapportée sur la possibilité de formation d'un hétérotétramère entre cette sous-unité et un autre Kir. Il possède une très faible conductance d'environ 50fS [Krapivinsky et al., 1998] ce qui rend impossible d'enregistrer son activité en patch-clamp *via* la méthode du canal unitaire. Une étude d'expression hétérologue a toutefois permis de montrer que Kir7.1 est bloqué par le baryum et le césium de façon dose dépendante [Krapivinsky et al., 1998]. Cette inhibition a également été montrée par voltage clamp dans l'ovocyte de xénope [Doring et al., 1998]. Des études d'immunohistochimie ont permis de localiser Kir7.1 dans la membrane basolatérale des cellules du PCT, de la TAL, du DCT et des cellules principales du CCD, de l'OMCD et de l'IMCD [Derst et al. 2001]. Il jouerait un rôle dans l'excrétion du K^+ [Suruki et al., 2003] et le maintient de l'activité de la Na^+/K^+ ATPase *via* la mise en recirculation du potassium intracellulaire [Hibino et al., 2010, Sepulveda et al., 2015]. La découverte de mutations récessives du gène KCNJ13, codant pour Kir7.1, chez des patients atteints du syndrome

d'amaurose congénitale de Leber, une maladie de la rétine, a permis de mettre en évidence l'importance de Kir7.1 dans le développement de la rétine et le bon fonctionnement des cellules rétinienne [Sergouniotis et al. 2011].

e. Kir6.x ou KATP

Le groupe des canaux Kir6 comprend deux membres : Kir6.1 et Kir6.2. Kir6.1 appartient à la classe des canaux potassiques ATP_i-dépendants (ou K_{ATP}). Des études menées chez l'ovocyte de xénope ont montré que ces canaux ne peuvent générer de courant qu'en présence des sous-unités régulatrice SUR (Sulfonylurea Receptor) [Seino S., 1999]. Kir6.2 quant à lui serait important pour les fonctions de sécrétion de l'insuline par le pancréas [Hibino et al., 2010]. Kir6.2 présente une conductance entrante d'environ 80pS alors que celle de Kir6.1 est plus proche des 30pS. La rectification chez les canaux Kir est une propriété induite par la présence de Mg²⁺ intracellulaire ou des polyamines [Hibino et al., 2010]. Ils sont régulés par l'ATP intracellulaire qui inhibe l'activité du canal tant qu'il est lié à celui-ci. En présence de Mg²⁺ intracellulaire, celui-ci va entrer en compétition avec l'ATP et ainsi permettre de maintenir l'activité du canal [Ashcroft F et al., 1989]. Il faut cependant souligner que cette propriété n'a été observée qu'au niveau des cellules pancréatiques. La présence de Kir6.1 dans le rein n'est pas clairement définie. Il a été montré que les ARNm codant pour Kir6.1 se trouvaient dans le PCT chez le lapin [Brochiero et al., 2002] cependant aucune donnée de western-blot n'a permis de confirmer la présence protéique de Kir6.1. Pour Kir6.2, il n'existe aucune donnée démontrant sa réelle présence dans le rein.

Parmi les trois sous-unités SUR, seule SUR2B est exprimée dans le rein. Des expériences d'immunohistochimie menées chez le rat et la souris ont permis de localiser cette sous-unité dans le PCT, la TAL, le DCT et le CCD [Beesley et al., 1999]. Il a ainsi été proposé, en raison de la co-localisation de Kir6.1 et de SUR2B dans le PCT, que le complexe Kir6.1/SUR2B correspondrait au K_{ATP} qui a pu être observé dans le PCT de lapin dans l'étude de Beesley. Par ailleurs une étude récente propose l'hypothèse que le complexe Kir6.1/SUR2B jouerait un rôle important dans les phénomènes de protection de l'endothélium glomérulaire et de l'épithélium tubulaire rénal [Zhao Y et al. 2012].

f. Kir4.x et Kir 5.1

Le groupe des canaux Kir4.x comporte deux membres appelés Kir4.1 et Kir4.2.

Le canal Kir4.1a été initialement cloné en 1994 à partir du cerveau de rat [Bond et al., 1994]. De ce fait, ce canal a longtemps été considéré comme un canal potassique majeur pour le

fonctionnement neuronal et en particulier au niveau des cellules gliales ce qui lui a valu de nombreux noms : BIR10, K_{AB-2} Birk-1 ou encore Kir1.2. Il est codé par le gène *KCNJ10* et possède environ 40% d'homologie avec Kir2.1 et Kir3.1 et 50% avec Kir1.1 (ROMK) d'où son ancien nom de Kir1.2 [Hibino et al., 2010]. Lorsqu'il est exprimé seul, le canal Kir4.1 homotétramérique [Hibino et al. 2004] présente une conductance d'environ 25pS, une probabilité d'ouverture (P_o) forte (environ 0,9) et n'est pratiquement pas régulé par le pH intracellulaire pour des valeurs aux environs de 7.4 [Pessia et al., 2001] (figure 14). Les canaux Kir4.1 sont bloqués par le Ba^{2+} et le Cs^+ extracellulaires et peuvent être soit activés par l'ATP intracellulaire après le « rundown » du canal [Takumi et al., 1995], soit inhibés par celui-ci si le canal est encore actif [Bredt et al., 1995].

Kir5.1 (anciennement connu sous le nom de BIR9 et codé par le gène *KCNJ16*) est classiquement considéré comme une sous-unité régulatrice notamment lors de son association avec Kir4.1 ou Kir4.2 où il modifie la conductance unitaire et la sensibilité au pH intracellulaire de ces canaux (figure 14). Les propriétés du canal Kir4.1/Kir5.1 ont été étudiées sur des cellules en cultures du type HEK293T. Ainsi il a été montré que ce canal présente une conductance d'environ 45-50pS, est inhibé par le Ba^{2+} extracellulaire et possède une sensibilité aux variations de pH intracellulaire dans le domaine physiologique (Figure 14) [Tanemoto et al., 2000].

Bien que de nombreuses études aient démontré que l'expression des seules unités Kir5.1 dans des systèmes hétérologues n'induisent pas de courant potassique, une étude indique que les homotétramères Kir5.1 seraient fonctionnels au niveau du cerveau lorsqu'ils sont co-exprimés avec la protéine PSD-95 (Post-Synaptic Density 95) [Tanemoto et al., 2002].

La localisation rénale de Kir4.1 et Kir5.1 est aujourd'hui clairement établie dans le tubule distal. En effet, dans le DCT, le groupe de Jacques Teulon a pu identifier au laboratoire par patch-clamp un canal potassique présent à la membrane basolatérale des cellules de la TAL [Paulais et al., 2002] et du DCT [Lourdel et al., 2002] et possédant les propriétés du canal Kir4.1/Kir5.1 exprimé dans l'ovocyte de *Xenopus* (conductance de 45pS, sensibilité au pH intracellulaire). Des expériences d'immunohistochimie ont également permis de confirmer la présence de Kir4.1 dans la membrane basolatérale des cellules du DCT [Lourdel et al., 2002]. Par la suite, des expériences similaires menées au laboratoire ont également permis de démontrer la présence des canaux Kir4.1/Kir5.1 dans la membrane basolatérale des cellules principales du CCD [Lachheb et al., 2008]. Des données préliminaires provenant du

laboratoire montrent également la présence d'un canal potassique aux propriétés similaires dans la membrane basolatérale des cellules principales du CNT. Il a récemment été montré que le canal Kir4.1/Kir5.1 était régulé par des kinases de la famille des Src au niveau du DCT1 [Zhang C et al., 2013]. Ces kinases agiraient sur un résidu tyrosine en position 9 de la protéine Kir4.1 et influerait ainsi d'après les auteurs sur l'activité du canal Kir4.1/Kir5.1 et donc sur le transport membranaire du DCT1. Une autre étude a montré un rôle de la dopamine dans la régulation des canaux Kir4.1/Kir5.1. En effet, elle entrainerait en se liant à un récepteur « D2-like », une cascade de signalisation aboutissant à la libération de PKC, connue pour inhiber le canal [Rojas A et al., 2007], au niveau des cellules principales du canal collecteur. Cela provoque une dépolarisation de la membrane plasmique et de ce fait, une diminution de la forme motrice favorable à la réabsorption transépithéliale de sodium [Zaika OL et al., 2013].

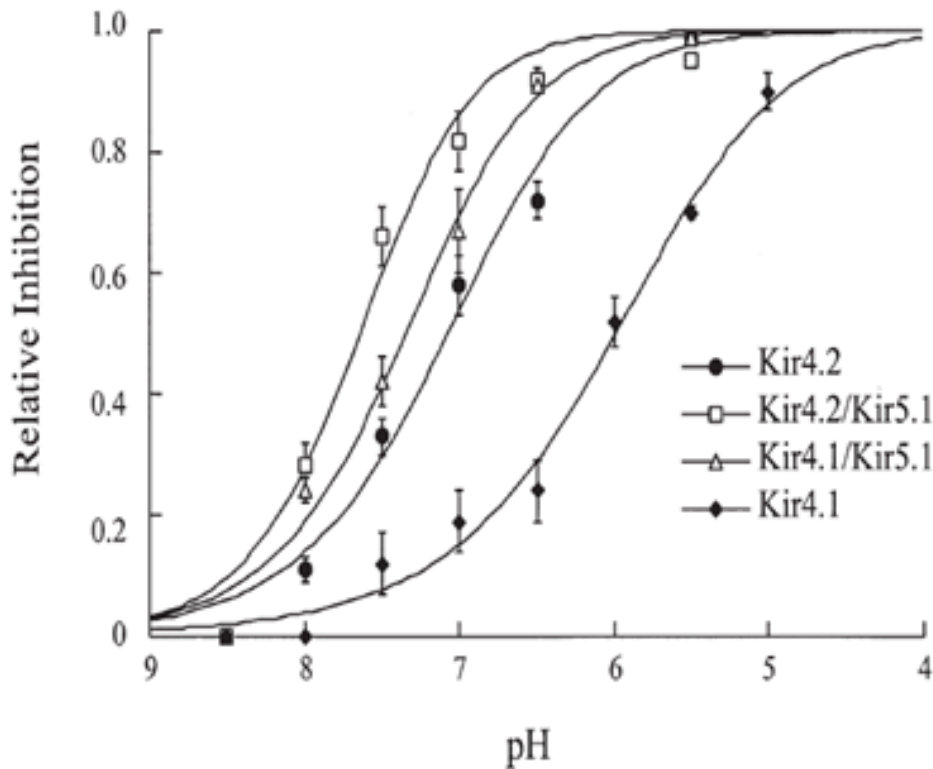


Figure 14 : Sensibilité aux variations de pH intracellulaire des sous-unités Kir4.1, Kir4.2 et des hétéromères Kir4.x/Kir5.1 [d'après Pessia et al. 2001].

L'inhibition relative des canaux est représentée en fonction du pH intracellulaire. Les mesures ont été réalisées chez l'ovocyte de xénope à l'aide de la technique du patch-clamp en configuration « inside-out ». Le canal Kir4.1(◆) n'est que très peu sensible aux variations de pH aux alentours du pH physiologique 7.4 (pKa ~ 6). En revanche, sa sensibilité est modifiée lors de son association avec Kir5.1 (Δ). Cette association va augmenter la sensibilité au pH de Kir4.1 pour des variations autour du pH de 7.4 un intervalle physiologique (pKa ~ 7.35). Une même observation est possible dans une moindre mesure pour le canal Kir4.2 seul (●) qui présente un pKa ~ 7.07, alors que le canal Kir4.2/Kir5.1 (□) présente quant à lui un pKa ~ 7.64.

Le canal Kir4.2, quant à lui, a été cloné en 1997 à partir de rein humain [Shuck et al., 1997]. Il est codé par le gène *KCNJ15*. Lorsqu'il est exprimé seul, il peut former des homotétramères ayant une conductance d'environ 25pS, une P_o forte ($P_o > 0,9$) et est sensible aux variations de pH intracellulaire ($pK_a \sim 7.1$) [Pearson et al., 1999 ; Pessia et al., 2001] (figure 14). Lors de l'association de Kir4.2 avec Kir5.1, on obtient un hétérotétramère qui présente des propriétés différentes de celles des homotétramères. Le canal possède une conductance d'environ 50-55pS, une P_o plus faible ($P_o < 0,3$) et une sensibilité au pH intracellulaire modifiée ($pK_a \sim 7.6$) [Pessia et al., 2001 ; Lam et al., 2006 ; Hung et al., 2006 ; Edvinsson et al., 2011]. La localisation intrarénale précise de Kir4.2 n'a jamais été déterminée mais son expression protéique dans le rein entier a été démontrée [Huang et al., 2007 ; He et al., 2011]. Par ailleurs, le laboratoire possède des données préliminaires d'expression des ARNm codant pour Kir4.1, Kir5.1 et Kir4.2 (cf partie résultat). Elles montrent une localisation exclusivement distale de Kir4.1 et une localisation exclusivement proximale de Kir4.2. En revanche, Kir5.1 se retrouverait dans l'ensemble des segments du néphron.

Les fonctions physiologiques des canaux Kir4.1/Kir5.1 retrouvés majoritairement à la membrane basolatérale des cellules du néphron distal, ainsi que l'importance de chaque sous-unité dans le complexe Kir4.1/Kir5.1, sont aujourd'hui clairement établies suite à l'étude poussée d'une pathologie humaine (le syndrome SeSAME/EAST dû à des mutations du gène *KCNJ10*) et de souris invalidées (KO Kir4.1 ou Kir5.1) (cf partie IV-4). Ces canaux participent activement au recyclage du potassium entré au pôle basolatéral par la Na^+/K^+ -ATPase et assurent ainsi le bon fonctionnement des mécanismes de transports, notamment la réabsorption du NaCl [Hebert et al., 2005 ; Hibino et al., 2010]. Par ailleurs, il a été récemment montré que Kir4.1 permettrait de réguler l'expression apicale du cotransporteur NCC car son absence (souris KO) entraîne l'inhibition d'une kinase (Ste20-related proline-alanine kinase) responsable de l'expression apicale de NCC [Zhang et al., 2014].

Peu d'informations sont en revanche disponibles concernant les fonctions physiologiques des canaux Kir4.2 et Kir4.2/Kir5.1. Des études récentes ont montré l'implication de Kir4.2 dans l'inhibition de la sécrétion de l'insuline lors de diabète de type II dans la population japonaise [Okamoto et al., 2012 ; Mathews et al., 2012]. Par ailleurs, ce canal jouerait un rôle dans la migration cellulaire lorsque les cellules expriment la $\alpha 9\beta 1$ intégrine [deHart et al., 2008]. Le rôle et l'importance physiologique de Kir4.2 dans le rein sont aujourd'hui totalement

inconnus. La détermination de ses fonctions physiologiques a fait l'objet d'une partie des travaux réalisés au cours de cette thèse.

Les canaux potassiques mentionnés dans cette partie et leurs principales caractéristiques sont résumés dans le tableau 1. Leur localisation en fonction de l'espèce est résumée dans le tableau 2.

Canal	Nom du gène	Conductance (pS)	Rectification	Sensibilité au pH intracellulaire	Sensibilité diverses	sous-unités régulatrices connues	
Canaux potassiques à 6 domaines transmembranaires							
Slo1	<i>KCNMA1</i>	150-200	-	?	Voltage, [Ca ²⁺] _i	BK-β	
KCNA10	<i>KCNA10</i>	10	Entrante	?	Voltage	?	
KvLQT1	<i>KCNQ1</i>	8	Entrante	?	Voltage	KCNE	
Canaux potassiques à 4 domaines transmembranaires et à double pore							
TASK-1	<i>KCNK3</i>	16	Entrante	non	pHe	?	
TASK-2	<i>KCNK5</i>	60	Entrante	non	pHe - TPA	?	
TASK-3	<i>KCNK9</i>	30	Entrante	non	pHe	?	
TWIK-1	<i>KCNK1</i>	35	Entrante	oui	[Ba ²⁺] - PKC - quinidine	?	
TWIK-2	<i>KCNK6</i>	?	Entrante	oui	[Zn ²⁺] _i - PKC	?	
THIK-1	<i>KCNK13</i>	?	Entrante	non	pHe - acide arachidonique	?	
THIK-2	<i>KCNK12</i>	Inactif seul					?

Tableau 1 (début): Nomenclature et caractéristiques des principaux canaux potassiques étudiés [d'après Lachheb 2007].

Canal	Nom du gène	Conductance (pS)	Rectification	Sensibilité au pH intracellulaire	Sensibilité diverses	sous-unités régulatrices connues	
Canaux potassiques à 2 domaines transmembranaires							
Kir1.1	<i>KCNJ1</i>	35	Entrante	oui	[Ba ²⁺] - [Cs ⁺]	SUR	
Kir2.1	<i>KCNJ2</i>	15	Entrante	non	[Ba ²⁺] - [Cs ⁺]	Kir5.1	
Kir3.4	<i>KCNJ5</i>	Inactif seul					KCNE
Kir4.1	<i>KCNJ10</i>	25	Entrante	oui	[Ba ²⁺] - [Cs ⁺] - ATPi	Kir3.4 - Kir5.1	
Kir4.2	<i>KCNJ15</i>	25	Entrante	oui	[Ba ²⁺] - [Cs ⁺]	Kir5.1	
Kir5.1	<i>KCNJ16</i>	Inactif seul sauf si exprimé avec PSD95					Kir4.1 - Kir4.2 - Kir2.1 - PSD95
Kir4.1/Kir5.1	-	50	Entrante	oui	[Ba ²⁺] - [Cs ⁺]	-	
Kir4.2/Kir5.1	-	50	Entrante	oui	[Ba ²⁺] - [Cs ⁺]	-	
Kir6.1	<i>KCNJ8</i>	70	Entrante	?	[Ba ²⁺] - [Cs ⁺]	SUR	
Kir7.1	<i>KCNJ13</i>	0,05	Entrante	?	[Ba ²⁺] - [Cs ⁺]	?	

Tableau 2 (fin): Nomenclature et caractéristiques des principaux canaux potassiques étudiés [d'après Lachheb 2007].

Canal	Localisation								Espèce
	Glom	PCT	MTAL	CTAL	DCT	CNT	CCD	OMCD	
Canaux potassiques à 6 domaines transmembranaires									
Slo1	?	oui	oui	oui	?	oui	oui	?	Homme, souris
Slo2.2	non	non	oui	oui	Non	non	non	non	souris
KCNA10	oui	oui	non	non	Non	non	non	non	Rat
KvLQT1	non	oui	non	non	oui	non	oui	non	Homme, Rat, Souris
Canaux potassiques à 4 domaines transmembranaires et à double pore									
TASK-1	?	?	?	?	?	?	?	?	Homme
TASK-2	non	oui	non	oui	oui ?	non	oui	non	Homme, souris
TASK-3	?	?	?	?	?	?	?	?	Rat
TWIK-1	non	oui	non	non	oui	?	oui	?	Homme, souris, rat
TWIK-2	oui	non	non	non	non	non	non	non	Homme, souris
THIK-1	non	oui	non	non	non	oui	oui	non	Homme
THIK-2	non	non	oui	oui	oui	non	non	non	Homme

Tableau 3 (début) : Localisation intrarénale des différents canaux potassiques étudiés [d'après Lachheb 2007].

Canal	Localisation								Espèce
	Glom	PCT	MTAL	CTAL	DCT	CNT	CCD	OMCD	
Canaux potassiques à 2 domaines transmembranaires									
Kir1.1	non	non	oui	oui	oui	oui	oui	?	Homme, Rat, Souris
Kir2.1	oui	oui	non	non	non	non	non	non	Homme
Kir3.4	?	?	?	?	?	?	?	non	Homme
Kir4.1	non	non	oui	oui	oui	oui	oui	?	Homme, Rat, Souris
Kir4.2	oui?	oui?	non	non	non	non	non	non	Homme
Kir5.1	non	oui?	oui	oui	oui	oui	oui	oui	Homme, Rat, Souris
Kir4.1/Kir5.1	non	non	oui	oui	oui	oui	oui	?	Souris
Kir4.2/Kir5.1	?	oui?	non	non	non	non	non	non	Souris
Kir6.1	non	oui	non	non	non	non	non	non	Lapin
Kir7.1	non	oui	oui	oui	oui	oui	oui	oui	Homme, cochon d'inde, rat

Tableau 4 (fin): Localisation intrarénale des différents canaux potassiques étudiés[d'après Lachheb 2007].

4- Pathologies associées aux canaux Kir4.x/Kir5.1.

Nous nous intéresserons spécialement dans cette partie à une pathologie touchant la sous-unité Kir4.1. En effet, le rôle crucial des canaux Kir4.1 a été confirmé suite à l'identification de mutations homozygotes du gène humain *KCNJ10*, codant pour Kir4.1, à l'origine d'un syndrome SeSAME/EAST. Ce syndrome a été découvert par deux équipes différentes en 2009, l'une d'elle l'a désigné sous l'acronyme SeSAME (Seizures, Sensorineural deafness, Ataxia, Mental retardation and Electrolyte imbalance) [Scholl et al., 2009], l'autre sous l'acronyme EAST (Epilepsy, Ataxia, Sensorineural deafness, Tubulopathy) [Bockenhauer et al., 2009]. Ce syndrome est caractérisé par une épilepsie, une surdité neurosensorielle, une ataxie, une déficience intellectuelle et au niveau rénal, par une perte de sels, une alcalose métabolique, une hypokaliémie et une hypercalciurie.

Le canal Kir4.1/Kir5.1 a été décrit comme étant le canal majoritaire à la membrane basolatérale du néphron distal voire comme étant le seul canal présent au niveau de la membrane basolatérale du DCT [Lourdel et al., 2002]. Ainsi, suite à des mutations de *KCNJ10*, il s'en suit une perte totale de fonction de Kir4.1 (apparition prématurée d'un codon « stop » et formation d'une protéine tronquée) [Sala-Raban et al., 2010 ; Williams et al., 2010 ; Freudenthal et al., 2011 ; Reichold et al., 2010] et donc du canal Kir4.1/Kir5.1 car Kir5.1 seul ne forme pas un canal fonctionnel. Cela se traduit par une perturbation de l'activité de la Na⁺/K⁺ATP-ase et au final par une perturbation de la réabsorption transcellulaire de sodium par le DCT (figure 15). La perturbation des mécanismes de réabsorption du NaCl entraîne une modification de l'activité des autres transporteurs en présence notamment l'échangeur Na⁺/Ca²⁺ présent dans le DCT2 et le CNT permettant normalement une réabsorption de Ca²⁺. Pour compenser cette perte de sel, l'activité du canal collecteur s'en trouve augmentée ce qui provoque une augmentation de l'activité des canaux ENaC des cellules principales et par conséquent une augmentation de la sécrétion apicale de potassium par le canal ROMK. Cette augmentation d'activité de ce segment est responsable de l'hypokaliémie et de l'alcalose métabolique observées [Bandulik et al., 2011].

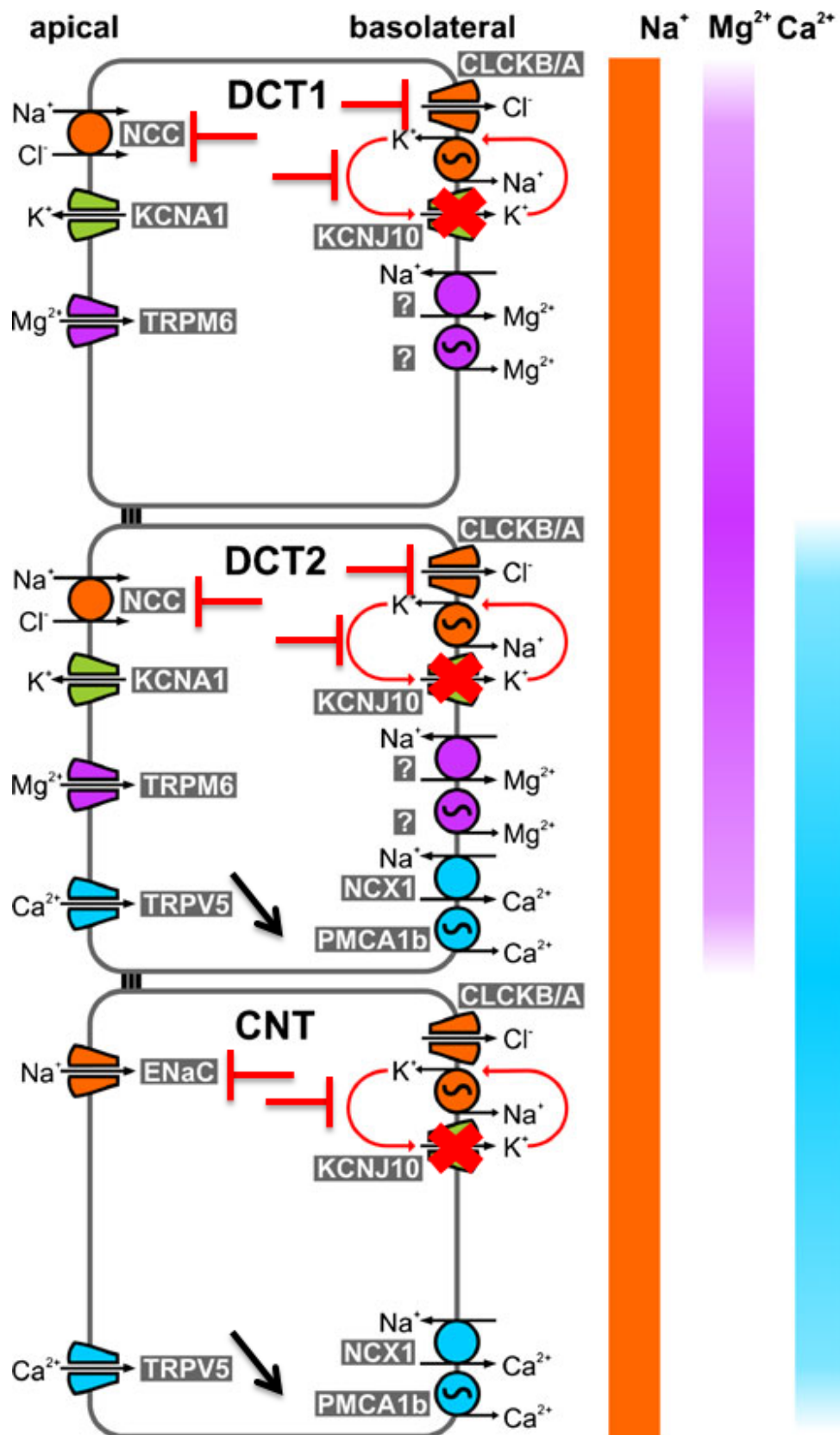


Figure 15 : Modèle des perturbations de transport dans le DCT et le CNT lors du syndrome SeSAME/EAST [d'après Bandulik et al., 2011]

Suite à ces études sur l'importance de Kir4.1, le laboratoire s'est intéressé au rôle de la sous-unité Kir5.1 dans le complexe Kir4.1/Kir5.1 dans la fonction rénale. Une étude de Marc Paulais sur des souris invalidées pour la sous-unité Kir5.1 a permis de mettre en évidence son rôle crucial dans le complexe Kir4.1/Kir5.1. En effet, il a été observé que son invalidation entraîne chez les souris un phénotype partiellement miroir de celui observé chez les patients atteints du syndrome SeSAME/EAST. Les souris sont atteintes d'une acidose métabolique hyperchlorémique, d'une hyperkaliurie et d'une hypercalciurie [Paulais et al., 2011]. Sans Kir5.1, on ne retrouve que des homotétramères Kir4.1 fonctionnels dans le DCT et l'hypothèse émise pour expliquer ce phénotype résulte d'une suractivité du DCT (figure 16). On ne peut cependant pas expliquer tous ces traits phénotypiques et en particulier l'acidose métabolique par une simple atteinte du DCT. Il a été observé chez ces souris une excrétion en ammonium diminuée et un pH urinaire faible, signes d'une possible atteinte du tubule proximal. Ainsi, l'invalidation de *Kcnj16* induirait des perturbations des mécanismes de transport soit directement par une atteinte dans le tubule proximal soit via une boucle de régulation entre le DCT et le PCT. Cette hypothèse est basée sur des études qui ont montré qu'en cas d'inhibition de l'activité du NCC, il y avait une modification de l'activité du tubule proximal qui réabsorbe plus de Na^+ et de Ca^{2+} [Nijenhuis et al., 2005 ; Bockenhauer et al., 2009]. D'autres études ont montré que lors d'une réabsorption excessive de NaCl dans le DCT chez des souris mutées pour la sérine-thréonine kinase WNK4, il y a apparition d'un pseudoaldostéronisme de type II (PHAII) caractérisé notamment par une acidose métabolique d'origine rénale, une hypercalciurie, une hyperkaliémie, une hypoaldostéronémie et une hypertension. Il a également été postulé qu'une baisse de la réabsorption en bicarbonate par le tubule proximal participait à l'acidose métabolique observée [Nahum et al., 1986].

Ainsi, la possibilité d'un complexe Kir4.x/Kir5.1 dans le tubule proximal est fortement probable et pourrait expliquer l'acidose métabolique observée lors de l'invalidation de *Kcnj16*. Les données préliminaires du laboratoire par RT-PCR ont montré la présence des ARNm codant pour Kir5.1 et Kir4.2 dans le PCT, et l'absence de Kir4.1 dans ce segment. Ce complexe pourrait donc jouer un rôle majeur dans les mécanismes de réabsorption du tubule proximal.

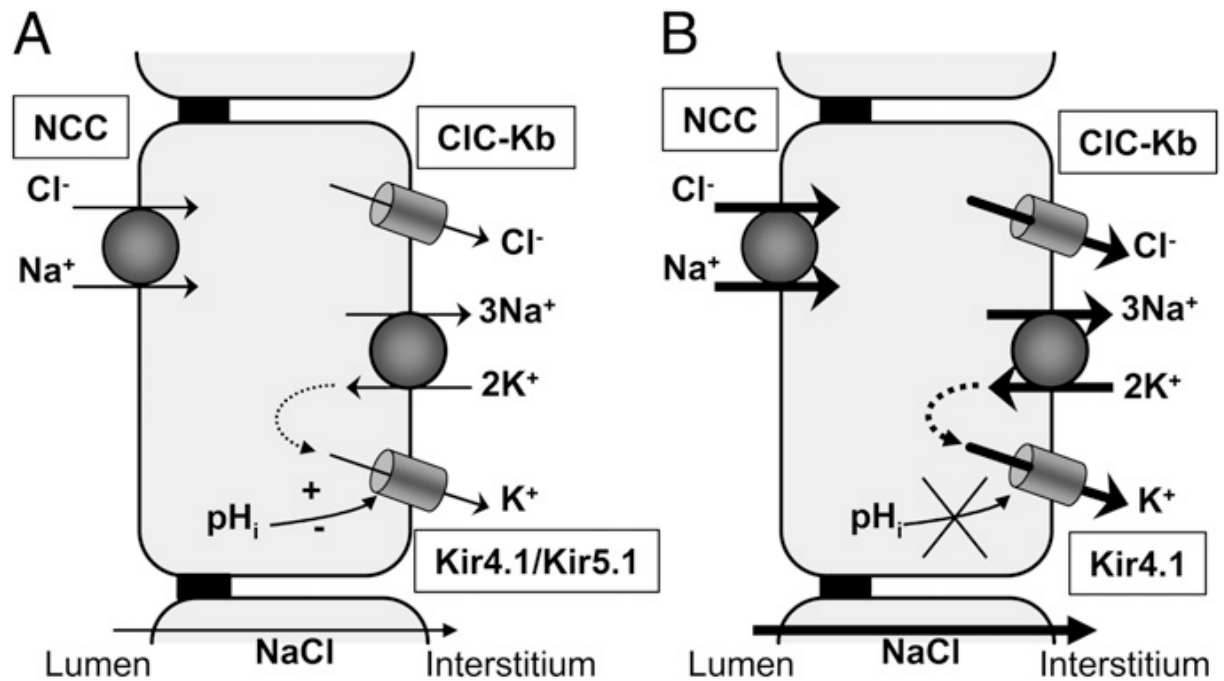


Figure 16 : Modèle de l'augmentation d'activité du DCT en l'absence de Kir5.1 [D'après Paulais et al., 2011].

(A). Le canal potassique basolatéral Kir4.1/Kir5.1 recycle le potassium entré dans la cellule via la Na⁺/K⁺ATP-ase. Le maintien de l'activité de cette dernière permet la génération d'un gradient électrochimique favorable à la réabsorption de transépithéliale de NaCl et son entrée au pôle apical *via* NCC.

(B) La délétion du gène *Kcnj16* entraîne la formation d'homomère Kir4.1 insensible au pH_i et ainsi rendu constitutivement très actif. En résulte une augmentation de la conductance potassique basolatérale entraînant une augmentation de l'activité de la Na⁺/K⁺ATP-ase et de NCC et donc de la réabsorption de NaCl par le DCT.

VI- Buts de l'étude

Nous l'avons vu, les propriétés électrophysiologiques d'un canal chlorure à la membrane basolatérale des cellules intercalaires du CNT sont compatibles avec celles observées lors de l'expression hétérologue du complexe humain CIC-Kb/barttine [Nissant et al., 2006]. Il reste que les modalités d'action de facteurs de régulation connus de CIC-Kb, tels le calcium, le pH extracellulaire et le voltage, ou à l'heure actuelle indéterminés, tels le pH intracellulaire, sur les propriétés unitaires du canal CIC-Kb/barttine et de son homologue murin CIC-K2, sont inconnues. Bien que le rôle rénal précis de ce canal ne soit pas encore clairement établi dans le CNT, il est fortement probable qu'à l'image de la TAL et du DCT, il soit responsable de l'étape basolatérale de la réabsorption de chlore par ce segment. A ce titre, l'identification des facteurs régulant son activité, de même que celle des mécanismes par lesquels ils agissent, sont de première importance à la compréhension de son implication dans le transport ionique, non seulement par le CNT mais aussi élargie à l'ensemble des segments de néphron où il est présent. Ainsi, nous nous sommes ici engagés à déterminer l'influence du voltage, du Ca^{2+} extracellulaire et des pH intra- et extracellulaires sur l'activité du canal à l'aide de mesures de courant par patch-clamp en canal unitaire sur des segments de CNT microdisséqués de souris.

Nous avons également mené une étude sur le canal potassique Kir4.2 rénal. Comme nous l'avons déjà mentionné, lorsque nous avons démarré ces travaux la présence de la sous-unité Kir4.2 dans le tubule proximal n'était pas clairement démontrée, et son rôle dans la fonction rénale n'était pas connu. Nous avons donc entrepris de caractériser les propriétés électrophysiologiques des canaux potassiques basolatéraux du tubule proximal à l'aide de la technique du patch-clamp sur tissu natif afin de vérifier la possible présence d'un canal potassique résultant d'un complexe homomérique Kir4.2 ou hétéromérique Kir4.2/Kir5.1. En parallèle, nous avons mené une analyse phénotypique et des analyses de biologie cellulaire et moléculaire chez des souris invalidées pour *Kcnj15* (gène codant pour Kir4.2) afin de mieux comprendre le rôle de Kir4.2 dans le rein.

Matériels & Méthodes

I- Méthodes de caractérisation des canaux ioniques

1- La Technique du patch-clamp

La caractérisation des propriétés des canaux potassiques et chlorure a été effectuée à l'aide de la technique du patch-clamp mise au point en 1976 [Neher, 1976] et améliorée ensuite en 1981 [Hamill et al, 1981]. Elle est basée sur l'isolement électrique d'un fragment de membrane cellulaire à l'aide d'une pipette de verre, dont le diamètre de la pointe est compris entre 1 et 2 μm . Le passage des ions à travers le ou les canaux présents dans ce fragment membranaire est à l'origine de signaux électriques, de l'ordre du pA, qui sont enregistrés à l'aide d'un dispositif relié à la pipette et permettant en parallèle d'imposer des différences de potentiel aux bornes du fragment de membrane. Afin de permettre la mesure des courants sur la membrane basolatérale des tubules rénaux, il est nécessaire de détruire la lame basale les entourant *via* une digestion par de la collagénase, permettant ainsi d'établir un contact étroit entre le verre de la pipette et la membrane et de réduire les bruits électriques générés par les différents composants du système. L'analyse des enregistrements de courants permet la description des propriétés des canaux ioniques (probabilité d'ouverture, conductance, potentiel d'inversion ...). La réalisation d'un scellement (*seal*) mécaniquement stable permet l'utilisation de plusieurs configurations lors de la réalisation du patch-clamp (figure 17).

Dans cette étude, nous avons utilisé deux configurations de patch-clamp :

- La configuration « cellule attachée » correspond à la configuration de base obtenue dès la formation du scellement. Elle permet la mesure de l'activité des canaux ioniques sous l'influence de régulateurs intracellulaires *in situ*, la cellule demeurant intacte. Le milieu baignant la face extracellulaire des canaux est la solution ionique contenue dans la pipette de patch-clamp.

- La configuration « détachée face interne vers l'extérieur » est obtenue lors du retrait de la pipette à partir de la configuration cellule attachée. Cela permet d'isoler le fragment de membrane du reste de la cellule et ainsi de s'affranchir des mécanismes de régulation intracellulaires et d'exposer la face intracellulaire des canaux à différentes solutions afin de déterminer l'influence de paramètres intracellulaires tels que le pH (canaux potassiques et chlorure) ou le Mg^{2+} (canaux potassiques).. Il faut noter qu'il peut arriver que lors du retrait de la pipette, les extrémités du fragment se soudent pour former une vésicule. Dans ce cas, un bref passage à l'air libre permet, généralement, de rompre cette vésicule et d'avoir accès à la

face interne de la membrane.

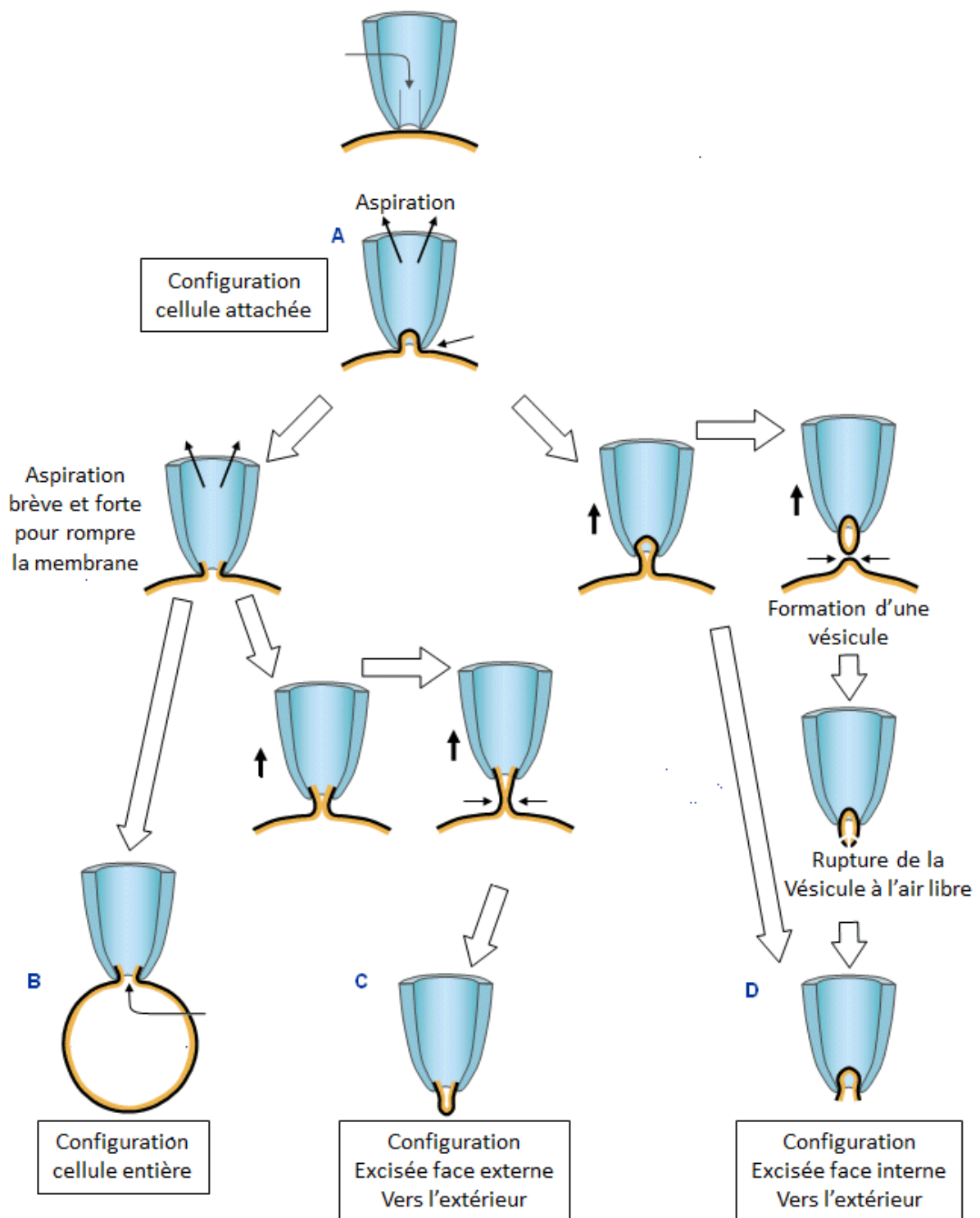


Figure 17 : Les différentes configurations du patch-clamp [d'après Hamill et al., 1981].

- A. Configuration « cellule attachée » ; B. Configuration « cellule entière » (*Whole Cell*) ; C. Configuration « excisée face externe vers l'extérieur » (*outside-out*) ; D. Configuration « excisée face interne vers l'intérieur » (*inside-out*).

2- Relations courant / tension

Une des premières étapes à la caractérisation des canaux ioniques est d'établir leur relation courant / tension. Pour cela, les tracés obtenus à l'aide du logiciel *PClamp* (Axon Instruments, Union City, CA, Etats-Unis) sont analysés et l'amplitude des courants unitaires i est mesurée pour une série de potentiels imposés (généralement de -100 à +100 mV, par incréments de 10 mV). La courbe ainsi obtenue sera caractéristique du canal étudié, dépendra de la composition des solutions utilisées et permettra d'établir la conductance unitaire g (exprimée en Siemens) du canal grâce à l'application de la loi d'Ohm, la conductance étant en effet l'inverse de la résistance électrique ($g = 1/r$). On obtient alors la relation suivante :

$$(1) i = g(V_m - E_{inv})$$

où E_{inv} correspond au potentiel pour lequel l'amplitude du courant unitaire est nulle (appelé potentiel d'inversion). Il faut toutefois préciser que cette valeur du potentiel d'inversion dépend fortement des compositions ioniques de part et d'autre de la membrane cellulaire et de la sélectivité ionique du canal étudié. Ainsi on peut se retrouver dans un cas où les deux solutions sont de compositions identiques pour un canal donné et alors le potentiel d'inversion sera égal à 0 mV. Concernant la mesure de la conductance, il existe deux cas de figure. Si l'amplitude des courants unitaires est une fonction linéaire du potentiel imposé, dans ce cas, la conductance sera constante. Cependant, dans la majorité des cas, cette relation n'est pas linéaire mais prend divers aspects. Soit l'amplitude des courants sortants (observés pour des potentiels positifs) est plus faible que celle des courants entrants (observés pour potentiels négatifs) et semble former un plateau, on parle alors de rectification entrante ; soit on a le phénomène inverse et l'on parle alors de rectification sortante. Dans ces cas de figure, on ne mesure pas une mais deux conductances, on parle alors de conductance entrante (g_{in}) et de conductance sortante (g_{out}) qui seront caractéristiques du canal en présence. On peut déterminer ainsi l'importance du phénomène de rectification en faisant le rapport g_{in}/g_{out} . Dans notre étude, la mesure de ces conductances s'effectue en calculant la pente de la courbe obtenue par régression linéaire à l'aide du logiciel *Origin* (Origin 8, Originlab, Northampton, Angleterre) pour des potentiels négatifs. La conductance sortante, elle, correspond à la mesure de la conductance d'une corde à partir d'une droite obtenue pour deux valeurs de potentiels positifs.

3- Probabilité d'ouverture

La probabilité d'ouverture (P_o) d'un canal représente le reflet de son activité. Cette valeur est comprise entre 0 et 1 et représente donc la probabilité que le canal soit à l'état ouvert à un instant donné. En pratique, la P_o correspond au temps t pendant lequel le canal reste ouvert, par rapport au temps total de l'enregistrement T :

$$(2) P_o = \frac{t}{T}$$

Généralement, plusieurs canaux sont actifs sur un même enregistrement et, dans ce cas, la probabilité devient :

$$(3) P_o = \frac{1}{N} \sum_{n=1}^N P_n \cdot n$$

où N représente le nombre de canaux présents sur le fragment de membrane lors de l'enregistrement. P_n est la durée pendant laquelle n canaux (tn) sont ouverts simultanément et rapportée au temps total de mesure (T), telle que $P_n = tn / T$. En pratique, le calcul de P_n devient fastidieux et peu fiable, voire impossible, si le nombre de canaux (N) est trop important pour être déterminé avec confiance.

Par conséquent, nous avons préférentiellement adopté une autre approche à la mesure de l'activité des canaux. Cette méthode repose sur l'estimation de l'activité de tous les canaux présents (NP_o) par la mesure du courant moyen (I_{moy}), à l'aide du logiciel *PClamp*, généré pour un potentiel imposé pendant une durée T :

$$(4) NP_o = \frac{I_{moy}}{i}$$

où i est le courant unitaire. Cette méthode présente l'avantage de ne pas avoir à connaître le nombre de canaux pour estimer la NP_o , qui est alors considérée comme le reflet de l'activité de tous les canaux en présence.

Toutefois, à partir de ces mesures, une estimation de la P_o peut être établie en prenant comme valeur de N le nombre maximal de canaux observés lors de l'enregistrement à un potentiel V_p donné.

$$(5) P_o = \frac{NP_o}{N}$$

Cette estimation nécessite, bien sûr, que l'on puisse obtenir, au cours de l'enregistrement (i) l'ouverture simultanée de tous les canaux présents et (ii) un état où tous les canaux sont fermés, afin de déterminer N . Cette approche a été utilisée dans le cadre de l'étude du canal chlorure du CNT, où elle s'est avérée délicate dans la mesure où il a été fréquent d'observer jusqu'à une centaine de canaux sous la pipette de patch-clamp. En configuration détachée, l'activation ou l'inhibition des canaux présents, notamment en manipulant le pH intracellulaire, nous a permis de déterminer de façon précise N . En revanche, en configuration attachée, nous avons eu recours à une procédure mise au point dans le laboratoire [Lourdel et al, 2003] consistant en une superfusion des tubules par une solution contenant de l'acétate de sodium afin d'acidifier le milieu intracellulaire et ainsi diminuer l'activité des canaux présents et observer, même brièvement, le niveau où tous les canaux sont à l'état fermé. Dans ces deux configurations, des enregistrements relativement longs (> 2 minutes) à un potentiel donné nous permettaient d'augmenter la probabilité d'observer, à un instant t , l'activité des N canaux présents sur le patch.

4- Mesures électriques

a- Dispositif d'enregistrement

Les courants sont amplifiés à l'aide d'un amplificateur (RK400, Bio-Logic, Claix, France) relié à un filtre passe-bas à 1 KHz pour les canaux potassiques et 500 KHz pour les canaux chlorures dans le but d'améliorer de la qualité du signal électrique. Afin de mettre en contact l'amplificateur et la solution de pipette, un filament d'argent, préalablement chloruré par immersion dans de l'eau de javel, est utilisé et une électrode de référence de type Ag/AgCl permet la fermeture du circuit électrique. L'amplificateur transmet un signal analogique filtré qui sera numérisé *via* un convertisseur analogique/numérique (Digidata 1200 A/D converter, Axon Instruments Inc, Union City, CA, Etats-Unis) puis visualisés en temps réel grâce à un logiciel dédié (*Clampex*, Axon Instrument Inc, Foster City, CA, Etat-Unis).

b- Conventions de potentiel et de courant

Par convention, les différences de potentiels mesurées sont exprimées, par rapport à l'extérieur de la cellule qui fait office de référence. Ainsi, la différence de potentiel aux bornes du fragment de membrane, V_m , est la résultante de la différence de potentiel entre la face interne (V_i) et la face externe (V_e) de la membrane, soit :

$$V_m = V_i - V_e.$$

La différence de potentiel imposée dans la pipette, notée V_p , correspond, par définition, à la différence de potentiel entre l'intérieur et l'extérieur de la pipette. On définit donc généralement une grandeur V_c (différence de potentiel imposée, avec « c » abréviation de « clamp ») telle que $V_c = -V_{pip}$.

De ce fait, en configuration « cellule attachée », la différence de potentiel transmembranaire de la cellule n'étant pas nulle (mais de valeur toutefois inconnue), elle doit être prise en compte dans le calcul de la différence de potentiel imposée. V_m devient donc la somme algébrique de la différence de potentiel transmembranaire de la cellule (E_m) et de la différence de potentiel imposée (V_c), d'où $V_m = E_m + V_c$.

En configuration « excisée face externe vers l'extérieur », le potentiel de repos E_m n'entre plus en compte du fait de l'isolement du fragment de membrane et, dans ce cas, $V_m = V_c$.

c- Potentiels de jonction

Un potentiel de jonction s'établit lors de la rencontre de deux solutions de compositions ioniques différentes, dus à la différence de mobilité des ions composant ces solutions, et peut induire des erreurs dans la valeur réelle de la différence de potentiel imposée. Dans notre circuit, ce phénomène peut se produire à la rencontre de la solution de pipette avec la solution de bain, la rencontre de la solution de perfusion avec l'électrode de référence, et la rencontre entre la solution de perfusion et la solution de bain. Dans le premier cas, un potentiomètre de l'amplificateur permet de corriger ce phénomène lorsque la pipette est immergée dans le bain, avant d'entrer en contact avec la membrane des cellules. Lors du contact entre la pipette et la membrane cellulaire, il y a suppression du contact entre les deux solutions ioniques ce qui supprime le potentiel de jonction précédemment établi. Dans les deux autres cas, il est resté négligeable puisque, dans le cadre des travaux rapportés ci-après, des solutions de perfusion de compositions très proches ont été utilisées, et n'a donc pas été considéré.

d- Obtention d'une liaison membrane – pipette

La pointe de la pipette de patch induit une résistance électrique lorsqu'elle entre en contact avec une solution ou la membrane des cellules. Ainsi, l'obtention d'un scellement membrane-pipette, appelé également *seal*, est contrôlé par l'observation de l'augmentation de la résistance électrique lors du contact de la pipette avec la membrane cellulaire, généralement de 4-6 M Ω à 8-12 M Ω lors du contact. Le scellement peut alors être réalisé par l'application d'une pression négative à l'intérieur de la pipette. Cette dernière est réalisée par aspiration par l'intermédiaire d'un cathéter relié au porte électrode. Le scellement est réalisé lorsque la résistance électrique atteint de 1 à 10G Ω .

5- Préparation du tissu

Afin de pouvoir appliquer la technique de patch-clamp sur la membrane basolatérale des fragments de tubules rénaux, ces derniers doivent préalablement être obtenus par microdissection d'une part et, d'autre part, la membrane doit être accessible à la pipette de patch-clamp et donc dépourvue du collagène de la lame basale. Pour ce faire, un traitement enzymatique par la collagénase, mis au point dans le laboratoire [Lourdel et al., 2002, Paulais et al., 2002, Paulais et al., 2006, Paulais et al., 2011] a été effectué. L'expertise du laboratoire sur cette préparation s'est faite suite à des études sur le néphron distal mais pour ces travaux nous nous sommes également intéressés au tubule proximal ce qui a nécessité un ajustement particulier des conditions de préparation du fait de l'extrême fragilité de ce segment du néphron.

Les expériences ont été réalisées sur des souris mâles C57Bl6 (Charles River, France) âgées d'environ 4 semaines. Le rein gauche des souris est prélevé après sacrifice de l'animal par dislocation des vertèbres cervicales. Ce dernier est alors nettoyé de son sang par perfusion *via* la veine rénale avec du Leibovitz L-15 (Gibco BRL®, Life Technologies, Cergy Pontoise, France) contenant de la collagénase (CLS 2, Worthington, Lakewood, NJ) à 175U/mL (pour la dissection de tubules proximaux) ou à 300 U/ml (pour la dissection des tubules connecteurs). La nécessité de 2 traitements différents selon la nature du tubule provient du fait que les tubules proximaux sont beaucoup plus fragiles et se dégradent plus rapidement que ceux du néphron distal. Une fois la capsule rénale retirée, les pôles, sont excisés car ils sont généralement moins bien perfusés par rapport au reste du rein. Ensuite, de fines tranches de rein sont découpés suivant l'axe cortico-papillaire. La région médullaire, au centre des tranches et généralement de couleur rosée, est éliminée et les parties corticales restantes sont découpées en petites pyramides. Afin d'éliminer la lame basale et de faciliter la microdissection des tubules, les fragments sont incubés dans une solution contenant la collagénase pendant 20 à 30 min (tubules proximaux) ou 45 à 75 minutes (tubules connecteurs), à 37°C. La qualité de la digestion étant très variable d'une préparation à l'autre, cette gamme de temps de digestion nous permet d'obtenir généralement une série utilisable. L'arrêt de l'activité de la collagénase s'effectue par rinçage avec le milieu de Leibovitz L-15 à 4°C. Les pyramides de cortex peuvent généralement être conservées à 4°C pendant plusieurs heures jusqu'à leur utilisation mais dans le cadre de l'étude du tubule proximal, sa forte fragilité rend sa conservation difficile au cours du temps.

Au moment de l'expérimentation, les tubules sont microdisséqués à partir des pyramides de cortex à l'aide d'aiguilles d'entomologiste, sous loupe binoculaire, à 4°C. Ils sont ensuite transférés dans la chambre de perfusion, posée sur la platine d'un microscope inversé.

6- Dispositif expérimental

a- Chambre de perfusion

La chambre de perfusion est constituée d'un support (généralement une boîte de Pétri) dans lequel les tubules sont préalablement déposés après microdissection. Un système de micro-perfusion permettant les changements de solution. Ce système consiste en des capillaires de verre coudés à la flamme, alignés et collés. Chaque capillaire est relié, par un cathéter, à une seringue de 20 ml. L'ensemble est rempli d'une solution de composition ionique souhaitée. Le flux de chaque solution est obtenu par gravité avec un débit de perfusion d'environ 500 µl/min. Pour exposer la membrane (en configuration « détachée face interne vers l'extérieur ») à différentes solutions il faut placer, à l'aide d'un micromanipulateur, la pointe de la pipette relativement près du centre du flux de chaque perfusion et ajuster sa position afin de ne pas être trop près du flux ce qui pourrait entraîner la perte du *seal*. Les expériences ont été faites à une température ambiante comprise entre 20 et 28 °C.

b- Fabrication des pipettes de patch

Les pipettes sont fabriquées à partir de tubes de verre en borosilicate (diamètre externe 1,50 mm et diamètre interne 1,17 mm). Afin d'obtenir deux pipettes identiques, les tubes sont soumis à deux étirements successifs à l'aide d'une étireuse horizontale (P-97, Sutter Instrument Company, Novato, CA). Le premier étirement diminue le diamètre du tube en son milieu, sur environ 1cm, et le second étirement permet d'obtenir deux pipettes identiques. Afin d'augmenter les propriétés isolantes du verre, la paroi externe de la pointe de la pipette est ensuite revêtue d'une fine couche de silicones (Sylgard®) obtenu par mélange de résine et de catalyseur. Le Sylgard® est étalé à l'aide d'une aiguille sous loupe binoculaire, puis placé sous une résistance chauffante afin que celui-ci durcisse avec la chaleur.

Les pipettes sont ensuite polies à l'aide d'une micro-forge juste avant leur utilisation afin d'éliminer les éventuelles impuretés et de diminuer le diamètre de la pointe de la pipette, ce qui facilite la réalisation de la technique du patch-clamp en canal unitaire. Afin d'éviter la formation de bulles à l'extrémité de la pipette, elle est préalablement remplie par capillarité en immergeant quelques secondes la pointe dans la solution de composition ionique donnée. Le

remplissage du corps de la pipette est, lui, effectué à l'aide d'un cathéter souple relié à une seringue, *via* un filtre Millipore (0,45 μm).

c- Solutions expérimentales

La composition des solutions expérimentales est définie afin de favoriser l'observation du canal étudié et si possible d'éliminer l'interférence de tout autre canal présent sous la pipette de patch. Dans le cas des canaux potassiques étudiés, la solution de bain est pauvre en potassium (5 mM), alors que la solution contenue dans la pipette, et faisant office de milieu extracellulaire, est, elle, riche en potassium (145 mM). Cela permet d'augmenter la conductance élémentaire des canaux Kir qui est donc plus grande en présence de 145 mM de potassium dans le milieu extérieur. La solution de bain contient également du phosphate et de l'acétate afin de permettre une meilleure conservation des tubules proximaux microdisséqués. Dans le cas des canaux chlorures, nous avons utilisé une solution de pipette ne contenant pas de potassium (145mM de NMDG-Cl (N-Méthyl D-Glucamine - Chlore). Le bain contient toujours 5mM de potassium mais il faut souligner qu'à cette concentration de potassium, la conductance des canaux potassiques, en particulier des Kir, est du même ordre que celle des canaux chlorures étudiés. Toutefois, leur cinétique est différente tout comme l'activité de ces canaux pour des voltages positifs. Enfin, dans le CNT, aucun canal potassique n'a, jusqu'alors, été décrit dans les cellules intercalaires où seront étudiés les canaux chlorures.

L'utilisation de la configuration excisée face externe vers l'extérieur du patch-clamp pour isoler un fragment de membrane est une opération délicate dans le cas des canaux potassiques Kir parce que leur activité peu être perdue en présence de Mg^{2+} et / ou de Ca^{2+} [Lourdel et al., 2002, Paulais et al., 2002]. Nous avons donc, grâce à un agent chélateur, l'EDTA (ethylen diamine tetraacetic acid), utilisé des solutions pauvres en calcium et en magnésium. Il faut cependant préciser que dans le cadre des canaux Kir, la rectification entrante de ces canaux est induite entre autres par le Mg^{2+} intracellulaire [Matsuda H et al., 1987]. Nous avons donc utilisé de l'EGTA (ethylen glycol tetraacetic acid) lorsque nous nous sommes intéressés à l'effet du Mg^{2+} sur la rectification entrante des canaux observés en patch-clamp. Dans le cas de l'étude des canaux chlorure, de l'EGTA a été utilisé et également de l'ATP-Na (1 mM) afin de maintenir l'activité des canaux observés sous la pipette de patch. Les solutions ont été tamponnées par de l'HEPES (acide N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulfonique) et ajustées à pH 7.4 par du KOH (pour la pipette et les perfusions des canaux potassiques), du NaOH (pour le bain) ou du NMDG (pour la pipette et les perfusions des canaux chlorures). Les tableaux 5 et 6 précisent la composition exacte de chacune des solutions utilisées.

	NaCl	KCl	MgCl ₂	CaCl ₂	Glucose	HEPES	Na-acétate	Na ₂ HPO ₄	NaH ₂ PO ₄	K-EDTA	EGTA	Ba ²⁺	pH
Bain NaCl	140	5	1	1	10	10	5	0,4	1,6	-	-	-	7.4
Pipette	-	145	1	1	10	10	-	-	-	-	-	-	7.4
Pipette + Ba ²⁺	-	145	1	1	10	10	-	-	-	-	-	0.1	7.4
Perfusion 145 KCl	-	145	-	-	10	10	-	-	-	5	-	-	7.4
Perfusion 145 KCl	-	145	-	-	10	10	-	-	-	5	-	-	8.0
Perfusion 145 KCl	-	145	-	-	10	10	-	-	-	5	-	-	6.8
Perfusion Mg ²⁺	-	145	0.7	-	10	10	-	-	-	-	2	-	7.4

Tableau 5 : Composition des principales solutions expérimentales pour l'étude des canaux potassiques (valeurs en mM).

	NaCl	KCl	NMDG-Cl	MgCl ₂	CaCl ₂	Glucose	HEPES	EGTA	Na-acétate	Na-ATP	pH
Bain NaCl	140	5	-	1	1	10	10	-	-	-	7.4
Pipette	-	-	145	1	5	10	10	-	-	-	6.8
Pipette	-	-	145	1	0 ou 5	10	10	-	-	-	7.4
Pipette	-	-	145	1	5	10	10	-	-	-	8.0
Perfusion 145 NMDG-Cl	-	-	145	1	-	10	10	2	-	1	6.6
Perfusion 145 NMDG-Cl	-	-	145	1	-	10	10	2	-	1	6.8
Perfusion 145 NMDG-Cl	-	-	145	1	-	10	10	2	-	1	7.0
Perfusion 145 NMDG-Cl	-	-	145	1	-	10	10	2	-	1	7.2
Perfusion 145 NMDG-Cl	-	-	145	1	-	10	10	2	0 ou 5	0 ou 1	7.4
Perfusion 145 NMDG-Cl	-	-	145	1	-	10	10	2	-	1	7.6
Perfusion 145 NMDG-Cl	-	-	145	1	-	10	10	2	-	1	7.8
Perfusion 145 NMDG-Cl	-	-	145	1	-	10	10	2	-	1	8.0

Tableau 6 : Composition des principales solutions expérimentales pour l'étude des canaux chlorure (valeurs en mM)

II- Analyse phénotypique des souris invalidées pour la sous-unité Kir4.2

1- Elevage des souris invalidées pour le gène *Kcnj15* ou «Kir4.2^{-/-}»

Le laboratoire a acquis auprès du MRC Harwell, Mary Lyon Centre (Oxford, GB) deux couples de souris hétérozygotes pour le gène *Kcnj15* codant pour Kir4.2 (Licence Deltagen). L'exon 4 d'un allèle du gène *Kcnj15* de ces souris est remplacé par une cassette de résistance à la néomycine. Le Kir4.2 recombinant qui résulte de cet allèle n'est pas fonctionnel, car il est amputé de l'un de ses domaines extracellulaires et de sa boucle H5.

En raison du protocole employé pour créer ces souris, celles-ci possédaient un fonds génétique hétérogène composé d'allèles des lignées 129/OlaHsd et C57Bl/6. Afin d'homogénéiser leur fonds génétique, nous avons donc réalisé 5 générations de rétrocroisements de souris hétérozygotes Kir4.2 (ou « Kir4.2^{+/-}») avec des souris sauvages C57Bl/6 (ou « Kir4.2^{+/+} ») provenant de Charles River. Finalement, les souris Kir4.2^{+/-} de la 5ème génération, dont le fonds génétique C57Bl/6 est homogène, ont été croisées entre elles pour obtenir des souris invalidées pour *Kcnj15* ou « Kir4.2^{-/-} ». Les souris Kir4.2^{+/+} nées de ces mêmes couples ont servi de souris contrôles durant les expérimentations.

A chaque génération, les souris ont été génotypées à l'aide d'un échantillon de queue digéré durant 18h à 55°C dans une solution tampon contenant 200µg de protéinase K (Invitrogen). L'ADN obtenu a subi une PCR qui a amplifié l'allèle *Kcnj15* sauvage et/ou recombinant. Les 35 cycles de PCR comprennent 3 étapes successives à 94, 60 et 72°C qui durent respectivement 10, 30 et 90 secondes. Les amorces utilisées font sens à l'exon 4 de l'allèle sauvage (5'-TTGCTGCCACCTTTGTGATGACCTG-3') et à la cassette de résistante à la néomycine de l'allèle recombinant (5'-GGGTGGGATTAGATAAATGCCTGCTCT-3') ou antisens aux allèles sauvage et recombinant (5'-GGAAGATAGCATGGGGACACTCCTC-3').

Le brin d'ADN amplifié étant plus long pour l'allèle recombinant contenant la cassette de résistance à la néomycine que pour l'allèle sauvage, le génotype a été visualisé après migration de l'ADN dans un gel d'agarose (Figure 18).

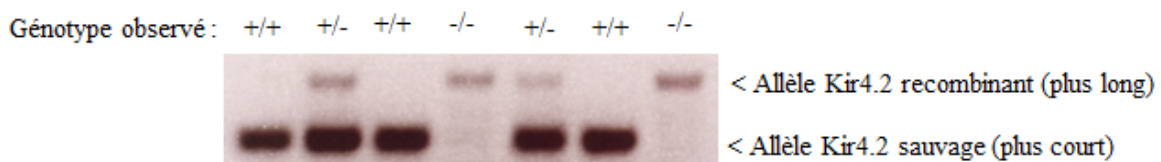


Figure 18 : Visualisation sur gel des différents génotypes des souris de la lignée invalidées pour *Kcnj15*.

2- Etude phénotypique des souris Kir4.2^{+/+} et Kir4.2^{-/-}

L'étude phénotypique de la lignée a été effectuée sur des souris Kir4.2^{+/+} et Kir4.2^{-/-} mais il faut noter que la fréquence de naissance des souris Kir4.2^{-/-} a été anormalement basse durant notre étude (voir *Résultats*). Ainsi, 17 souris mâles âgées de +/- 5 mois (9 Kir4.2^{+/+} et 8 Kir4.2^{-/-}) ont été placées individuellement dans des cages à métabolisme, abreuvées et nourries *ad libitum* en régime standard A04 en poudre. Durant les 4 premiers jours définissant la période d'habituations, le poids des souris ainsi que leurs consommations d'eau et de nourriture ont été relevés. Le 5ème jour, un recueil de l'urine des dernières 24 heures a été ajouté. Ensuite, la pression artérielle et la fréquence cardiaque des souris ont été mesurées à la queue par pléthysmographie à l'aide d'un appareil BP2000 (Visitech) selon un protocole de 5 mesures d'habituations suivies de 15 vraies mesures à 37°C avec une pression de 200mmHg du manchon caudal. Après 4 jours d'habituations, les 15 dernières mesures du 5^{ème} jour ont été conservées. Le pH, la PO₂, la PCO₂, l'hématocrite et les taux de lactate et de bicarbonates présents dans le sang des 17 souris ont été obtenus par prélèvement de 70µl de sang rétro-orbital puis analyse par un automate « EPOC » (Epcal). En fin d'expérimentation, les 17 animaux ont été anesthésiés sans réveil par injection de 6.7 µl/g de poids corporel de pentobarbital sodique à 11 mg/ml puis leur sang a été prélevé par ponction cardiaque et le plasma qu'il contient a été récupéré. Les concentrations urinaires et/ou plasmatiques de créatinine, de chlorure, de calcium, de magnésium, de phosphate, de glucose et de protéine ont été déterminées par un automate «Konélab» (Thermo Scientific). Le potassium et le sodium urinaire ont été dosés par spectrophotométrie de flamme. L'osmolarité et le pH de l'urine ont été déterminés respectivement avec un osmomètre et un pH-mètre. L'excrétion urinaire est normalisée par expression des résultats en millimole de composant par millimole de créatinine urinaire. Enfin, les concentrations de créatinine plasmatiques (Pcreat) et urinaire (Ucreat) associées au volume des urines de 24h (Uvol) permettent d'estimer le Débit de Filtration Glomérulaire des souris (DFG en µl/min), un index de la qualité de la fonction rénale. Le calcul utilisé est le suivant:

$$(6) DFG = \frac{U_{creat}U_{vol}}{P_{creat}}$$

III- Analyses moléculaires et protéiques

1- Outils et technique de biologie moléculaire

a- Les plasmides pCDNA3 et pBF

Par le biais d'une collaboration avec le Dr. Stephen J. Tucker (Oxford University, GB) le laboratoire a obtenu trois plasmides de type « pBF » ou « pCDNA3 » (figure 19).

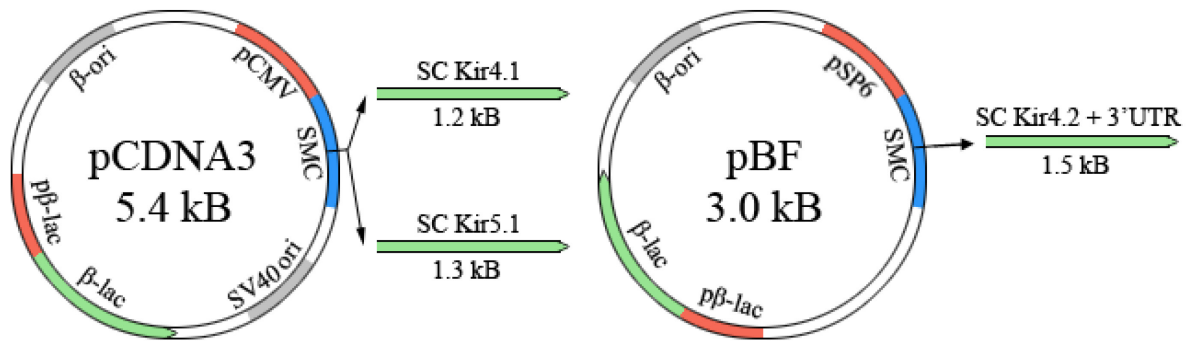


Figure 19 : Cartes simplifiées des plasmides de type pCDNA3 (à gauche) et pBF (à droite).

Les plasmides pCDNA3 et pBF sont des vecteurs de clonage bactérien: ils ont une origine de répllication bactérienne pBR322 (β -ori) et une cassette de résistance à l'ampicilline composée de la séquence codante (SC) de la β -lactamase (β -lac) et de son promoteur (p β -lac).

Les plasmides pCDNA3 sont également des vecteurs d'expression dans les cellules de mammifères: ils disposent d'un Site de Multi-Clonage (SMC) situé en aval du promoteur du cytomégalovirus humain (pCMV). Ce SMC contient un « insert »: soit la SC de Kir4.1 (pCDNA3-Kir4.1: 6.6 kB) soit la SC de Kir5.1 (pCDNA3-Kir5.1: 6.7 kB).

En outre, la présence dans les plasmides pCDNA3 d'une origine de répllication dans les cellules eucaryotes (SV40 ori) leur offre la possibilité de se répliquer dans la lignée cellulaire HEK293T. En effet, cette lignée a la particularité d'exprimer l'« antigène large T » du virus simien 40 (ou SV40) nécessaire au fonctionnement de SV40 ori.

Le plasmide de type pBF n'est pas un plasmide d'expression. Il possède toutefois un SMC en aval d'un promoteur de bactériophage SP6 (pSP6), qui contient un insert: la SC du canal Kir4.2 suivie d'une partie de la séquence 3'UTR de son ARNm (pBF-Kir4.2: 4.5 kB).

Afin de vérifier leur intégrité, les inserts des différents plasmides ont été préalablement séquencés (GATC Biotech) à l'aide d'amorces situées en amont du pCMV (5'-AGCAGAGCTCTCTGGCTACTAGAG-3') ou du pSP6 (5'-TTGGCCGATTCATTAATGCAGCCG-3') et dans les SC de Kir4.2, Kir4.1 ou Kir5.1

(respectivement 5'-GGAGTGTCCCCATGCTATCTTCCT-3', 5'-GGAAGCCTTGCCTTATGATCCGGGT-3' et 5'-GAAGCTTTGCCTCATGTGGCGCATA-3').

b- *Le sous-clonage de la sous-unité Kir4.2 d'un plasmide pBF vers un plasmide pCDNA3.*

Afin de pouvoir exprimer la sous-unité Kir4.2 dans les HEK293T, le plasmide pBF-Kir4.2 a été utilisé afin de générer un plasmide pCDNA3-Kir4.2, par sous clonage de l'insert du pBF-Kir4.2 vers le SMC d'un plasmide pCDNA3 sans insert (en collaboration avec le Dr. O.Lahuna de l'Institut Cochin, Paris). Pour cela, les plasmides pCDNA3-Kir4.1 et pBF-Kir4.2 ont été digérés dans leur SMC autour de leurs inserts respectifs par les enzymes de restriction BamHI et XbaI (Biolabs). L'ADN digéré a migré par électrophorèse dans un gel d'agarose. Les bandes d'ADN, correspondant respectivement au pCDNA3 sans insert et à l'insert du pBF-Kir4.2, ont été purifiées depuis le gel grâce au kit « Qiaquick gel extraction kit » (Qiagen). Leur ligation a été effectuée par la T4 DNA Ligase (Fermentas) et le produit de ligation obtenu a été cloné au sein de bactéries *E.coli* « XL10Gold ultracompetent cells » (Stratagene) comme précédemment décrit [Grant et al., 2010]. L'ADN plasmidique de ces bactéries a été extrait à l'aide du kit « GeneJET Plasmid Miniprep » (Thermo Scientific). Pour évaluer la réussite du sous-clonage, le plasmide « pCDNA3-Kir4.2 » obtenu a été digéré par les combinaisons d'enzymes de restriction suivantes : NdeI ; PstI ; BamHI/EcoRI ; MluI/XbaI ; SpeI/KpnI (Biolabs). Les sites de restrictions de ces enzymes sont répartis le long de la séquence théorique du plasmide créé (Figure 20). Enfin, l'insert sous-cloné a été séquencé (GATC Biotech) à l'aide des amorces situées en amont de pCMV et dans la SC de Kir4.2.

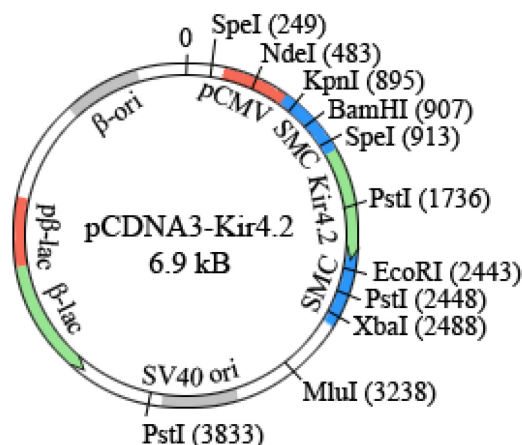


Figure 20 : Carte simplifiée et sites de restrictions du pCDNA3-Kir4.2.

c- Expression de la sous-unité Kir4.2 dans les cellules HEK293T

Les cellules HEK293T ont été cultivées comme précédemment décrit [Grant et al., 2010]. Elles ont été transfectées transitoirement par les plasmides pCDNA3 à l'aide du « X-tremeGENE 9 DNA transfection reagent » (Roche) selon les instructions du fabricant. Les cellules « non-transfectées » ont été mises en présence d'un milieu de transfection sans plasmide.

2- Western blot

Les WB ont été réalisés par séparation dans des gels de poly-acrylamide 10% en présence de SDS (SDS-PAGE) de 12µg de protéines extraites des cellules HRK293T ou 50µg de protéines extraites de rein et de protéines extraites d'environ 350 tubules proximaux isolés, de même taille, l'ensemble provenant de souris WT. Les protéines ont été transférées sur membrane de nitrocellulose. Les membranes ont été mises en présence d'Ac primaires de lapin anti-Kir4.2 (Sigma HPA016702) dilué au 1/2000ème ou de souris anti-β-actine (Sigma A5441) dilué au 1/200000ème puis d'Ac secondaires conjugués à la Horseradish Peroxydase (HRP) de type anti-lapin (Biorad 170-6515) ou anti-souris (Biorad 170-6516) dilués au 1/10000ème. Après lavage, la révélation des anticorps secondaires a été réalisée par chimioluminescence grâce à l'« ECL western blotting substrate » (Pierce) ou au « SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate » (Pierce).

3- Immunohistochimie

Afin de vérifier la spécificité des anticorps anti-Kir4.2, les expériences d'immunohistochimie pour les protéines Kir4.2 ont été réalisées préalablement sur des cellules

HEK293T transfectées depuis 24h et biotinylées par incubation à 4°C dans une solution de « NHS-Biotine » (Pierce) à 1 mg/ml comme précédemment décrit [T. Grand, thèse 2010]. La biotine se lie de façon aspécifique aux domaines extracellulaires des protéines membranaires. Les cellules ont ensuite été fixées au formaldéhyde 4 % puis perméabilisées au Triton-X100 à 0.3 %. L'immunomarquage a été conduit à l'aide des anticorps décrits plus bas. Par la suite, l'immunohistochimie a été réalisée sur tubules proximaux isolés de souris WT et/ou invalidée pour le gène *Kcnj15* obtenus selon la méthode décrite précédemment. La collagénase a été remplacée par de la libérase à une concentration de 0.1mg/mL et le milieu de dissection est un milieu de Hank's complétementé par de la BSA, de la glycine, du calcium et du magnésium.

Après dissection, les tubules sont transférés sur des lames Superfrost Gold+ rincés par du PBS et fixés avec de la BSA. La perméabilisation se fait dans une solution de PBS + 0.1% de triton pendant 2min et le rinçage au PBS. Un démasquage antigénique est réalisé dans du tampon citrate pendant 10min à 95°C puis 20 min à température ambiante. Le blocage est réalisé à l'aide d'une solution de PBS + 1% de BSA et les tubules sont ensuite mis en présence de l'anticorps primaire de lapin anti-Kir4.2 (Sigma HPA016702) dilués au 1/20^{ème} et stocké à 4°C toute la nuit. Après rinçage au PBS-Tween 0.05% et au PBS, les tubules sont mis en présence de l'anticorps secondaire anti-lapin Alexa-555 (Invitrogen A21428) dilué au 500^{ème}. Après rinçage au PBS-Tween 0.05% puis rinçage au PBS, les préparations histologiques ont été placées dans un milieu de montage « Vectashield » (Vector Laboratories), contenant du DAPI à 1.5µg/ml, puis ont été observées à l'aide d'un microscope confocal à balayage laser Zeiss LSM710.

IV-Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés selon leur moyenne \pm SEM pour n expériences. La significativité des résultats a été déterminée soit par un « t -test » de Student, soit par un test ANOVA ($p < 0,05$ a été considéré comme significatif) grâce au logiciel SyStat SigmaStat[®] software (Ritme Informatique, Paris, France).

Résultats

I- The native small-conductance Cl⁻ channel in the mouse renal tubule as a CIC-K2 candidate : regulation by voltage, chloride, calcium and protons.

1- Article

The native small-conductance Cl⁻ channel in the mouse renal tubule as a CIC-K2 candidate: regulation by voltage, chloride, calcium and protons.

Laurent Pinelli*, Antoine Nissant*, Stéphane Lourdel, Jacques Teulon and Marc Paulais

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

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

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

CNRS ERL 8228, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France

Corresponding author: Dr. Jacques Teulon
Centre de Recherche des Cordeliers
UMR_S 1138 – ERL 8228, team 3
15 rue de l'Ecole de Médecine
75270 PARIS CEDEX 06, France
Phone: 33 1 44 27 50 50
Fax: 33 1 44 27 41 72
E-mail: jacques.teulon@upmc.fr

*These authors contributed equally to this work

Running title: Renal Cl⁻ channel: regulation by voltage, pH and calcium

Keywords : CIC-K, chloride, renal tubule, intercalated cell

ABSTRACT

In the mouse distal nephron, a ~10 pS Cl⁻ channel displays properties such as Cl⁻ > NO₃⁻ > Br⁻ anionic selectivity sequence and sensitivity to external H⁺ and Ca²⁺ that relate well with those of CIC-K2, a channel belonging to the CIC family of Cl⁻ channels and transporters. CIC-K2, which probably forms the major basolateral Cl⁻ conductance along the distal nephron, has not been studied yet at the single-channel level in heterologous expression systems. Using the cell-attached and inside-out configurations of the patch-clamp, we studied the influence of voltage, intracellular Cl⁻, external Ca²⁺ and extra / intracellular pH on the activity of the ~10 pS Cl⁻ channel in the basolateral membrane of intercalated cells of mouse connecting tubule. Channel activity (*NPo*) was highly dependent upon membrane voltage, *NPo* increasing with depolarization, while being far less sensitive to [Cl⁻]_i. An increase in [Ca²⁺]_o augmented *NPo* by modulating the number of active channels, without any change in the *Po*, while alkaline pH_o increased the number of channels and shifted the voltage-dependence curve towards more positive voltages. Alkaline pH_i also had a dramatic effect on the number of active channels. In addition, alkaline pH_i blunted the *NPo/V* relationship through an increase in the *Po* at negative voltages. The major effect of [Ca²⁺]_o, pH_o and pH_i on the number of active channels suggests that a slow process is involved in channel modulation. This is in line with the fact that CIC-K channels lack the protopore gate that is present in other CIC channels and likely relies on their common gate for opening and closing. In conclusion, the ~10 pS Cl⁻ channel is sensitive to all the factors modulating CIC channels, but pH acting through the combined effects of pH_i and pH_o is potentially the key intrinsic regulator of the ~10 pS Cl⁻ channel.

INTRODUCTION

It is now widely acknowledged that human ClC-Kb, a member of the ClC family of voltage-dependent Cl⁻ channels (Uchida and Sasaki, 2005; Jentsch, 2008; Stolting et al., 2014), associated with barttin, represents the major Cl⁻ conductance at the basolateral membrane of the human early distal nephron where it plays an essential role in Cl⁻ transport (Jentsch, 2008; Fahlke and Fischer, 2010; Andrini et al., 2015). Type III Bartter syndrome that targets the thick ascending limb of Henle's loop (TAL) and distal convoluted tubule (DCT), originate from missense mutations of *CLCKNB* that lead to a loss of activity of ClC-Kb/barttin channel and hence, to the impairment of NaCl absorption by these parts of the renal tubule (Kramer et al., 2008; Stolting et al., 2014; Andrini et al., 2015). At least in rodents, intrarenal localization of ClC-K2, the murine ortholog of ClC-Kb is not restricted to the TAL and DCT. Results from *in situ* hybridization (Yoshikawa et al., 1999; Vitzthum et al., 2002), Northern blot analysis (Adachi et al., 1994) and RT- and real time-PCR of microdissected rat nephron segments (Kieferle et al., 1994; Vandewalle et al., 1997; Vitzthum et al., 2002; Waldegger et al., 2002), clearly showed expression of ClC-K2 and barttin mRNA in the connecting tubule (CNT) and the collecting duct. Furthermore, the use of antibodies recognizing both ClC-K2 and ClC-K1, a closely related ClC-K2 isoform, in *Clcnk1*^{-/-} mice, not only established the presence of ClC-K2 in TAL and DCT cell membranes of this species, but also localized ClC-K2 in the CNT and intercalated cells all along the collecting duct (Kobayashi et al., 2001). Its function at these later locations is not yet clear but, as for TAL and DCT cells, it very likely participates in transcellular NaCl absorption (Staruschenko, 2012; Eladari et al., 2014; Sepulveda et al., 2015). Due to the late identification of barttin, necessary to the production of macroscopic ClC-K anion currents in heterologous expression systems (Estevez et al., 2001; Waldegger et al., 2002), the properties of ClC-Kb channels are much less known than those elicited by other channels from the ClC family. Still, ClC-K channels display a feature unique among ClC isoforms in their increase in whole membrane conductance with extracellular Ca²⁺ and pH (Estevez et al., 2001; Waldegger et al., 2002; Gradogna et al., 2011). However, no information on the functional properties of murine ClC-K2 currents is currently available, attempts to detect currents after rat ClC-K2 expression in heterologous systems having failed (Kieferle et al., 1994; Waldegger and Jentsch, 2000), although one study very briefly reported the induction of anion currents by two rat ClC-K2 isoforms (Adachi et al., 1994).

Single-channel patch clamp studies on microdissected mouse DCT (Lourdel et al., 2003), DCT2 (Nissant et al., 2004), CNT and CCD intercalated cells (Nissant et al., 2006; Zaika et al., 2015) identified a ~10 pS Cl⁻ channel which displays an anionic selectivity sequence of Cl⁻ > NO₃⁻ > Br⁻ and sensitivities to external H⁺ and Ca²⁺ concentrations which relate well with properties of ClC-Kb. Here, we analyzed in detail the modulation of this ClC-K2-like Cl⁻ channel in the basolateral membrane of mouse CNT tubules by classical factors regulating the activity of ClC-K or ClC channels such as Cl⁻, Ca²⁺ and pH.

METHODS

Isolation of renal tubules.

The experiments were conducted according to the standards of the Veterinary Department of the French Ministry of Agriculture and procedures were approved by the ethics committee at the Pierre and Marie Curie University (agreement Ce5/2011/040). Tissue preparation was as previously described (Nissant et al., 2006). Briefly, 15-20 g male CD1 or C57BL/6 mice (Charles River Laboratories, Saint Germain sur l'Arbresle, France) were killed by cervical dislocation and the left kidney was perfused with L-15 Leibovitz medium (Sigma-Aldrich Chemie, Saint-Quentin Fallavier, France) supplemented with 300 U/ml Worthington CLS-2 collagenase (Coger, Paris, France) then removed. Small pieces of cortex were incubated at 37 °C for 30-60 minutes in the collagenase-containing medium, rinsed and kept at 4 °C until used.

Solutions and chemicals.

Patch pipettes were filled with a solution containing (in mM) 145 NMDG-Cl, 1 MgCl₂, 10 HEPES (or MES, depending on the pH). Unless otherwise stated, pipette solution was nominally calcium-free and adjusted to pH 7.4 with NaOH or *N*-Methyl-D-glucamine (NMDG). When appropriate, pipette solution calcium content was set to 5 mM by adding CaCl₂, or its pH was adjusted to 6.6-8 using NMDG. The tubules were initially bathed in physiological saline (PS) containing (in mM) 140 NaCl, 5 KCl, 1 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 glucose, 10 HEPES and adjusted to pH 7.4 with NaOH. NMDG-Cl was substituted for NaCl in the Na⁺-free solution used for determination of channels number in cell-attached patches (*see below*). Membrane patches were excised into a solution containing (in mM) 150 NMDG-Cl, 1 MgCl₂, 10 glucose, 10 HEPES (or MES or Trizma base, depending on the pH), 2 mM EGTA, 1 ATP and adjusted with NMDG to pH 6.6 to 8.0, when appropriate.

Small-conductance Cl⁻ channels undergo rapid rundown when excised in the inside-out configuration in PS (Lourdel et al., 2003; Nissant et al., 2006). Channel rundown was at least partially prevented by including EGTA (no added calcium) and 0.5-1 mM Mg-ATP in the perfusion solutions. Under this condition, channel activity was generally preserved for periods of time between 5 and 20 minutes.

Internal solutions containing Cl⁻ concentrations ranging 5 – 145 mM were obtained by

adding the appropriate amount of NMDG-Cl then adjusting osmolarity with sucrose.

Current recordings.

Single-channel currents were recorded from patches of basolateral membranes using the cell-attached and cell-excised inside-out configurations of the patch-clamp technique. Pipettes were pulled from Harvard Apparatus GC150T borosilicate glass (Phymep, Paris, France) in two stages using a P-97 puller (Sutter Instruments, Novato, CA, USA), coated with Sylgard[®] and heat polished. Single-channel currents were amplified with List LM-EPC7 or Bio-logic RK 400 patch-clamp amplifiers, filtered at 300 or 500 Hz by an 8-pole Bessel filter (LPBF-48DG, NPI Electronic, Tamm, Germany) and digitized at a sampling rate of 1-2 kHz using a Digidata 1200 analog-to-digital converter and P-Clamp software (Axon Instruments, Foster City, California, USA) for online monitoring and recording. All experiments were carried out at room temperature (22-27 °C).

Most of the experiments were done in the inside-out configuration where the number of channels per patch is more easily measured and the pH and solute concentrations in the internal solution best controlled.

Data analysis.

Stretches of data of 30s-1min duration after channel activity reached a steady state were analyzed for each condition. The NP_o was estimated according to the equation $NP_o = I / i$ where i is the unitary current amplitude and I is the time-averaged Cl^- current passing through the patch, taking the closed current level as reference. A striking property of the ~10 pS Cl^- channel is the astonishingly high number of channels per patch observed in the cell-attached and inside-out configurations. In addition, this channel has a slow kinetics with open and closed times in the second range. For these reasons, the NP_o cannot be determined by simple visual inspection of the recording but requires inhibiting channel activity. In cell-attached patches (*see Results*), the closed current level was obtained after inhibition of patch activity by low intracellular pH. For this purpose, the tubule was superfused with Na^+ -free solution supplemented with 0.25 mM N-ethylmaleimide (*NEM*; Sigma-Aldrich Chemie, Saint-Quentin Fallavier, France) as previously described (Nissant et al., 2006) or with 20 mM sodium acetate (Lourdel et al., 2003). In the inside-out configuration, the closed level was determined at acid pH or at the end of each

recording when channel activity has run down. The NP_o was usually expressed as % of the NP_o at +80 mV. In other cases, the absolute value of the NP_o and N , the apparent number of channels per patch were used to calculate P_o values. N was determined in each stretch of data by estimating the peak current amplitude. We also assessed the NP_o , N and P_o at +80 mV over a period of time of 2 minutes immediately after excision before any rundown has occurred, which are denoted $NP_o \text{ max}$, $N \text{ max}$ and $P_o \text{ max}$.

NP_o and P_o data points of i/V curves were fitted by Boltzmann's function

$$Y = \frac{Y \text{ min} - Y \text{ max}}{1 + e^{(V - V_{1/2})/K}} + Y \text{ min}$$

where V is a given membrane potential difference, $V_{1/2}$ is the potential difference yielding a half-maximal response, $Y \text{ min}$ and $Y \text{ max}$ are the minimum and maximum NP_o or P_o values, respectively, and K is the logarithmic sensitivity indicating an e -fold increase in membrane potential difference. OriginLab Corporation Origin[®] software (Ritme Informatique, Paris, France) was used to fit the data points to equations.

Statistics

Results are given as means \pm SEM for the indicated number of measurements (n). The statistical significance was evaluated by Student's t test or Mann-Whitney Rank Sum test when necessary using SyStat SigmaStat[®] software (Ritme Informatique, Paris, France). $P < 0.05$ was considered as significant.

RESULTS

Channel voltage-dependence in cell-attached membrane patches.

Figure 1A shows single-channel current recordings obtained from a cell-attached patch formed on the basolateral membrane of mouse CNT intercalated cells bathed in PS and using standard NMDG-Cl pipette solution. In this patch, up to 15 channels were observed and patch activity was voltage-dependent, NP_o increasing from 4.1 at -80 mV to 13.6 at +80 mV. The voltage-dependence observed in 9 separate experiments in these conditions is quantified in Figure 1.B. At a resting membrane potential of ~ -25 mV, as estimated in rabbit CNT intercalated cells (Muto et al., 1990), P_o was ~ 0.15 , a value representing 30-40 % of its value observed at a +80 mV clamp potential, but only slightly decreased at more negative voltages. A nonlinear least squares fit of mean data points with Boltzmann equation (*see Materials and Methods*) yield a K^{-1} value of 25.1 ± 8.1 mV and a $V_{1/2}$ of 50.9 ± 9.9 mV (Table I).

As reported in the following sections, a similar voltage-dependence was observed in the cell-excised inside-out configuration. In these experiments, single-channel currents were usually recorded over long steady state periods of time without sudden change in membrane potential. However, we first monitored the effects of sudden changes in membrane potential from +80 to -80 mV and back to +80mV in several inside-out patches to estimate the time course of the NP_o change. As illustrated in Figure 2A, switching membrane potential from +80 to -80 mV caused an initial peak in patch activity followed by a progressive decay towards steady state. An opposite time course, *i.e.* a progressive increase in patch activity, could be observed upon switching potential back to +80 mV (*not shown*). The relaxation currents could be fitted to a single exponential equation and yielded time constants of 18.7 ± 4 s ($n = 12$) for +80 to -80 mV transition and of 19.6 ± 7.6 s ($n = 6$) for -80 to +80 mV transition, indicating the involvement of a very slow component in the channel dependence on voltage.

At steady state, patch NP_o decreased upon membrane hyperpolarization (Figure 2B). Since changes in NP_o with membrane voltage can be due to variations in N , in P_o or both, we plotted these parameters at membrane potentials within the -80 to +80 mV range (Figure 2B, middle and right panels) and observed that variations in both parameters clearly paralleled the voltage-induced changes in NP_o .

Dependence of channel activity on external Ca^{2+} : modulation of the number of active channels.

In cell-attached patches from DCT cells, the effects of $[\text{Ca}^{2+}]_o$ have been related to a modulation in the number of active channels (N) without any change in the P_o , while external pH (pH_o) affected both N and P_o (Lourdel et al., 2003). Figure 3A shows that these effects of $[\text{Ca}^{2+}]_o$ were also seen in cell-excised patches from CNT cells. Here, we recorded patch activity at +80 mV during the first two minutes following patch excision into a calcium-free (2 mM EGTA added) and 1 mM ATP-containing NMDG-Cl solution, a condition previously shown to minimize channel rundown (Lourdel et al., 2003). Hereafter, the NP_o , N and P_o measured in these conditions, before any rundown has occurred, are denoted as the maximum NP_o ($NP_o \text{ max}$), maximum N ($N \text{ max}$) and maximum P_o ($P_o \text{ max}$). The $NP_o \text{ max}$ observed on separate patches was significantly higher with 5 mM $[\text{Ca}^{2+}]$ in the pipette solution ($n = 5$) as compared to calcium-free condition ($n = 5$; $P = 0.03$, unpaired t-test) (Figure 23, left panel). Furthermore, as previously seen in cell-attached patches from DCT cells, $[\text{Ca}^{2+}]_o$ clearly exerts its action through changes in the $N \text{ max}$, its value observed under high $[\text{Ca}^{2+}]_o$ being two-fold higher than with a nominally Ca^{2+} -free pipette solution ($P < 0.01$, $n = 5$) (Figure 3A, middle panel) while it had no significant influence on the $P_o \text{ max}$ ($P = 0.79$, $n = 5$) (Figure 3A, right panel).

In view of these results, we investigated a possible effect of $[\text{Ca}^{2+}]_o$ on channel voltage-dependence. Figure 2B shows recordings obtained from two separate inside-out patches externally bathed with either a nominally calcium-free or a 5mM calcium-containing pipette solution, adjusted at pH 7.4, at both +80 and -80 mV. Under both conditions, patch activity increased with depolarization, NP_o raising from ~ 0.03 at a clamp potential of -80 mV to ~ 1.7 at +80 mV under calcium-free conditions, and from 3.6 at -80 mV to 17.1 at +80 mV with 5 mM external calcium. Figure 2C summarizes results from 5 separate experiments and shows that $[\text{Ca}^{2+}]_o$ had no influence on channel voltage-dependence, the NP_o/V_c relationships obtained under both conditions being nearly superimposed (see Table 1). These results indicate that $[\text{Ca}^{2+}]_o$ affects exclusively the apparent number of active channels in a voltage-independent manner.

Dependence of channel activity on external H⁺: modulation of the number of active channels and shift of the voltage dependence curve.

As shown in Figure 4A left panel, the *NPo* max observed upon excision when the pH of pipette solution was set at 6.6 (n = 5) was ~ 4.5 fold lower than the one observed at *pHo* 8.0 (n= 5) ($P = 0.005$, unpaired t-test). Furthermore, consistent with previous observations in DCT cell-attached patches (Lourdel et al., 2003), the change in *NPo* max resulted from a major change in *Nmax* ($P = 0.003$, unpaired t-test) and a more moderate change in *Po* max ($P = 0.025$, unpaired t-test) (middle and right panels).

Figure 4B shows cell-excised inside-out recordings from two separate patches bathed under symmetrical NMDG-Cl solutions, external pH (*pHo*) being set at either 6.6 or at 8.0, at both +80 and -80 mV. In this experimental series, $[Ca^{2+}]_o$ was 5 mM and the pH of the bath solution was adjusted at 7.4. Under both *pHo* conditions, patch activity clearly increased with depolarization, rising in these examples from 0.68 at -80 mV to 2.23 at +80 mV at *pHo* 6.6, and from 3.05 at -80 mV to 9.18 at +80 mV at *pHo* 8.0.

The mean *NPo/Vc* curves obtained from separate experiments under *pHo* 6.6, 7.4 and 8.0 are compared in Figure 4C, left panel. In contrast with external calcium, *pHo* clearly affected channel voltage-dependence, acidification of the external solution shifting the voltage- dependence curve towards positive voltages (see Table 1). The mean *V1/2* values were plotted as a function of *pHo* and data were reasonably well described by a straight line with a slope of 17 ± 5.6 mV / pH unit, corresponding to a ~ 7 mV per *e*-fold change in the external H⁺ concentration (Figure 4C, right panel). As a consequence, the small decrease in *Po* max observed with external acidification might possibly be due to the *pHo*-dependent shift in voltage- dependence.

Limited effect of intracellular Cl⁻ on channel activity

We measured channel activity at +80 and -80 mV, while decreasing $[Cl^-]_i$ from 147 to 7 mM (Fig. 5). Channel activity did not change much for $[Cl^-]_i$ ranging from 147 to 14.5 mM but decreased to $64.6 \pm 11.4\%$ (n =3) and $31.7 \pm 8.8\%$ (n =4) of the *NPo* at 147 mM for $[Cl^-]_i=7$ mM.

Sensitivity to intracellular H⁺: effect on the number of active channels and flattening of the voltage-dependence curve.

Previous studies (Lourdel et al., 2003; Nissant et al., 2004; Nissant et al., 2006) showed that the activity of the Cl⁻ channel is also sensitive to intracellular pH (*pHi*).

Figure 6A reports measurements of maximum patch activity during the first two minutes following patch excision into a calcium-free and ATP-containing NMDG-Cl solution, while internal pH (*pHi*) was adjusted to either 7.0 or 7.8. Our results revealed that patch excision into a pH 7.0 solution at +80mV caused a ~ 6-fold decrease in *NPo max* (n = 7) as compared to excision into a pH 7.8 solution (n = 6) ($P = 0.029$, unpaired t-test) (left panel). These effects occurred through major change in the number of active channels, a decrease in *pHi* from 7.8 to 7.0 causing a ~ 4-fold reduction of *Nmax* ($P = 0.011$, unpaired t-test), without significant reduction in *Po max* ($P = 0.13$, unpaired t-test) (Figure 2C, middle and right panels).

To investigate whether *pHi* modulates voltage-dependence, we monitored channel activity at positive and negative potentials for three distinct pH on the same patches (Fig. 6B&C). Fig. 6B shows the current recordings obtained from one inside-out patch under these conditions: *NPo* at +80 mV increased from 5.4 at *pHi* 7.0 to 19.3 at *pHi* 7.4 and up to 47.8 at *pHi* 7.8. They also reveal a similar effect of *pHi* at negative potential difference (-80 mV) since, on the same patch, *NPo* increased from 1.5 at *pHi* 7.0 to 6.5 at *pHi* 7.4 and up to 21.3 at *pHi* 7.8 at this clamp potential. A quantitation of the results of 5 similar experiments is given in Figure 6C. After data normalization to respective *NPo* value obtained at *pHi* 7.8, it can first be seen that *pHi* significantly altered *NPo* ($P < 0.0001$ at either potential, Anova test) (Left panel). However, the effects of *pHi* on *NPo* at -80 mV appeared slightly more pronounced as compared to those at +80 mV. Since changes in *NPo* with *pHi* can be due to variations in *Po*, in *N* or both, we plotted these parameters for each experimental situation (Figure 5B, middle and right panels). Variations in *N* paralleled the *pHi*-induced changes in *NPo* at both voltages ($P < 0.0001$ for either potential, Anova test). By contrast, the *Po* clearly displayed differential sensitivity to voltage since reducing *pHi* significantly decreased *Po* at -80 mV ($P < 0.0001$, Anova test), but had no influence on *Po* at +80 mV ($P = 0.76$, Anova test). Therefore, although *N* appears the most *pHi*-sensitive parameter, the differential sensitivity of *Po* may account for a possible effect of *pHi* on channel voltage-dependence.

We therefore assessed the effects of *pHi* on the voltage-dependence of the channel by

establishing NPo/Vc curves while varying pHi over the 7.0 – 8 range. Figure 8A shows that varying pHi had a dramatic effect on channel voltage-dependence, internal alkalization inducing a progressive flattening of the voltage-dependence curve (Fig 8B), without any detectable influence on K^{-1} and $V1/2$ (see Table 1).

DISCUSSION

Using single-channel patch clamp analysis on native mouse tissue, we and others have shown that a ~10 pS Cl⁻ channel provides the major route for basolateral step of Cl⁻ absorption in the DCT and the intercalated cells of CNT and CCD. Preliminary experiments also suggest that the same channel is present in the TAL (Teulon et al., 2005). Anion selectivity, regulation by external Ca²⁺ and H⁺, and expression along the distal nephron (Lourdel et al., 2003; Nissant et al., 2004; Nissant et al., 2006; Zaika et al., 2015) strongly suggest that this channel might be underlain by ClC-K2 (Estevez et al., 2001; Waldegger et al., 2002). However, because recombinant ClC-K2 has yet not been studied at the single channel level due to problems in heterologous expression, direct proof of the molecular identity of this ~10 pS Cl⁻ channel is still lacking. Nevertheless, in the following, we consider the ~10 pS Cl⁻ channel as a likely ClC-K2- candidate, and discuss our results in the context of ClC biophysical properties.

Voltage-dependence

Voltage-dependence appears to be a characteristic property of the ~10 pS Cl⁻ channel. The electrophysiological properties of recombinant mouse or rat ClC-K2 have never been investigated while the data available on ClC-Kb are contradictory. In the oocyte expression system, ClC-Kb activates slightly at positive voltages and deactivates at negative voltages (Estevez et al., 2001; Waldegger et al., 2002; Picollo et al., 2004; Gradogna et al., 2011), which is in agreement with what we observed for mouse ~10 pS Cl⁻. By contrast, no relaxation components are seen when ClC-Kb is recorded from transfected cultured cells (Estevez et al., 2001; Scholl et al., 2006; Fahlke and Fischer, 2010), suggesting that voltage dependence cannot be detected under this condition. There is no clear explanation to this phenomenon, which could possibly be related to differences in voltage pulse protocols. In this study, we found that the relaxation time constant when stepping the membrane potential from -80 to +80 mV was close to 20s. Such a long process can be missed in voltage-clamp protocols. Our results show that

voltage-dependence of the ~10 pS Cl⁻ channel has two components: hyperpolarization decreases the number of active channels, a phenomenon occurring in tens of seconds, and decreases the open probability of the remaining active channels. This second phenomenon also involves slow processes: we have previously analyzed the kinetics of the ~10 pS Cl⁻ channel and measured two open states of 0.3s and 2.2s and one very long closed state of 6.5s (Lourdel et al., 2003).

Modulation of channel activity by extracellular factors: Ca²⁺ and pH

Uchida et al (Uchida et al., 1994) were the first to demonstrate that the rat ClC-K1 was stimulated by extracellular Ca²⁺ and inhibited at acid *pHo*. This result was confirmed after the discovery of Barttin, when it was demonstrated that the sensitivity to external pH and Ca²⁺ was a general property of ClC-K channels (Estevez et al., 2001; Waldegger et al., 2002). At the time, we used this property to check that the native ~10 pS Cl⁻ channel that we described in the mouse renal tubule had ClC-K-like properties (Lourdel et al., 2003; Nissant et al., 2006). More recently, Gradogna et al (Gradogna et al., 2011) showed that Ca²⁺ and H⁺ effects were independent, and accordingly identified separate binding sites for external H⁺ and Ca²⁺ (Gradogna et al., 2011).

Our results give some insight into the mechanisms whereby pH and Ca²⁺ modulate the activity of the ~10 pS Cl⁻ channel. First, there is no effect on single-channel conductance. Second, [Ca²⁺]_o has no influence on channel voltage-dependence, while acid *pHo* shifts the voltage-dependence curve towards more positive voltages. These results compare well with those obtained on recombinant ClC-Kb in the oocyte expression system where depolarization-activated relaxation is not modified by external Ca²⁺ while it is attenuated at alkaline pH (Gradogna et al., 2011). Third, our results indicate that the number of active channels is the major target of these regulatory factors.

Modulation of channel activity by intracellular factors: pH and Cl⁻

The intracellular pH is a common modulator of ClC Cl⁻ channels but has never been investigated on recombinant ClC-K. We previously demonstrated that the ~10 pS Cl⁻ channel was profoundly sensitive to pH (Lourdel et al., 2003; Nissant et al., 2006) while the ClC-K1 candidate, ~45 pS Cl⁻ channel was hardly sensitive to this parameter (Paulais and Teulon, 1990). The present study suggests that *pHi* is a more potent modulator of channel activity than *pHo*. Indeed, Changing *pHo* from 6.6 to 7.8 (1.2 pH unit change) induced a 4.5-fold increase in channel activity while a smaller *pHi* change from 7.0 to 7.8 (0.8 pH unit change) induced a 6.2-fold increase in channel activity. As for *pHo* and [Ca²⁺]_o, the major effect of *pHi* seems to be on the number of active channels.

[Cl⁻]_i –dependence is a general property of ClC Cl⁻ channels but is prominent in the case of ClC-2. It was reported that an increase in [Cl⁻]_i dramatically shifted the activation of ClC-2 hyperpolarization –activated channel towards more positive voltages (Niemeyer et al., 2003) (Pusch et al., 1999). By contrast, [Cl⁻]_i variations appear to have little effect on the ~10 pS Cl⁻ channel, since a very low concentration (below ~10mM) is necessary to induce clear inhibition.

Mechanisms involved in the regulation of ~10 pS Cl⁻ channel

The ClC channels are functional dimers, whose activity is controlled by two independent processes, the two *protopore* gates, working independently from each other, and the *common* gate, opening / closing simultaneously the two protopores (Pusch, 2004; Chen, 2005; Jentsch, 2008). The mechanism of the protopore gate involves the protonation/deprotonation of a glutamate residue, which is absent in the ClC-K channels. The mechanisms of the *common* gate are not elucidated; it functions as an inactivation process driven by depolarization in ClC-0 and ClC-2 and by hyperpolarization in ClC-1. It can be very slow (tens of seconds) as in ClC-0 or relatively fast (hundreds of milliseconds as in ClC-1).

The effects of negative voltage, low [Ca²⁺]_o, or acid *pHi* / *pHo* are mainly due to the decrease in the apparent number of active channels. We may reasonably propose that, under these conditions, a fraction of the channels present in the membrane patch enter

in an electrically quiescent state and do not contribute to the pool of electrically active channels over a time scale of tens of seconds. In other words, voltage, H^+ and Ca^{2+} are primarily acting on a very slow process, likely the *common* gate. According to this hypothesis, possible conformational changes upon increased $[Ca^{2+}]_o$ would stabilize the channel in an activated mode, increasing the number of active channels on the membrane patch, whereas H^+ would oppositely stabilize the channel in an inactivated state and increase the number of electrically quiescent channels.

Voltage-dependence includes a second component, i.e., the decrease of the open probability at negative voltages. Although faster, this second phenomenon remains a slow one if we consider that channel kinetics is in the second-range (Lourdel et al., 2003). In CIC-0 and CIC-1, the open probability of the protopore is activated by depolarization and due to Cl^- flux through the pore. It is tempting to consider that this second voltage-dependent component relies on protopore activity. However, since the CIC-K channels lack the characteristic “glutamate” at the position 166, channel gating is expected to be controlled mainly by the common gate. Accordingly, the protopore conductance is only rarely detected in the CIC-K2 candidate or recombinant mouse CIC-K1 (under the form of short-lived, half-openings), while it is clearly observed after insertion of a glutamate at position 166 in mouse CIC-K1. Likewise, in the present experiments, we did not notice that half-openings were more frequent in particular conditions of voltage, pH or Ca^{2+} . As a consequence, voltage-dependence operating on protopores should affect both protopores simultaneously, which is difficult to apprehend. On purely speculative grounds, we may suggest the following alternative: either protopore gating persists in the CIC-K channels under a specific, yet undetermined form, which would be independent of the glutamate at the position 166; or CIC-K2 is endowed with a second common gate, functioning independently of the first one.

Comparison with the effects of pH_o and pH_i on CIC-0 and CIC-1

Voltage-dependence and regulation by pH are common characteristics of CIC Cl^- channels. However, CIC-0 and CIC-1, instead of being inhibited by acidification as CIC-K2 candidate, are activated at acid external / internal pH (Hanke and Miller, 1983; Rychkov et al., 1996; Chen and Chen, 2001; Zifarelli et al., 2008). Specifically, pH_i and pH_o affect voltage-dependence of the *protopore* gate in two contrasting ways. Intracellular acidification leads to a

shift of the voltage-dependence curve towards hyperpolarizing voltages (Hanke and Miller, 1983; Rychkov et al., 1996; Zifarelli et al., 2008) while extracellular acidification enhances the minimum P_o at negative voltages (Rychkov et al., 1996; Chen and Chen, 2001). This is clearly a mirror-image of our results (Fig 8) since, in the case of the ~ 10 pS Cl^- channel, intracellular alkalinization augments the minimum P_o at negative voltages while extracellular alkalinization shifts the voltage-dependent curve towards more negative voltages. In other words, OH^- ions acting on the ~ 10 pS Cl^- channel affect the P_o in a similar way as H^+ ions acting on ClC-0 and ClC-1 from the opposite side of the membrane. This puzzling observation suggests some obscure link between the regulations in the two types of ClC channels; it also reinforces the idea that voltage-dependence involves a protopore mechanism.

The ~ 10 pS Cl^- channel in the context of physiology

The ~ 10 pS Cl^- channel is expected to play a major role in NaCl absorption along the distal nephron including the β intercalated cells, by mediating the basolateral step of Cl^- absorption (Staruschenko, 2012; Wall and Weinstein, 2013; Eladari et al., 2014; Andrini et al., 2015; Sepulveda et al., 2015). Variation in the number of active channels appears as a well-adapted mode of regulation, for this channel is present at very high density in the basolateral membranes of the distal nephron (up to 80 channels per patch at alkaline pH or in the presence of 5 mM Ca^{2+}) (Lourdel et al., 2003; Nissant et al., 2006). A similar mechanism might operate for regulation of this channel by PKC, PI3 kinase and MAP kinase (Lourdel et al., 2003; Zaika et al., 2015). In cell-attached patches, we observed that PKC progressively inhibited the channel by reducing the apparent number of channels (Lourdel et al., 2003).

Our results indicate that the ~ 10 pS Cl^- channel is sensitive to four intrinsic factors, voltage, extracellular Ca^{2+} , intracellular Cl^- and pH. Since the NP_o is relatively constant over the range -80 / -20 mV, voltage-dependence should have minimal physiological influence, except in alkaline condition. The physiological influence of Ca^{2+} -dependent regulation appears equally limited, the increase in NP_o over the whole range of Ca^{2+} tested (0 - 5 mM) being modest (2-fold). $[\text{Cl}^-]_i$ -dependence might be more significant, at least under condition of depleted chloride. $[\text{Cl}^-]_i$ values of 10 - 20 mM in the DCT (Beck et al., 1988; Weinstein, 2005a), and 25 - 50 mM in the TAL and the intercalated cells of the CNT/CCD

(Greger et al., 1983; Beck et al., 1988; Weinstein, 2005b) have been reported. These values are probably too high to influence channel activity. However, $[Cl^-]_i$ decreases to 7 mM when NaCl absorption in the TAL is inhibited by furosemide (Greger et al., 1983). At this low concentration, the ~10 pS Cl^- channel would become sensitive to $[Cl^-]_i$ and partially inactivate. This can be viewed as a safety mechanism limiting Cl^- exit when Cl^- entry is inhibited.

Thus *pHi*-dependence appears as the most sensitive regulator of channel activity, in particular because the increase in the apparent number of channels and P_o might cooperate to augment dramatically the activity of the ~10 pS Cl^- channel at alkaline *pHi*. Furthermore, under conditions of alkalosis or acidosis, the variation in *pHo* may be reflected by a parallel change in *pHi*. The two factors may then combine to exaggerate pH-effects on channel activity. In sum, pH acting through the combined effects of *pHi* and *pHo* is potentially a key regulator of the ~10 pS Cl^- channel, one that should influence NaCl absorption, directly by modulating basolateral Cl^- conductance, and indirectly by acting on $[Cl^-]_i$. In the DCT, alkalization would tend to decrease $[Cl^-]_i$ if the activity of the apical Na^+Cl^- cotransporter NCC does not change. In turn, $[Cl^-]_i$ lowering would enable Cl^- -dependent regulation of WNK4 and activates NCC (Bazua-Valenti and Gamba, 2015), thus setting $[Cl^-]_i$ at an intermediate value. Overall, alkalization would stimulate NaCl absorption via the double activation of NCC and ClC-K2. In the \square intercalated cells where apical Pendrin is inhibited at alkaline pH (Azroyan et al., 2011), the effects of *pH* variations would be uncertain: alkaline pH would inhibit Pendrin while increasing Cl^- conductance, thus decreasing $[Cl^-]_i$ to low value and secondarily inhibiting ClC-K2, and Cl^- absorption. Acid pH would stimulate Pendrin while inhibiting ClC-K2. The result would be an increase in $[Cl^-]_i$ of unknown physiological significance and inhibition of NaCl absorption.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from French Research National Agency (ANR-14-CE12-0013-02) and ECOS-sud (C14-S01). The English text was edited by Charlotte Sumida. The present address of A. Nissant is CNRS UMR3571, Institut Pasteur, 25 rue du Dr Roux, 75015 Paris France.

The authors declare no competing financial interests.

REFERENCES

- Adachi, S., S. Uchida, H. Ito, M. Hata, M. Hiroe, F. Marumo, and S. Sasaki. 1994. Two isoforms of a chloride channel predominantly expressed in thick ascending limb of Henle's loop and collecting ducts of rat kidney. *J Biol Chem.* 269:17677-17683.
- Andrini, O., M. Keck, R. Briones, S. Lourdel, R. Vargas-Poussou, and J. Teulon. 2015. Cl⁻-K chloride channels: Emerging pathophysiology of Bartter syndrome type 3. *Am J Physiol Renal Physiol.* ajprenal 00004 02015.
- Azroyan, A., K. Laghmani, G. Crambert, D. Mordasini, A. Doucet, and A. Edwards. 2011. Regulation of pendrin by pH: dependence on glycosylation. *Biochem J.* 434:61-72.
- Bazua-Valenti, S., and G. Gamba. 2015. Revisiting the NaCl cotransporter regulation by With No-lysine Kinases. *Am J Physiol Cell Physiol.* ajpcell 00065 02015.
- Beck, F.X., A. Dorge, R. Rick, M. Schramm, and K. Thureau. 1988. The distribution of potassium, sodium and chloride across the apical membrane of renal tubular cells: effect of acute metabolic alkalosis. *Pflugers Arch.* 411:259-267.
- Chen, M.F., and T.Y. Chen. 2001. Different fast-gate regulation by external Cl⁻ and H⁺ of the muscle-type Cl⁻ chloride channels. *J Gen Physiol.* 118:23-32.
- Chen, T.Y. 2005. Structure and function of clc channels. *Annu Rev Physiol.* 67:809-839.
- Eladari, D., R. Chambrey, N. Picard, and J. Hadchouel. 2014. Electroneutral absorption of NaCl by the aldosterone-sensitive distal nephron: implication for normal electrolytes homeostasis and blood pressure regulation. *Cell Mol Life Sci.* 71:2879-2895.
- Estevez, R., T. Boettger, V. Stein, R. Birkenhager, E. Otto, F. Hildebrandt, and T.J. Jentsch. 2001. Barttin is a Cl⁻ channel beta-subunit crucial for renal Cl⁻ reabsorption and inner ear K⁺ secretion. *Nature.* 414:558- 561.

- Fahlke, C., and M. Fischer. 2010. Physiology and pathophysiology of CLC-K/barttin channels. *Front Physiol.* 1:3-12.
- Gradogna, A., E. Babini, A. Picollo, and M. Pusch. 2011. A regulatory calcium-binding site at the subunit interface of CLC-K kidney chloride channels. *J Gen Physiol.* 136:311-323.
- Greger, R., H. Oberleithner, E. Schlatter, A.C. Cassola, and C. Weidtko. 1983. Chloride activity in cells of isolated perfused cortical thick ascending limbs of rabbit kidney. *Pflugers Arch.* 399:29-34.
- Hanke, W., and C. Miller. 1983. Single chloride channels from Torpedo electroplax. Activation by protons. *J Gen Physiol.* 82:25-45.
- Jentsch, T.J. 2008. CLC chloride channels and transporters: from genes to protein structure, pathology and physiology. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 43:3-36.
- Kieferle, S., P. Fong, M. Bens, A. Vandewalle, and T.J. Jentsch. 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.
- Kobayashi, K., S. Uchida, S. Mizutani, S. Sasaki, and F. Marumo. 2001. Intrarenal and cellular localization of CLC-K2 protein in the mouse kidney. *J Am Soc Nephrol.* 12:1327-1334.
- Kramer, B.K., T. Bergler, B. Stoelcker, and S. Waldegger. 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.
- Lourdel, S., M. Paulais, P. Marvaot, A. Nissant, and J. Teulon. 2003. A chloride channel at the basolateral membrane of the distal-convoluted tubule: a candidate CLC-K channel. *J Gen Physiol.* 121:287-300.

- Muto, S., K. Yasoshima, K. Yoshitomi, M. Imai, and Y. Asano. 1990. Electrophysiological identification of α - and β -intercalated cells and their distribution along the rabbit distal nephron segments. *J Clin Invest.* 86:1829-1839.
- Niemeyer, M.I., L.P. Cid, L. Zuniga, M. Catalan, and F.V. Sepulveda. 2003. A conserved pore-lining glutamate as a voltage- and chloride-dependent gate in the ClC-2 chloride channel. *J Physiol.* 553:873-879.
- Nissant, A., S. Lourdel, S. Baillet, M. Paulais, P. Marvao, J. Teulon, and M. Imbert-Teboul. 2004. Heterogeneous distribution of chloride channels along the distal convoluted tubule probed by single-cell RT-PCR and patch clamp. *Am J Physiol Renal Physiol.* 287:F1233-1243.
- Nissant, A., M. Paulais, S. Lachheb, S. Lourdel, and J. Teulon. 2006. Similar chloride channels in the connecting tubule and cortical collecting duct of the mouse kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 290:F1421-1429.
- Paulais, M., and J. Teulon. 1990. cAMP-activated chloride channel in the basolateral membrane of the thick ascending limb of the mouse kidney. *J Membr Biol.* 113:253-260.
- Piccolo, A., A. Liantonio, M.P. Didonna, L. Elia, D.C. Camerino, and M. Pusch. 2004. Molecular determinants of differential pore blocking of kidney ClC-K chloride channels. *EMBO Rep.* 5:584-589.
- Pusch, M. 2004. Structural insights into chloride and proton-mediated gating of ClC chloride channels. *Biochemistry.* 43:1135-1144.
- Pusch, M., S.E. Jordt, V. Stein, and T.J. Jentsch. 1999. Chloride dependence of hyperpolarization-activated chloride channel gates. *J Physiol.* 515 (Pt 2):341-353.
- Rychkov, G.Y., M. Pusch, D.S. Astill, M.L. Roberts, T.J. Jentsch, and A.H. Bretag. 1996. Concentration and pH dependence of skeletal muscle chloride channel ClC-1. *J Physiol.* 497 (Pt 2):423-435.

- Scholl, U., S. Hebeisen, A.G. Janssen, G. Muller-Newen, A. Alekov, and C. Fahlke. 2006. Barttin modulates trafficking and function of ClC-K channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:11411-11416.
- Sepulveda, F.V., L. Pablo Cid, J. Teulon, and M.I. Niemeyer. 2015. Molecular Aspects of Structure, Gating, and Physiology of pH-Sensitive Background K₂P and Kir K⁺-Transport Channels. *Physiol Rev*. 95:179- 217.
- Staruschenko, A. 2012. Regulation of transport in the connecting tubule and cortical collecting duct. *Compr Physiol*. 2:1541-1584.
- Stolting, G., M. Fischer, and C. Fahlke. 2014. CLC channel function and dysfunction in health and disease. *Front Physiol*. 5:378.
- Teulon, J., S. Lourdel, A. Nissant, M. Paulais, R. Guinamard, P. Marvao, and M. Imbert-Teboul. 2005. Exploration of the basolateral chloride channels in the renal tubule using. *Nephron Physiol*. 99:p64-68.
- Uchida, S., and S. Sasaki. 2005. Function of chloride channels in the kidney. *Annu Rev Physiol*. 67:759-778.
- Uchida, S., S. Sasaki, T. Furukawa, M. Hiraoka, T. Imai, Y. Hirata, and F. Marumo. 1994. Molecular cloning of a chloride channel that is regulated by dehydration and expressed predominantly in kidney medulla. *J Biol Chem*. 269:19192.
- Vandewalle, A., F. Cluzeaud, M. Bens, S. Kieferle, K. Steinmeyer, and T.J. Jentsch. 1997. Localization and induction by dehydration of ClC-K chloride channels in the rat kidney. *Am J Physiol*. 272:F678-688.
- Vitzthum, H., H. Castrop, M. Meier-Meitingner, G.A. Riegger, A. Kurtz, B.K. Kramer, and K. Wolf. 2002. Nephron specific regulation of chloride channel CLC-K2 mRNA in the rat. *Kidney Int*. 61:547-554.

- Waldegger, S., N. Jeck, P. Barth, M. Peters, H. Vitzthum, K. Wolf, A. Kurtz, M. Konrad, and H.W. Seyberth. 2002. Barttin increases surface expression and changes current properties of ClC-K channels. *Pflugers Arch.* 444:411-418.
- Waldegger, S., and T.J. Jentsch. 2000. Functional and structural analysis of ClC-K chloride channels involved in renal disease. *J Biol Chem.* 275:24527-24533.
- Wall, S.M., and A.M. Weinstein. 2013. Cortical distal nephron Cl(-) transport in volume homeostasis and blood pressure regulation. *Am J Physiol Renal Physiol.* 305:F427-438.
- Weinstein, A.M. 2005a. A mathematical model of rat distal convoluted tubule. I. Cotransporter function in early DCT. *Am J Physiol Renal Physiol.* 289:F699-720.
- Weinstein, A.M. 2005b. A mathematical model of rat distal convoluted tubule. II. Potassium secretion along the connecting segment. *Am J Physiol Renal Physiol.* 289:F721-741.
- Yoshikawa, M., S. Uchida, A. Yamauchi, A. Miyai, Y. Tanaka, S. Sasaki, and F. Marumo. 1999. Localization of rat CLC-K2 chloride channel mRNA in the kidney. *Am J Physiol.* 276:F552-558.
- Zaika, O., M. Mamenko, N. Boukelmoune, and O. Pochynyuk. 2015. IGF-1 and insulin exert opposite actions on ClC-K2 activity in the cortical collecting ducts. *Am J Physiol Renal Physiol.* 308:F39-48.
- Zifarelli, G., A.R. Murgia, P. Soliani, and M. Pusch. 2008. Intracellular proton regulation of ClC-0. *J Gen Physiol.* 132:185-198.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Channel voltage dependence in the cell-attached configuration. *A)* Representative current recordings at the clamp membrane potentials values indicated on the right-hand side of each trace. CNT tubules were bathed in PS solution and pipettes were filled with standard NMDG-Cl solution. The dotted lines (C-) indicate the closed channels current level for each clamp potential, after acidification of the intracellular compartment as described in the *Materials and Methods* section. *B)* Single-channel open probability (P_o) / clamp potential (V_c) relationship obtained in the conditions given in *A*. Each point is the mean of 9 measurements and SEM are shown as error bars. The line is a non-linear least squares fit of data points using a Boltzmann equation.

Figure 2. Channel voltage dependence in the cell-excised inside-out configuration.

A) Time course of the change in channel activity upon switching membrane potential from +80 to - 80 mV. Experiments were performed under symmetrical pH 7.4 NMDG-Cl solutions. The dotted line (C-) indicate the closed channels current level. The recording begins at + 80 mV where approximately 30 channels could be observed. Upon setting membrane potential to -80 mV, patch activity initially reached a level close to that observed at +80 mV then progressively decreased towards a steady level where only 3-4 channels were observed. In this example, the e-fold decrease in channel activity occurred in ~ 15 seconds. *B)* Analysis of the effects of membrane voltage on mean patch activity (NP_o , left panel), channels number (N) and single channel open probability (P_o) (right panel) at steady state, in the

conditions given in A. For each graph, parameters are normalized to their respective values at +80 mV and data are given as means of 7 to 10 measurements, and SEM are shown as error bars.

Figure 3. Effets of external Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_o$). **A)** Experiments were performed under symmetrical NMDG-Cl solutions. Maximum channel activity ($NP_{o\max}$), number of active channels (N_{\max}) and open probability ($P_{o\max}$) were measured within two minutes after patch excision into a calcium-free (2 mM EGTA) and 1 mM ATP-containing solution, in the presence of the indicated $[\text{Ca}^{2+}]_o$ values. Both pipette and bath solutions were adjusted to pH

7.4. Each bar is the mean of 5 separate measurements and SEM are shown as error bars. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$, unpaired Student t-test. **B)** Representative current recordings from two separate cell-excised inside-out membrane patches, at the indicated clamp membrane potentials and under either calcium-free (0 Ca) or 5 mM (5 Ca) external conditions. Membrane patches were symmetrically bathed by the NMDG-Cl solution adjusted at 7.4, the internal solution also containing 1 mM ATP. The dotted lines indicate the closed (C-) channels current levels. The inset is an excerpt of the trace at +80mV under 5 mM external Ca^{2+} , at the expanded time-scale indicated by an asterisk allowing observation of single-channel events in these conditions.

C) Mean channel activity (NP_o) / V_c relationship obtained in the conditions given in A, under calcium-free pipette conditions (\square) or with 5 mM Ca^{2+} in the pipette (\bullet). For each condition, the NP_o values are expressed as % of the respective NP_o at +80 mV. Each point is the mean of 5 measurements and SEM are shown as error bars when larger than symbols. Continuous and dotted lines are non-linear least squares fits of Ca^{2+} -free and 5 mM Ca^{2+} data, respectively, using a Boltzmann equation yielding $K^{-1} = 28 \pm 4.5$ mV, $V_{1/2} = 29.8 \pm 4.8$ mV, $NP_{o\min} = 8.4 \pm 2.9$ % and $NP_{o\max} = 114 \pm 8$ % ($r^2 = 0.997$) for Ca^{2+} -free condition and $K^{-1} = 28.3 \pm 9.9$ mV, $V_{1/2} = 31.2 \pm 10.8$ mV, $NP_{o\min} = 11 \pm 6$ % and $NP_{o\max} = 115 \pm 18.6$ % ($r^2 =$

0.988) for 5 mM external Ca^{2+} .

Figure 4. Effects of external pH (pH_o). **A)** Experiments were performed under symmetrical NMDG-Cl solutions. Maximum channel activity ($NP_{o\max}$), number of active channels (N_{\max}) and open probability ($P_{o\max}$) were measured within two minutes after patch excision into a calcium-free (2 mM EGTA) and 1 mM ATP-containing solution, in the presence of the indicated pH_o . Pipette $[\text{Ca}^{2+}]$ was set at 5 mM. Each bar is the mean of 5 separate measurements and SEM are shown as error bars. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$, unpaired Student t- test. **B)** Representative current recordings from two separate cell-excised inside-out membrane patches, at the indicated clamp membrane potentials and under external (pipette) pH (pH_o) 6.6 and 8.0 conditions, the pipette solution containing 5 mM Ca^{2+} . The NMDG-Cl solution was present on both sides of the patch membrane. The dotted lines indicate the closed (C-) channels current levels. **C)** Mean channel activity (NP_o) / voltage (V_o) relationships obtained in the conditions given in **A** and being adjusted at either pH_o 8.0 (■), 7.4 (●) or 6.6 (▲). The NP_o is expressed as % of the respective NP_o at +80 mV for each pH_o condition. Each point is the mean of 5 (pH_o 6.6 and 8.0) or 6 (pH_o 7.4) measurements and SEM is shown as error bar when larger than symbol. Continuous lines are non-linear least squares fits of respective data, using a Boltzmann equation yielding $K^{-1} = 20 \pm 2.8$ mV, $V_{1/2} = 12 \pm 3.9$ mV and $NP_{o\min} = 42 \pm 2.1$ % ($r^2 = 0.992$) at pH_o 8.0, $K^{-1} = 20 \pm 5.9$ mV, $V_{1/2} = 22 \pm 7$ mV and $NP_{o\min} = 32 \pm 4.5$ % ($r^2 = 0.968$) at pH_o 7.4, $K^{-1} = 16 \pm 2.9$ mV, $V_{1/2} = 42 \pm 3.1$ mV and $NP_{o\min} = 35 \pm 2.2$ % ($r^2 = 0.982$) at pH_o 6.6. **C)** Summary of $V_{1/2}$ values obtained in the pH_o 6.6-8.0 range. Each point is the mean of 5 to 6 measurements and SEM is shown as error bar. Data were fitted by a straight line with a slope of 17 ± 5.6 mV / pH unit, corresponding to a ~ 7.5 mV per e -fold change in the external H^+ concentration.

Figure 5. Effect of intracellular chloride. Experiments were performed in the cell-excised inside-out configuration, while setting internal NMDG-Cl⁻ concentration at the indicated values. At clamp voltages of either -80 mV (●) or +80 mV (○). Each point is the mean of 3 to 7 measurements and SEM are shown as error bars.

Figure 6. Effects of intracellular pH (*pH_i*). **A)** Experiments were performed under symmetrical NMDG-Cl solutions. Maximum channel activity (*NP_omax*), number of active channels (*Nmax*) and open probability (*P_omax*) were measured within two minutes after patch excision into a calcium-free (2 mM EGTA) and 1 mM ATP-containing solution, in the presence of the indicated *pH_i* values. [*Ca²⁺*]_o and *pH_o* were set at 5 mM and 7.4, respectively. For all conditions, the height of each bar is the mean of 5 separate measurements and SEM are shown as error bars. * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01, *** *P* < 0.005, unpaired Student t-test. **B)** Channel current recordings obtained from the same inside-out patch symmetrically bathed with NMDG-Cl solution. Pipette solution contained 5 mM Ca²⁺ and was adjusted at pH 7.4, while bath solution was calcium-free and supplemented with 1 mM ATP. Each trace was obtained at either +80 mV (top traces) or -80 mV (bottom traces) clamp potential while varying *pH_i* to the indicated values. The dotted lines indicate the closed (C-) channels current levels. **C)** Analysis of the effects of *pH_i* on mean patch activity (*NP_o*), maximum channels number (*N*) and single channel open probability (*P_o*) at the indicated *pH_i* values, in the conditions given in A, at +80 mV (black bars) and at -80 mV (open bars). For each graph, data are normalized to their respective values at *pH_i* 7.8 and are given as mean values of 5 experiments and SEM are shown as error bars. * *P* < 0.05 vs -80 mV, paired Student t-test.

Figure 7. Intracellular pH (pH_i) alters channel voltage-dependence.

Experiments were performed on inside-out patch symmetrically bathed with NMDG-Cl solution. Pipette solution contained 5 mM Ca^{2+} and was adjusted at pH 7.4, while bath solution was calcium-free and supplemented with 1 mM ATP. **A)** NP_o/V_c curves established under pH_i 7.0 (■), 7.4 (●), 7.6 (▲) and 7.8 (▼). NP_o data at a given pH_i value are normalized to their respective values at +80 mV and are given as mean values of 9-12 (pH_i 7.0), 16-19 (pH_i 7.4), 6-10 (pH_i 7.6) and 8-12 (pH_i 7.8) measurements and SEM are shown as error bars when larger than symbol. Continuous lines are non-linear least squares fits of respective data, using a Boltzmann equation ($r^2 = 0.954$ to 0.971). **B)** Plot of $NP_{o\min}$ calculated from the Boltzmann fits shown in A as a function of pH_i .

TABLES

Table I: Results from Boltzmann fits of channel activity vs voltage relationship data.

	K^{-1} (mV)	$V_{1/2}$ (mV)	R^2
Cell-attached	25.1 ± 8.1	50.9 ± 9.9	0.984
$[Ca^{2+}]_o$ 0 mM	28 ± 4.5	29.8 ± 4.8	0.997
$[Ca^{2+}]_o$ 5 mM	28.3 ± 9.9	31.2 ± 10.8	0.988
pH _o 6.6	15.8 ± 2.9	41.8 ± 3.1	0.982
pH _o 7.4	20.3 ± 5.9	21.6 ± 7	0.968
pH _o 8.0	20.1 ± 2.8	12 ± 3.9	0.992
pH _i 7.0	33.4 ± 5.5	20.5 ± 5.2	0.969
pH _i 7.4	26.1 ± 6.3	22.5 ± 7.7	0.972
pH _i 7.6	27.1 ± 8	28.3 ± 9	0.955
pH _i 7.8	18.8 ± 5	27.2 ± 5.5	0.972

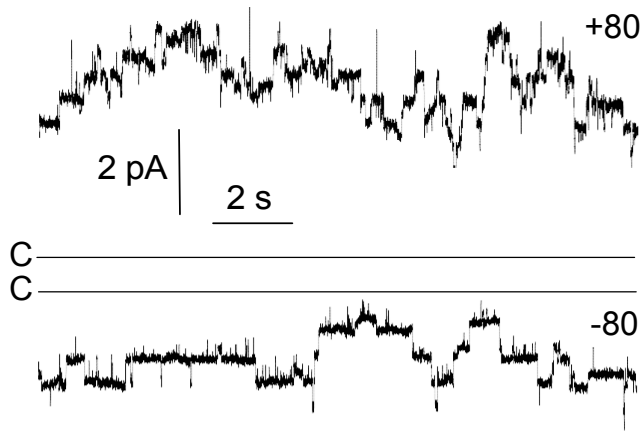
Summary of results from fits by Boltzmann equation of voltage-dependence data in the cell- attached configuration, and in the cell-excised inside-out configuration while varying the parameter given on the left-hand side of the table. Fits were performed as indicated in the *Materials and Methods* section, for the number of observations given in the *Results* section. For each condition, a measure of the goodness of fit (R^2) is also given.

Table II : Single-channel conductances

	g (pS)
[Ca ²⁺] _o 0 mM	12.5 ± 0.2 (5)
[Ca ²⁺] _o 5 mM	12.3 ± 0.5 (5)
pH _o 6.6	13.8 ± 0.3 (3)
pH _o 8.0	13.1 ± 1 (5)
pH _i 7.0	13.1 ± 0.3 (3)
pH _i 7.8	12.1 ± 0.4 (4)

Single-channel conductances were determined in the conditions given in the left-hand side of the table, for the number of observations given in brackets.

A



B

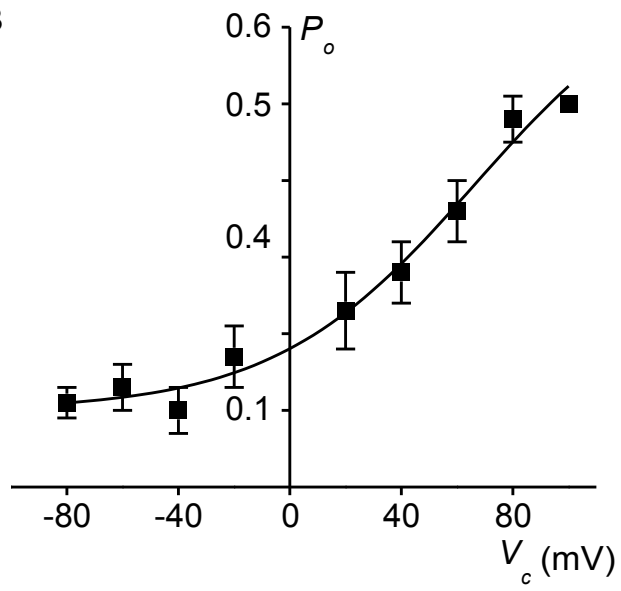


Figure 1

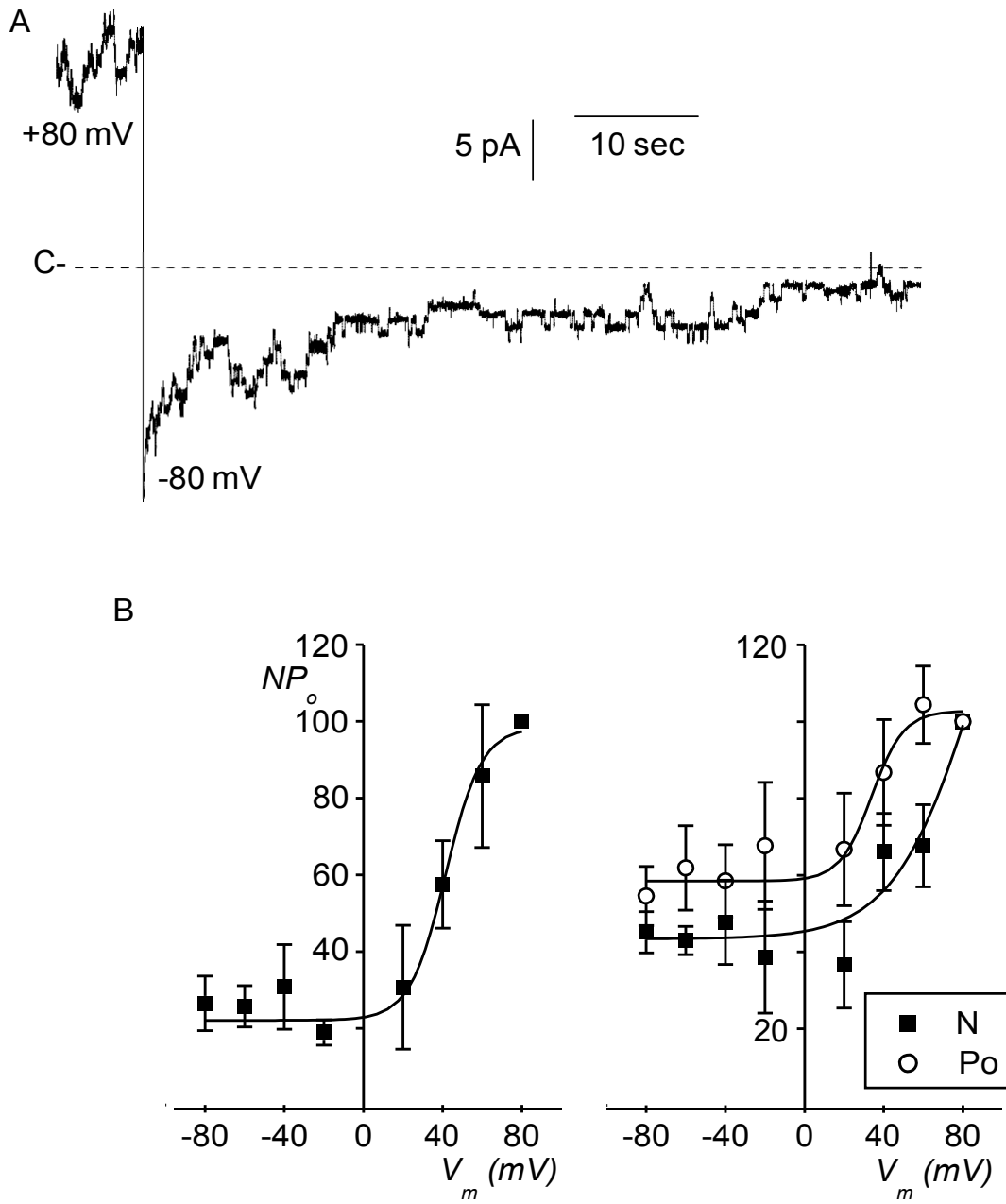


Figure 2

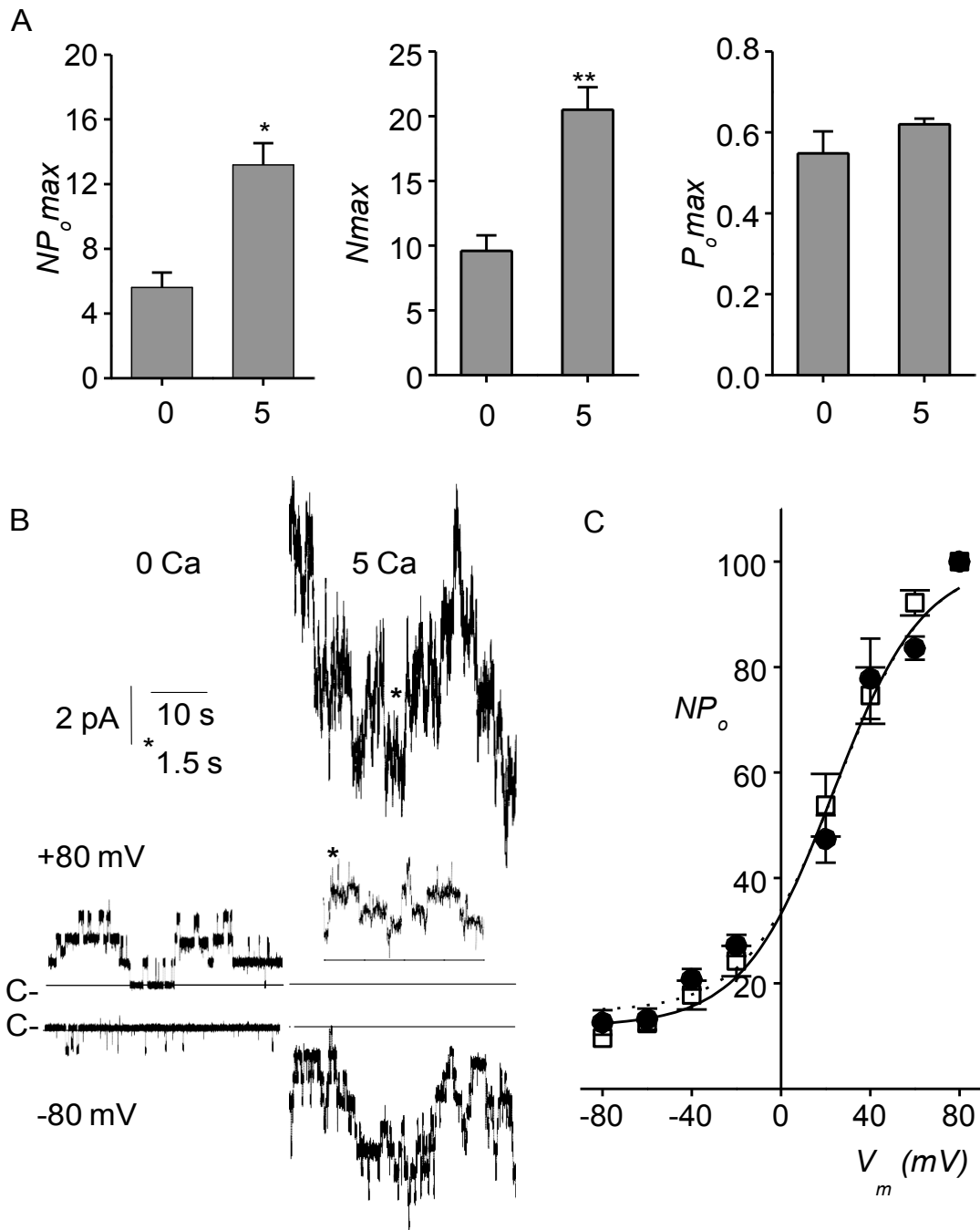


Figure 3

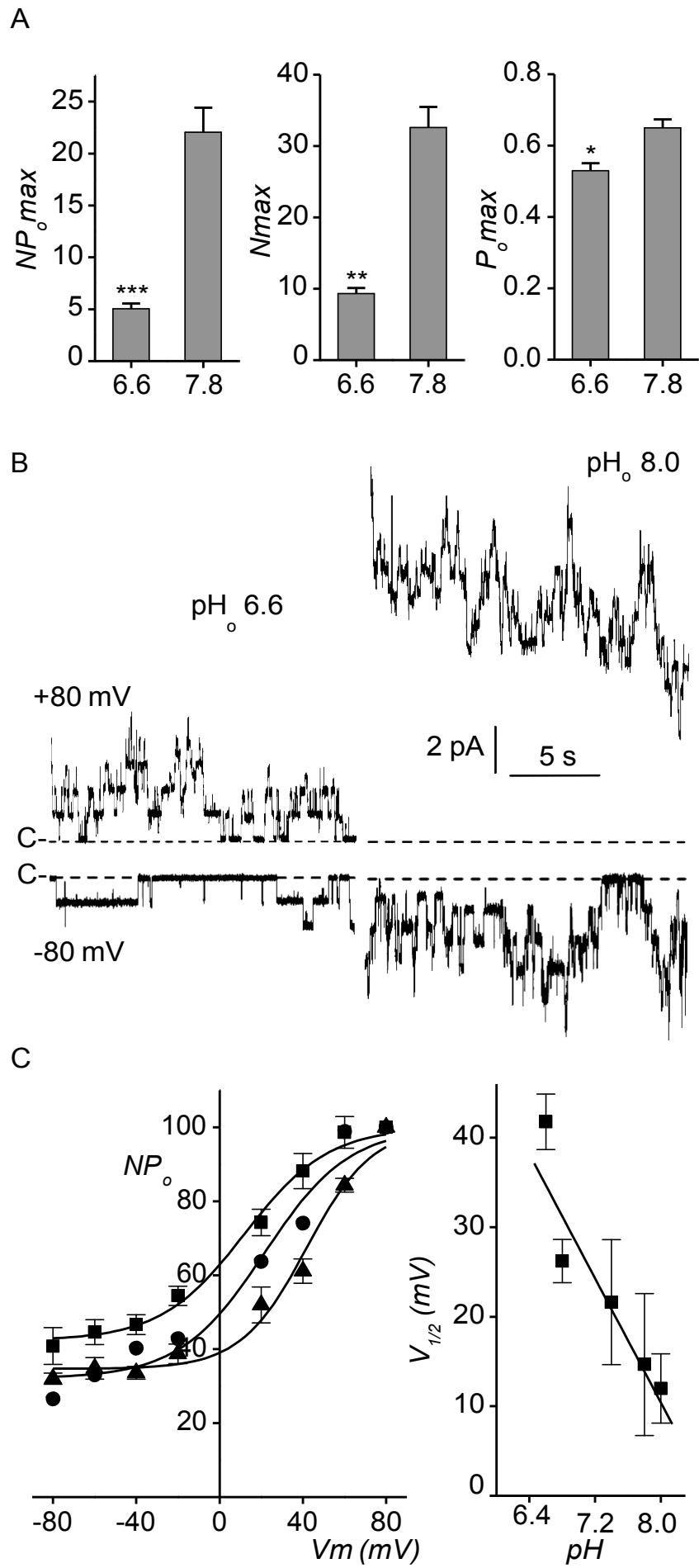


Figure 4

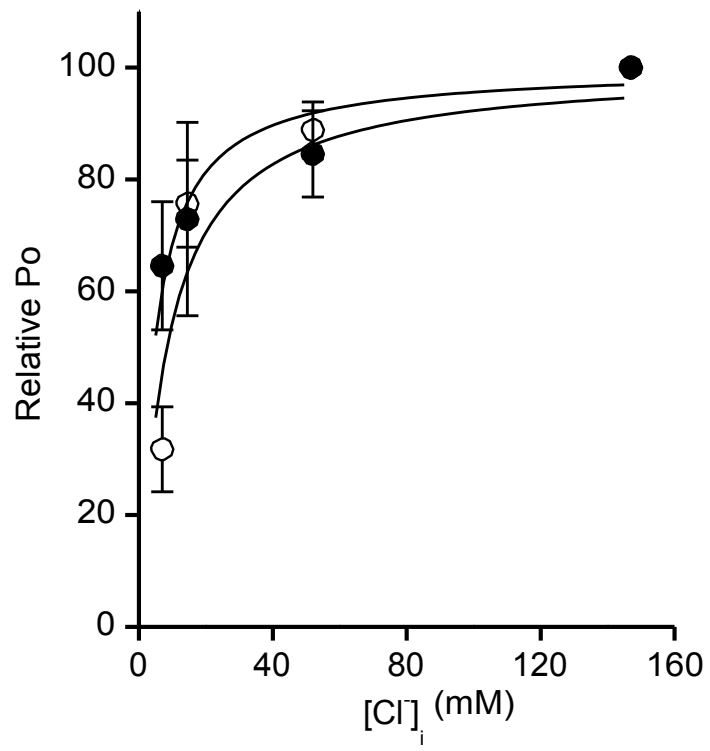


Figure 5

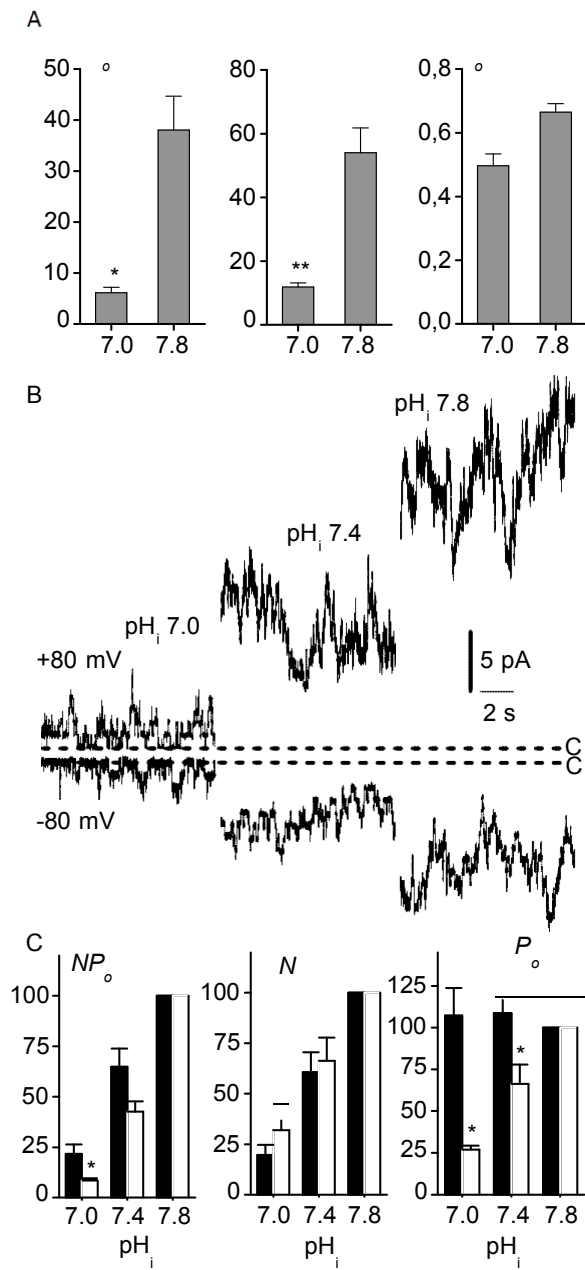


Figure 6

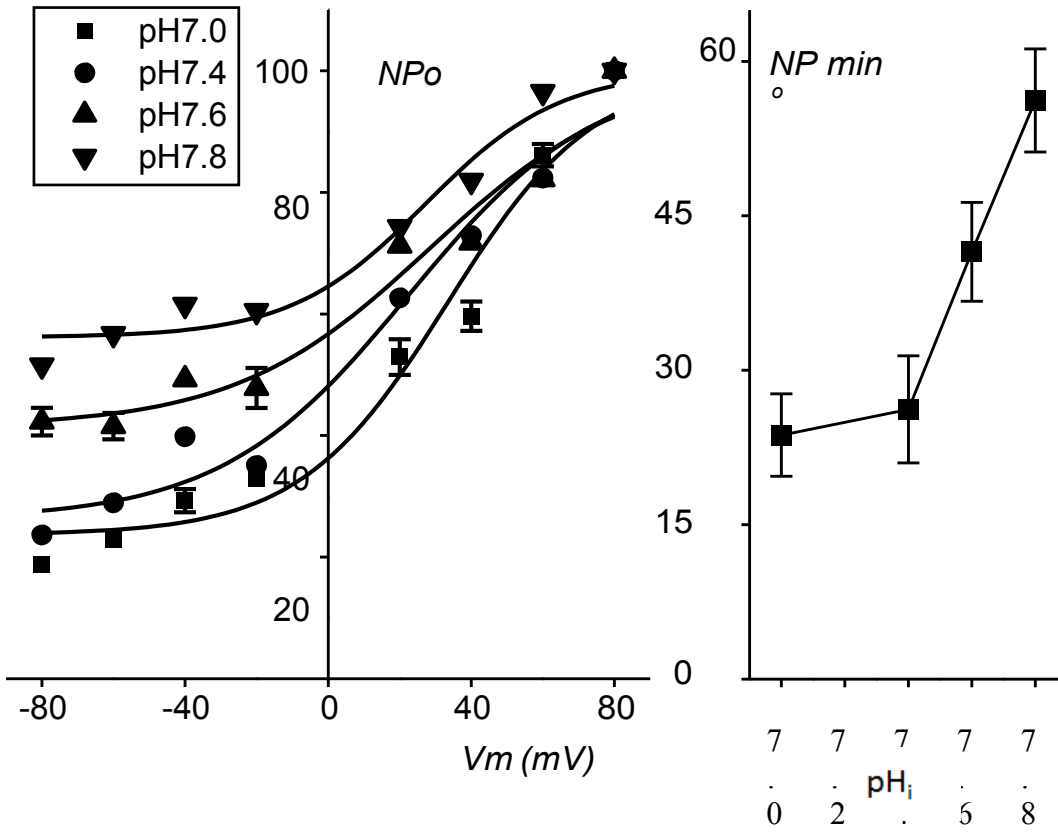


Figure 7

2- Résumé

Les canaux chlorure ClC-Ka / Kb (et leurs équivalents murins respectivement ClC-K1 / K2), deux membres de la famille des ClC, sont distribués tout au long du néphron distal. Dans la branche large ascendante de l'anse de Henle, ClC-Kb joue un rôle crucial dans les mécanismes de réabsorption de NaCl et une perte d'activité de ce canal conduit à l'apparition d'un syndrome de Bartter de type III. Depuis lors, les facteurs de régulation des canaux ClC-Kb, à même d'influencer le transport de chlore, sont en cours d'étude à travers celle du canal chlore de 10 pS du tissu rénal natif.

Nous avons cherché dans ce travail à caractériser les mécanismes de régulation par le voltage, le calcium extracellulaire et le pH intra et extracellulaire du canal chlorure endogène « ClC-K2-like » de 10pS rénal. Cette étude a été menée en utilisant la technique du patch-clamp en configuration « cellule attachée » ou en configuration « inside-out » au niveau de la membrane basolatérale des cellules intercalaires du canal connecteur de souris préalablement microdisséqués.

Nous avons pu déterminer que l'activité du canal de 10pS est fortement dépendante du voltage membranaire. Dans un premier temps, nous avons observé qu'une variation de potentiel induit un phénomène lent, agissant *via* une variation du nombre de canaux actifs pour atteindre un état stable après plusieurs dizaines de secondes. Ensuite, à l'état stable, la NP_o augmente avec la dépolarisation membranaire (de 25 % à -80mV à 100% à +80mV (n = 19) *via* un effet mixte sur le nombre de canaux actifs et leur probabilité d'ouverture.

L'activité des canaux est également significativement augmentée lors d'une augmentation du calcium extracellulaire de 0 à 5mM mais, ici, il s'avère que cette augmentation d'activité est uniquement due à une augmentation du nombre apparent de canaux actifs à la membrane (n = 5, $p < 0,01$) et non à une augmentation de la probabilité d'ouverture des canaux (n = 5, $p = 0,79$). Enfin, le calcium extracellulaire n'affecte pas la dépendance au voltage membranaire ($V_{1/2} = 29,8 \pm 4,8 \text{ mV } Ca^{2+}_o = 0 \text{ vs } V_{1/2} = 31,2 \pm 10,8 \text{ mV } Ca^{2+}_o = 5 \text{ mM}$).

Les modalités de l'influence d'une variation de pH extracellulaire (pH_o) sur l'activité des canaux et leur dépendance au voltage ont également pu être explorées. Comme dans le DCT, l'alcalinisation extracellulaire augmente l'activité des canaux (NP_o de $6,13 \pm 1,07$ à pH_o 6,6 vs $38,05 \pm 6,64$ à pH_o 8). Ces variations d'activité pouvant être dues à une modification du nombre de canaux apparent et/ou de la probabilité d'ouverture des canaux, nous avons cherché à déterminer ces paramètres. Il s'avère que pH_o agit majoritairement sur le nombre

apparent de canaux actifs ($11,88 \pm 1,29$ à pH_o 6,6 vs $54 \pm 7,74$ à pH_o 8), bien qu'une augmentation mineure de la probabilité d'ouverture ($P_o = 0,49 \pm 0,03$ à pH_o 6,6 vs $P_o = 0,66 \pm 0,02$ à pH_o 8) soit observée. Par ailleurs, pH_o modifie la dépendance au voltage membranaire du canal, un glissement de la courbe $\text{NPo} = f(V_m)$ vers des potentiels plus négatifs lors d'une alcalinisation du milieu extracellulaire, $V_{1/2}$ passant de $12 \pm 3,9$ mV à pH_o 8 ($n = 5$) à $42 \pm 3,1$ mV à pH_o 6,6 ($n = 5$), sans modification de la pente de la courbe.

Nous avons également exploré les effets de variations du pH intracellulaire (pH_i) sur l'activité des canaux rénaux et leur dépendance au voltage. Il apparaît que pH_i affecte l'activité du canal de façon plus complexe et plus importante que pH_o . Ainsi, une élévation de pH_i de 0.8 unités élève la NPo d'un facteur ~ 10 (de 5,4 à pH_i 7,0 à 47,8 à pH_i 7,8) à un potentiel de +80mV ($n=5$) *via* une augmentation du nombre de canaux actifs (de 25% à pH_i 7,0 à 100% à pH_i 7,8), sans affecter leur P_o . En revanche, à -80 mV, une augmentation de NPo est aussi observée (de 1,5 à pH_i 7,0 à 21,3 à pH_i 7,8) mais celle-ci s'est avérée être due non seulement à une augmentation du nombre de canaux apparents actifs similaire à celle observée à +80 mV, mais aussi de leur P_o . Il reste que, si le nombre de canaux actifs apparaît être le paramètre le plus sensible au pH_i , la régulation différentielle de la P_o indique une altération par le pH_i de la sensibilité au voltage du canal. Ceci a été confirmé par l'établissement de relations courant/voltage pour une gamme de pH_i variant de 7,0 à 8. Dans ces conditions, il apparaît qu'il y a une nette modification de la dépendance au voltage du canal par pH_i , mais qui s'exprime de façon différente de celle induite par pH_o . Nous avons observé en effet qu'au fur et à mesure que pH_i augmente, la courbe de sensibilité au voltage n'est pas déplacée sur la gamme de voltages imposées mais qu'apparaît une augmentation de l'activité des canaux à des potentiels négatifs, ce qui tend vers un aplatissement de la courbe de variation de l'activité en fonction du voltage.

Durant toutes ces expériences, la conductance unitaire du canal n'est pas modifiée par le calcium et le pH extracellulaires, et par le pH intracellulaire. Enfin, la concentration de chlore intracellulaire, un facteur de régulation connu des canaux ClC, notamment ClC-2, est sans effet sur la dépendance au voltage du canal rénal du CNT.

Les canaux potassiques rénaux Kir4.2/Kir5.1 : Analyse phénotypique et caractérisation fonctionnelle.

I- Caractérisation fonctionnelle des canaux potassiques basolatéraux des cellules du PCT de souris.

I- Mesure de l'activité des canaux potassiques in situ.

L'application de la technique du patch-clamp en configuration « cellule attachée » nous a permis de mettre en évidence la présence d'au moins 3 canaux potassiques différents.

Le canal le plus fréquemment observé (environ 33% des patches avec activité) possède une conductance entrante de $46,64 \pm 1,27$ pS ($n = 8$) (fig. 21B). Les courants s'annulent pour une différence de potentiel imposée (potentiel d'inversion) de $48,6 \pm 5,6$ mV ($n = 5$), compatible avec la présence d'un canal à sélectivité potassique. Les courants sortants sont plus faibles que les courants entrants et forment un plateau d'environ 0,5 pA, indiquant la présence d'une rectification entrante. L'analyse des tracés (fig.21A) à un potentiel transmembranaire de -80mV montre que ce canal a une probabilité d'ouverture de 0.24 ± 0.05 ($n=6$).

Le deuxième canal a été plus rarement observé (environ 18% des patches avec activité) et possède une conductance de $25,22 \pm 1,58$ pS ($n = 4$) (fig.21B). Compte tenu de sa faible fréquence de détection, il ne nous a pas été possible de déterminer de façon fiable son potentiel d'inversion mais il est clair, au vu de la figure 21B, que celui-ci possède très probablement une sélectivité potassique. Pour les mêmes raisons, il ne nous a pas été possible de poursuivre son étude en configuration « inside-out ». Les résultats en configuration « inside-out » présentés plus bas (cf partie I-2 et I-3) ne concerneront donc que le canal de 47 pS, plus fréquent.

Il faut cependant noter que nous avons rencontré de grosses difficultés pour enregistrer l'activité des canaux du PCT du fait de l'extrême fragilité de ce segment du néphron et son faible temps de conservation après dissection (environ 3h). De ce fait, sur 30 enregistrements montrant une activité, nous n'avons pu en exploiter que 8 pour le canal de 47pS et 4 pour celui de 25pS.

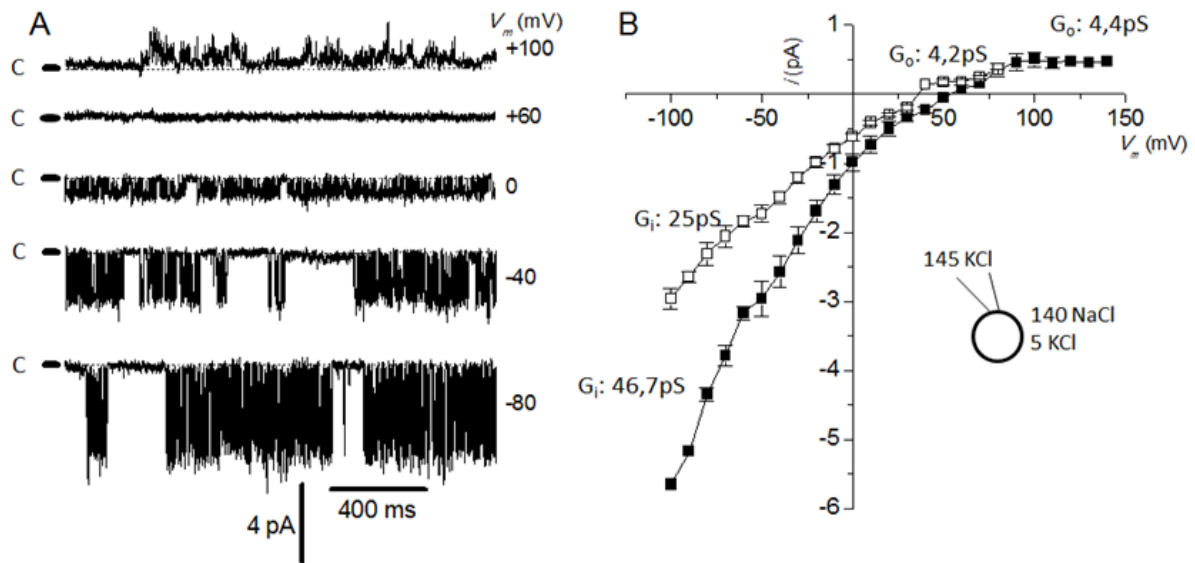


Figure 21 : Caractérisation *in situ* des propriétés des canaux potassiques basolatéraux du PCT de souris.

(A) Tracés obtenus en configuration « cellule attachée » pour le canal de 47pS en présence de 140 mM de NaCl et 5 mM KCl dans le bain et 145 mM de KCl dans la pipette pour différents potentiels transmembranaires imposés (V_m). (B) Relations courant (i) / tension (V_m) obtenues dans les conditions citées précédemment, pour le canal de 47 pS (■) et le canal de 25 pS (□).

Aucun de ces deux canaux n'a pu être retrouvé en présence de barium dans le milieu extracellulaire (dans la pipette), celui-ci étant connu pour être un inhibiteur des canaux Kir [Shuck ME et al., 1997].

Dans ces conditions, il a toutefois pu être observé un troisième canal (environ 30% des patches avec activité) possédant une conductance de $64,17 \pm 2,62$ pS ($n=6$) (fig.22A). Les courants s'annulent pour un potentiel d'inversion de $40,2 \pm 4,7$ mV ($n=4$), une valeur compatible avec un canal à sélectivité potassique. Là aussi, les courants sortants sont plus faibles que les courants entrants $6,35 \pm 1,14$ pS ($n=4$) et semble former un plateau aux environs de 0,5 pA, suggérant la présence d'une rectification entrante. Par ailleurs, l'ajout de TPA, un bloquant des canaux TASK [Piechotta PL., et al. 2011], en configuration « inside-out », se traduit par une baisse significative de l'activité des canaux de $63,313 \pm 14,54\%$ (fig.22B).

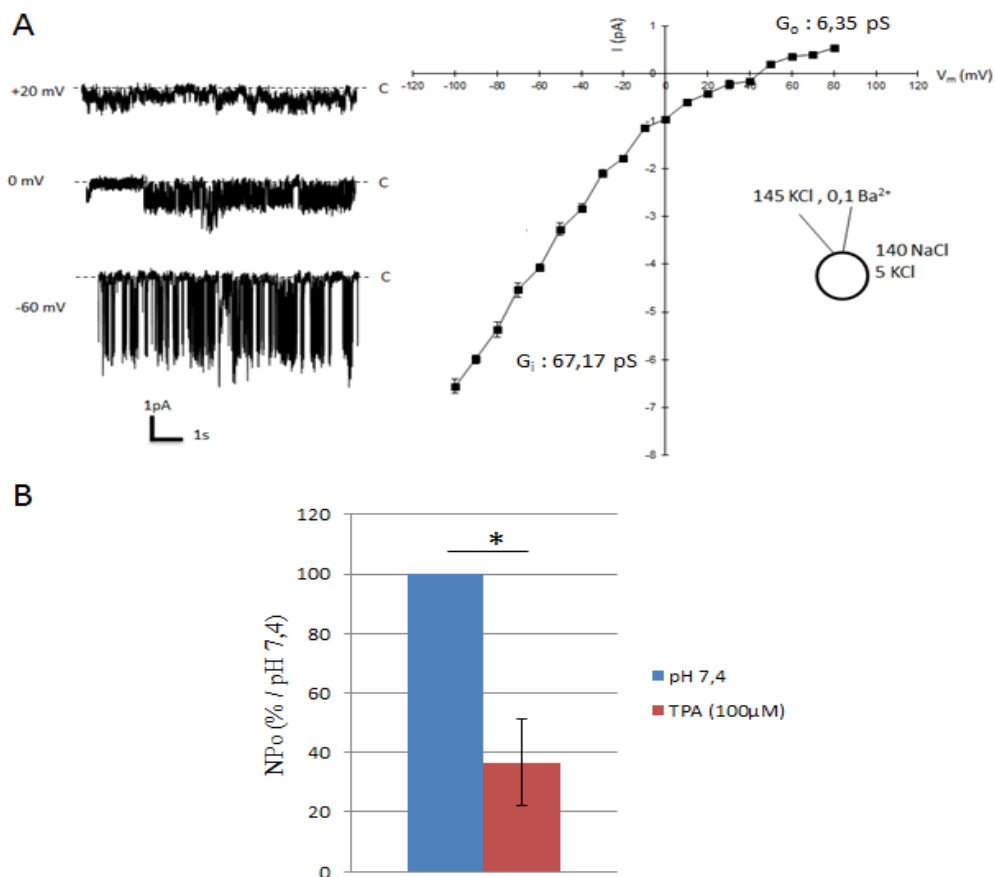


Figure 22 : Caractérisation *in situ* des propriétés des canaux potassiques basolatéraux du PCT de souris en présence de Ba $^{2+}$ extracellulaire.

(A) Tracés et courbe courant / tension obtenus en configuration « cellule attachée » en présence de 140 mM de NaCl et 5 mM KCl dans le bain et 145 mM de KCl et $100\mu\text{M}$ de Ba $^{2+}$ dans la pipette pour différents potentiels transmembranaires imposés (V_m). (B) Activité relative du canal de 67 pS en présence ou non de TPA dans la solution de perfusion.

2- Influence du magnésium intracellulaire sur la conductance sortante du canal de 47 pS.

Le Mg $^{2+}$ intracellulaire induit la rectification entrante des canaux Kir en se fixant sur des sites spécifiques du canal [Edvinsson J.M. et al. 2011]. Les effets du Mg $^{2+}$ intracellulaire sur les propriétés du canal de 47 pS ont donc été analysés en configuration « *inside-out* » en présence de 145 mM de KCl dans la pipette. La face interne de la membrane a d'abord été exposée à une solution contenant $0,7$ mM de Mg $^{2+}$ puis à une autre solution dépourvue de Mg $^{2+}$, dans les deux cas en présence de 145 mM de KCl. Nous avons ainsi constaté une augmentation de l'amplitude des courants unitaires sortants en absence de Mg $^{2+}$. Les résultats sont résumés sur la figure 23A. L'analyse des courbes i/V_m montre un effet très léger du Mg $^{2+}$

interne sur les courants entrants (présence de Mg^{2+} : conductance entrante = $52,73 \pm 2,21$ pS, n = 3 ; absence de Mg^{2+} : conductance entrante = $57,88 \pm 1,46$ n = 4 ; p = 0,051) alors que les courants sortants sont eux fortement affectés. En effet, en présence de 0,7 mM de Mg^{2+} interne, la relation courant-voltage pour les différences de potentiel positives n'est pas linéaire, confirmant la rectification entrante observée en configuration attachée. Dans ce cas, la conductance sortante est de 13,38 pS (n = 2). En revanche, la rectification entrante est très fortement diminuée en absence de Mg^{2+} interne, la conductance sortante s'élevant alors à 29,02 pS (n=2) dans ces conditions. Nous pouvons donc conclure que le Mg^{2+} intracellulaire participe à la rectification entrante du canal de 47 pS.

3- Régulation du canal de 47 pS par le pH intracellulaire.

L'influence des variations du pH_i sur l'activité des canaux Kir4.2/Kir5.1 a clairement été démontrée sur l'ovocyte de xénope [M. Pessia et al. 2001]. Nous avons donc cherché à déterminer les effets du pH intracellulaire (pH_i) sur l'activité du canal de 47 pS en mesurant l'activité (NPo) en configuration « *inside-out* » en présence de 145mM de KCl dans la pipette. La face interne du fragment de membrane est exposée à des solutions contenant également 145mM de KCl et dont le pH varie de 6,8 à 8. Nous avons ajouté à chacune de ces solutions 5 mM d'EDTA pour éviter toute influence du magnésium et du calcium internes. La figure 23B montre l'activité du canal (normalisée en pourcentage du témoin à pH 7,4) en fonction du pH_i (n=3), à une différence de potentiel imposée de -50 mV. Nous observons ainsi une augmentation d'activité d'environ 75% lorsque le pH_i est augmenté de 7,4 à 8, la NPo atteignant alors une valeur de 169,98 %. Inversement, nous avons observé une inhibition de même amplitude (-55%) de l'activité du canal pour des pH_i acides (la NPo est alors de 48,92 % par rapport au témoin). Nous sommes donc en présence d'un canal potassique dont l'activité est dépendante du pH_i .

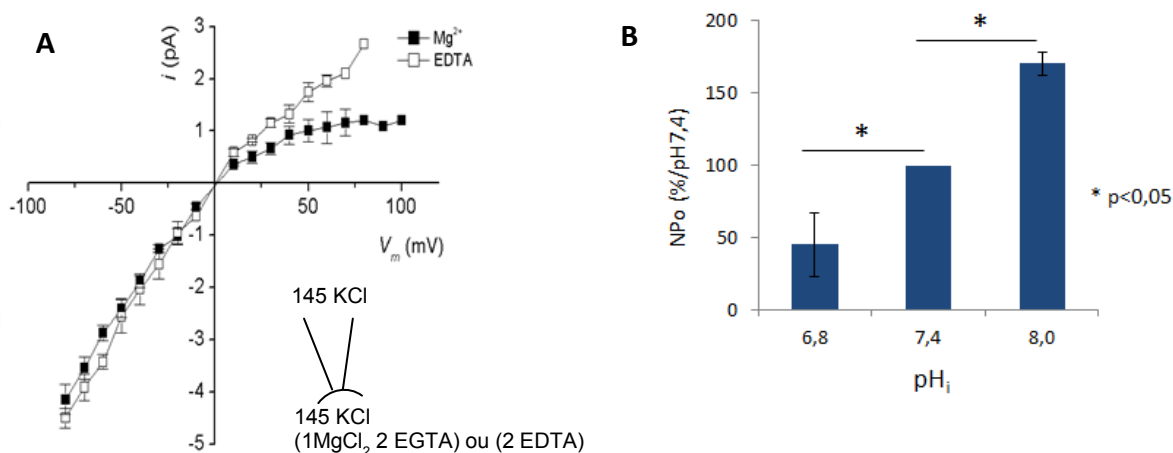


Figure 23 : Caractérisation in situ des propriétés du canal potassiques de 47pS.

(A) Influence du magnésium intracellulaire sur la conductance du canal de 47pS obtenue en configuration « inside out » en présence de 145mM de KCl dans la pipette. La face interne du fragment membranaire est exposée à une solution contenant 145 mM de KCl dépourvue de Mg^{2+} (□) ou contenant 0.7 mM de Mg^{2+} (■). (B) Influence de la variation du pH intracellulaire sur l'activité du canal de 47pS, exprimée en pourcentage de la condition témoin (pH7.4).

II- Localisation tissulaire des sous-unités Kir4.2 et Kir5.1 dans le rein de souris.

1- Expression des ARNm codant pour les sous-unités Kir 4.1, Kir4.2 et Kir5.1 dans le néphron de souris.

Des résultats préliminaires de RT-PCR du laboratoire, à partir des différents segments du néphron, nous ont permis de mettre en évidence l'expression des ARNm codant pour Kir4.1, Kir4.2 et Kir5.1 le long du néphron de souris (fig.24). Il apparaît ainsi une distribution exclusivement distale des ARNm codant pour la sous-unité Kir4.1. Inversement, nous pouvons observer une distribution exclusivement proximale des ARNm codant pour la sous-unité Kir4.2. Les ARNm codant pour Kir5.1 sont, quant à eux, présent dans tous les segments du néphron. Nous nous attendons donc à ne retrouver que les sous-unités Kir4.2 et Kir5.1 au niveau du tubule contourné proximal.

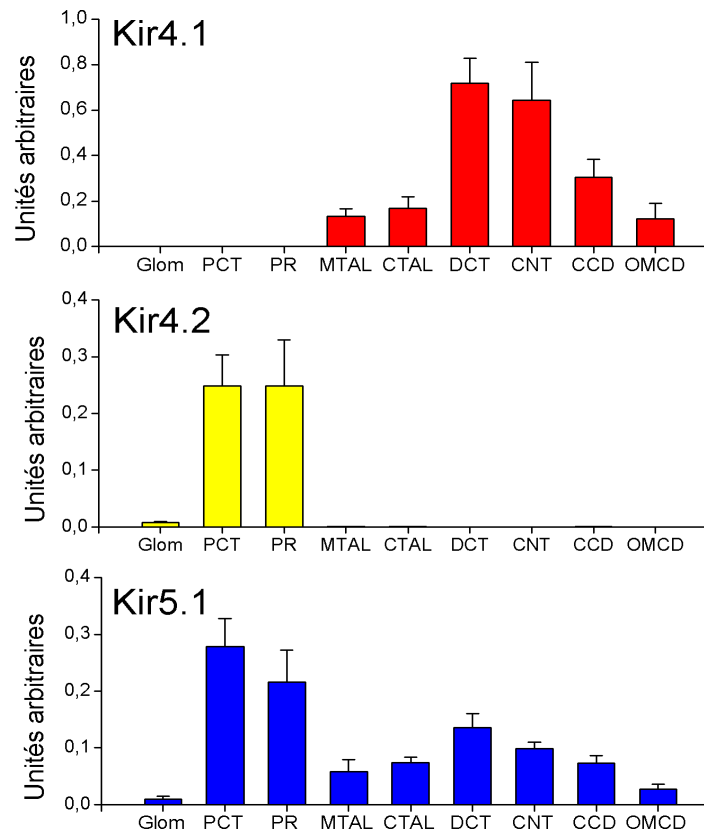


Figure 24 : Localisation des ARNm codant pour Kir4.1, Kir4.2 et Kir5.1 le long du néphron de souris.

2- Spécificité de l'anticorps anti-Kir4.2.

La spécificité de l'anticorps anti-Kir4.2 n'étant pas clairement démontrée, si ce n'est par son fabricant, nous l'avons donc testé sur les cellules HEK293T transfectées ou non par les plasmides permettant l'expression de Kir4.2, Kir5.1 ou Kir4.1 (figure 25).

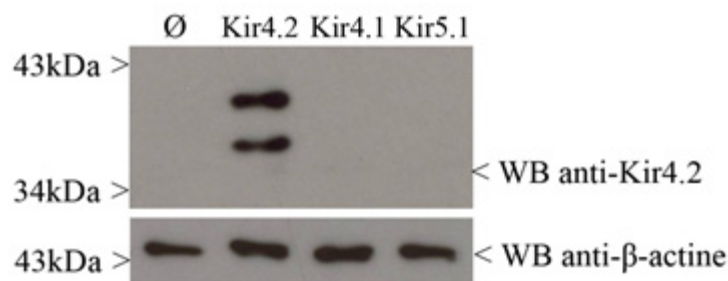


Figure 25 : Vérification *in vitro* de la spécificité de l'anticorps anti-Kir4.2. (En haut) Immunomarquage de Kir4.2 à partir d'extraits protéiques de cellules HEK293T non-transfectées (Ø) ou exprimant artificiellement les protéines Kir4.2, Kir4.1 et Kir5.1 24h après transfection par les différents plasmides pCDNA3. (En bas) Marquage de la β-actine.

L'anticorps anti-Kir4.2 se révèle être spécifique de cette sous-unité et ne reconnaît ni Kir4.1, ni Kir5.1, ni les protéines endogènes des HEK293T. Il semble toutefois que Kir4.2 soit présent sous 2 états, probablement glycosylé ou non, dans ces cellules.

Toujours dans l'optique de vérifier la spécificité des anticorps anti-Kir4.2, les expériences d'immunohistochimie pour les protéines Kir4.2 ont été réalisées préalablement sur des cellules HEK293T (figure 26).

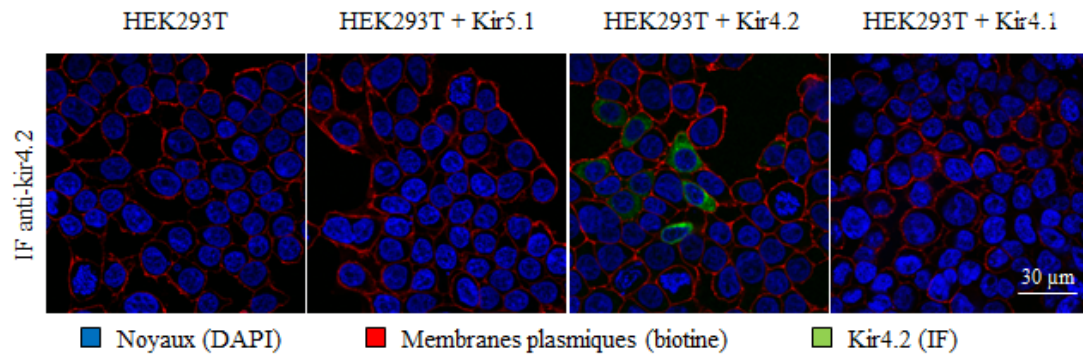


Figure 26 : Immunocytochimie réalisée sur des cellules HEK293T transfectées ou non par les plasmides pCDNA3 permettant l'expression de la sous-unité Kir4.2, Kir4.1 ou Kir5.1. Les noyaux ont été marqués au DAPI et les membranes plasmiques ont été marquées par la biotine.

Les données montrent qu'il n'y a pas de marquage pour les cellules non transfectées et mises en présence de l'anticorps anti-Kir4.2. En présence de l'anticorps anti-Kir4.2, nous observons un marquage essentiellement cytoplasmique chez les cellules transfectées avec Kir5.1. En revanche, aucun marquage n'est observé chez les cellules transfectées avec les sous-unités Kir4.1 ou Kir4.2. Cela confirme les données obtenues précédemment par western blot.

3- Expression protéique des sous-unités Kir4.2 et Kir5.1 dans le rein de souris.

Nous avons, dans un premier temps, cherché à déterminer l'expression protéique des sous-unités Kir4.2 et Kir5.1 sur des extraits protéiques de rein de souris WT et sur des PCT isolés de souris WT. Le western-blot (fig.27), réalisé chez des souris WT montre l'apparition de plusieurs bandes en présence de l'anticorps anti-Kir4.2 aussi bien dans les extraits protéiques de reins totaux que d'extraits provenant de tubules proximaux isolés. Il n'est pas possible de discerner clairement la bande pouvant appartenir à la sous-unité Kir4.2. En revanche, concernant la sous-unité Kir5.1, une bande est bien présente (aux environs de 43kDa) que ce soit dans les extraits protéiques totaux ou dans les extraits provenant de tubules proximaux isolés.

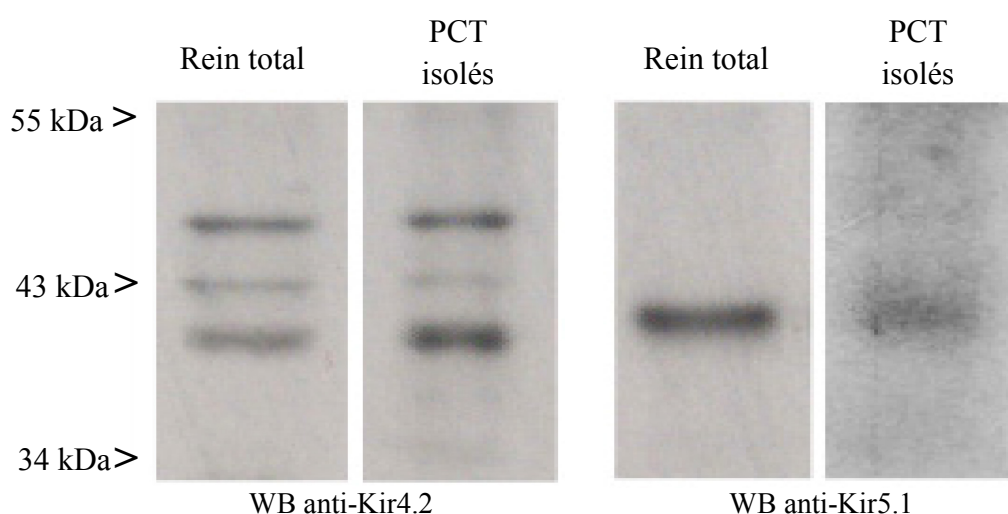
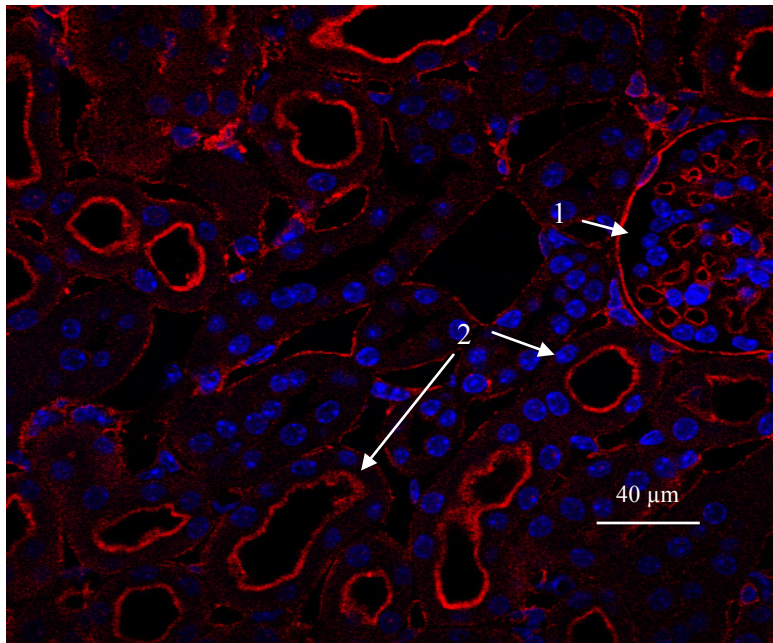


Figure 27 : Western-blot anti-Kir4.2 et anti-Kir5.1 réalisé sur des protéines de rein total et de tubules proximaux micro-disséqués de souris WT.

4- Localisation tissulaire de la sous-unité Kir4.2 sur une coupe de rein de souris et sur des tubules proximaux murins isolés.

Nous avons, ici, cherché à localiser plus spécifiquement la sous-unité Kir4.2 au niveau du rein de souris et de tubules proximaux isolés afin de déterminer la localisation apicale et/ou basolatérale de cette dernière. Nos données sur coupe de rein (fig.28) démontrent la présence de la sous-unité Kir4.2 dans les glomérules, la capsule de Bowman et le tubule proximal. Nous avons pu également déterminer que la sous-unité Kir4.2 serait localisée à la membrane apicale dans les tubules proximaux. Aucun marquage n'est, quant à lui, observé dans les autres segments du néphron.



Annotation
des structures :

1 : Glomérule

2 : PCT

■ Noyaux (DAPI)

IF anti-Kir4.2

Figure 28 : Immunohistochimie réalisée sur des coupes transversales de rein de souris WT.

Ce résultat étant surprenant et non conforme à la bibliographie habituelle sur les canaux potassiques Kir4.x du néphron [Lourdel et al, 2002, Paulais et al., 2002, Lacheb et al., 2008], nous avons supposé que la conformation des fragments de tubules sur ces coupes histologiques pouvait engendrer des problèmes d'accessibilité de l'anticorps à la membrane basolatérale et ainsi entraîner une accumulation de ces derniers au niveau apical.

Nous avons donc réalisé ces mêmes analyses sur des tubules proximaux isolées de souris WT (fig.29 en haut). L'analyse laisse apparaître la présence d'un marquage basolatéral pour la sous-unité Kir4.2 (n=3). Cette même analyse a pu être effectuée sur une souris invalidée pour Kir4.2 (fig.29 en bas) et révèle cette fois, un marquage aussi bien basolatéral qu'apical (n=1).

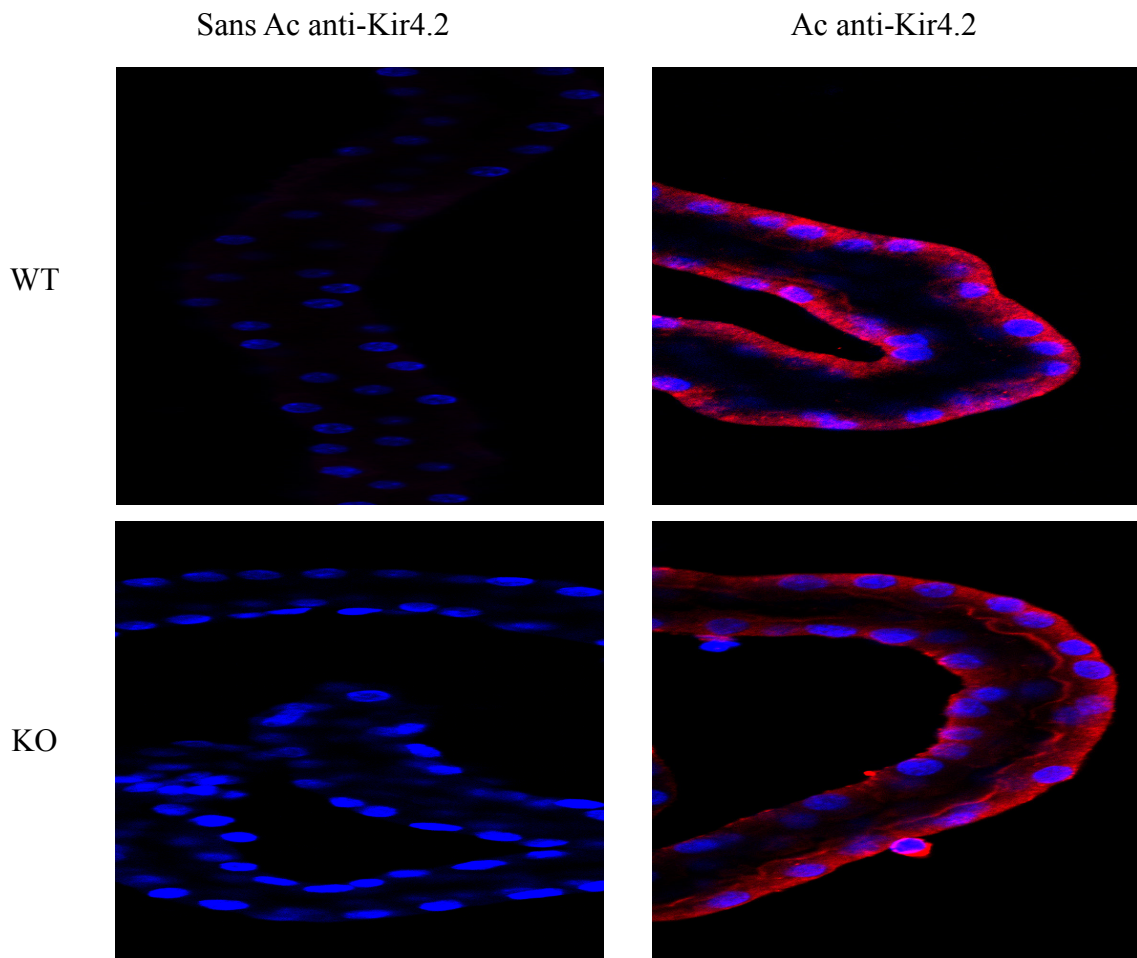


Figure 29 : Immunohistochimie réalisée sur des PCT isolés de souris WT (en haut) et de souris KO pour Kir4.2 (en bas).

III- Analyse phénotypique des souris WT et invalidées pour Kir4.2 (KO).

Dans le but de déterminer le rôle physiologique de Kir4.2 dans la fonction rénale des souris, nous avons réalisé une analyse phénotypique de souris WT et KO en cage à métabolisme. Les résultats sont présentés dans le tableau 7.

Paramètres	Kir4.2 ^{+/+} (n=8)	Kir4.2 ^{-/-} (n=8)
Poids (g)	28.03±0.91	26.15±0.77
Consommation d'eau (μL/g BW/jour)	195.9±17.88	195.6±13.18
Pression systolique (mmHg)	120.27±3.76	132.31±5.9
Pression diastolique (mmHg)	93.52±5.2	106.55±4.9
Fréquence cardiaque (pulsations/min)	569±19.2	564.28±29.7
DFG (μL/min)	375.73±57.79	352.34±94.53
Urine		
Volume (μL/g BW/jour)	71.13±8.03	99.77±11*
Osmolarité (mOsm/kg)	3486±248.55	2432±177.85*
pH	6.50±0.09	6.17±0.05*
Na ⁺ (mmole/mmele créatinine)	35.07±2.9	41.49±1.86
K ⁺ (mmole/mmele créatinine)	94.95±8.87	97.07±3.47
Cl ⁻ (mmole/mmele créatinine)	70.06±3.7	72.85±1.89
Ca ²⁺ (mmole/mmele créatinine)	0.21±0.03	0.25±0.03
Mg ²⁺ (mmole/mmele créatinine)	6.7±0.3	7.69±0.23*
Pi (mmole/mmele créatinine)	11.9±0.8	15.5±0.7*
Glucose (mmole/mmele créatinine)	0.22±0.02	0.20±0.01
Protéines (g/mmele créatinine)	1.32±0.27	0.68±0.01*
Sang		
pH	7.22±0.02	7.31±0.02*
PCO ₂ (mmHg)	54.2±1.08	48.71±2.46
PO ₂ (mmHg)	35.47±3.1	33.9±1.5
[HCO ₃ ⁻] (mM)	26.05±1.06	24.48±0.86
Plasma		
Na ⁺	149.42±1.34	149.5±0.74
K ⁺	4.74±0.31	4.5±0.13
Ca ²⁺ (mM)	1.24±0.007	1.22±0.019
Glucose (g/L)	2.53±0.36	2.22.53±0.36
Lactose (g/L)	4.46±1.63	7.23±1.02

Tableau 7 : Paramètres biologiques des souris Kir4.2^{+/+} et Kir4.2^{-/-}.

Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM pour le nombre d'animaux indiqué. **p*<0.05.

Les analyses des paramètres biologiques de ces souris ne révèlent pas de différences significatives, chez les souris KO, en termes de poids, de consommation d'eau, de pression artérielle, de fréquence cardiaque et de débit de filtration glomérulaire.

En revanche, on peut noter la présence d'un volume urinaire augmenté (99.77±11μL/g BW/jour vs 71.13±8.03μL/g BW/jour chez les souris WT), d'une osmolarité urinaire diminuée (2432±177.85mOsm/kg vs 3486±248.55mOsm/kg chez les WT) et d'un pH urinaire

également diminué (6.17 ± 0.05 vs 6.50 ± 0.09 chez les WT). Ces souris excrètent également plus d'ions Mg^{2+} (7.69 ± 0.23 mmole/m mole créatinine vs 6.7 ± 0.3 mmole/m mole créatinine chez les WT), de phosphate (15.5 ± 0.7 mmole/m mole créatinine vs 11.9 ± 0.87 mmole/m mole créatinine pour les WT) et moins de protéines (0.68 ± 0.01 mmole/m mole créatinine vs 1.32 ± 0.27 mmole/m mole créatinine chez les WT).

Au niveau des paramètres sanguins et plasmatiques, seul le pH diffère entre les KO et les WT (respectivement 7.31 ± 0.02 vs 7.22 ± 0.02). Il est toutefois à noter que le pH plasmatique des souris WT (7,22) est anormalement bas par rapport aux données de la littérature.

Discussion

I- The native small-conductance Cl⁻ channel in the mouse renal tubule as a ClC-K2 candidate: regulation by voltage, chloride, calcium and protons.

L'utilisation de la technique du patch-clamp en canal unitaire sur tissu natif de souris a permis de mettre en évidence la présence d'un canal, ayant une conductance de 10pS environ, qui soutient la majeure partie des conductances chlorures basolatérales observées le long du néphron distal. Des expériences préliminaires suggèrent que ce canal est également présent dans la TAL [Teulon et al. 2005]. Certaines de ses propriétés régulatrices ont pu être mises en évidence par des études du laboratoire, au niveau du néphron distal et ont montré sa sélectivité anionique, sa régulation par le calcium extracellulaire et par le pH intra- et extracellulaire [Lourdel et al., 2003, Nissant et al., 2004, Nissant et al., 2006]. Le ClC-K2 n'a pas encore été étudié au niveau unitaire dans des systèmes d'expression hétérologue suite à des problèmes d'expression. Nous avons donc, dans ce travail, étudié en détail ces mécanismes de régulation et voir leurs influences sur l'activité et la dépendance au voltage du canal de 10pS au niveau de la membrane basolatérale des cellules intercalaires du CNT de souris.

1- Effet du Ca²⁺ extracellulaire sur l'activité du canal du 10pS des cellules intercalaires du CNT.

Les variations d'activité des canaux ClC-K lors de modification des concentrations externes en calcium ont été mises en évidence par Uchida et ses collaborateurs [Uchida et al., 1994] sur le canal ClC-K1 de rat. Dans le DCT1 de souris, il a été décrit que le calcium extracellulaire augmentait le nombre de canaux maximum actifs (N_{max}) sans pour autant modifier la probabilité d'ouverture de ces canaux (P_{o,max}) [Lourdel et al., 2003].

Dans cette étude nous avons retrouvé ce même phénomène au niveau du canal de 10pS des cellules intercalaires du CNT (augmentation du N_{max} lors d'une augmentation de la concentration en calcium extracellulaire mais pas d'effet sur la P_{o,max} ni sur la dépendance au voltage). Cela montre donc que la cible principale des mécanismes de régulations par le calcium extracellulaire est le nombre maximal de canaux actifs à la membrane plasmique. Ces résultats sont comparables à ceux retrouvés pour le ClC-Kb exprimé dans l'ovocyte de xénope [Gradogna et al., 2011] Notre hypothèse pour expliquer ce phénomène serait que les canaux

présents à la membrane existeraient soit dans un état actif soit dans un état inactif et que les variations de Ca^{2+} extracellulaire déplaceraient l'équilibre vers un ou l'autre de ces états. Ainsi, en présence d'une faible concentration de calcium extracellulaire, une proportion des canaux présents à la membrane serait maintenue dans un état inactif et l'augmentation de calcium extracellulaire, possiblement par un changement de conformation, rendrait ces canaux actifs. Sur la base du modèle de cinétique des canaux ClC-Kb, nous pouvons imaginer que cette régulation agirait sur la porte commune (voir chapitre II-3-a) et entraînerait ainsi leur ouverture et/ou leur fermeture.

2- Influence du pH extra- et intracellulaire sur l'activité du canal du 10pS des cellules intercalaires du CNT.

Tout comme les mécanismes entraînant des modifications de l'activité des canaux par des variations de calcium extracellulaire, les mécanismes induits par des variations de pH extra- et intracellulaire sont peu connus. Là où le calcium affecte uniquement le N_{\max} , il a été décrit dans le DCT1 que des variations de pH extracellulaire affectaient le N_{\max} et la $P_{o,\max}$ du canal de 10pS, alors que le mécanisme d'action du pH intracellulaire reste indéterminé [Lourdel et al., 2003, Nissant et al., 2006]. A l'inverse, le canal de 45pS supposé être un ClC-K1 n'est lui que peu sensible aux variations de pH intracellulaire [Paulais et al., 1990] .

Nos résultats sont concordants avec ce qui a été décrit dans le DCT1 à savoir que des variations internes ou externes de protons vont principalement jouer sur le N_{\max} (augmentation lors d'une alcalinisation) mais également sur la $P_{o,\max}$ dans le cas du pH extracellulaire (augmentée par l'alcalinisation). Nous constatons encore une fois que, comme pour le calcium extracellulaire, les principaux mécanismes de régulation par le pH semblent passer par une modification du N_{\max} . Toutefois, le fait que l'alcalinisation du milieu extracellulaire modifie également la $P_{o,\max}$ semble indiquer que les mécanismes de régulations par les protons ne dépendent pas d'un mais de plusieurs sites pouvant se trouver du côté extra- et intracellulaire. Le fait que le N_{\max} soit dans les deux cas augmenté par une alcalinisation du milieu semble toutefois montrer que, comme pour le calcium extracellulaire, il est possible que cette régulation agisse sur des états d'activation / inactivation des canaux et passe donc par des mécanismes d'ouverture / fermeture des canaux suite à une action sur la porte commune.

3- Dépendance au voltage et effet du Cl^- intracellulaire sur l'activité du canal du 10pS des cellules intercalaires du CNT.

Les mécanismes de dépendance au voltage de ces canaux de 10pS ne sont pas clairement établis. Les données sur le ClC-Kb sont, quant à elles, contradictoires. En effet, dans l'ovocyte de xénope, le ClC-Kb est activé par des potentiels positifs et inhibé à des potentiels négatifs [Estevez et al., 2001 ; Waldegger et al., 2002 ; Picollo et al., 2004 ; Gradogna et al. 2011]. Ceci est en accord avec nos observations sur le canal de 10 pS qui présente une dépendance au voltage similaire en configuration cellule attachée comme en « inside-out ». En effet, les canaux sont beaucoup plus actifs lors d'une dépolarisation de la membrane. Par contre, ces observations ne sont pas retrouvées lorsque le ClC-Kb est exprimé dans des cellules en cultures [Estevez et al., 2001 ; Scholl et al., 2006 ; Fahlke et al., 2010]. Il n'y a pas encore d'explication claire quant à cette différence observée. Nos résultats montrent que la dépendance au voltage du canal de 10 pS s'effectue selon deux composantes : l'hyperpolarisation de la membrane diminue rapidement le nombre de canaux actifs à la membrane puis dans un second temps, la probabilité d'ouverture des canaux diminue également.

Nous avons par ailleurs pu démontrer que le calcium extracellulaire n'avait pas d'influence sur cette dépendance au voltage alors que les protons eux pouvaient la modifier. En effet, un changement de pH extracellulaire se traduit par une modification du potentiel pour lequel la moitié des canaux présents sont actifs ($V_{1/2}$). Cela se traduit par un décalage vers la gauche de la courbe d'activité des canaux en fonction du voltage mais ne modifie pas la pente de cette dernière. Cela participe donc à l'augmentation de l'activité des canaux pour des potentiels proches du potentiel de membrane (aux environs de -70mV). Les variations de pH intracellulaire, eux, ont un impact différent sur la dépendance aux voltages de ce canal de 10pS. En effet, il n'y a pas d'influence des protons sur la $V_{1/2}$ et la pente de la courbe de l'activité des canaux en fonction du voltage. On observe toutefois un aplatissement de la courbe pour des potentiels négatifs lors d'une augmentation du pH intracellulaire traduisant ainsi une augmentation d'activité de ces canaux pour des potentiels négatifs.

Ainsi nous pouvons observer que bien que régulée différemment par le pH intra- et extracellulaire la dépendance au voltage du canal est modifiée en faveur d'une activation des canaux présents pour des potentiels proches du potentiel membranaire.

Inversement, nous avons pu constater que le chlore intracellulaire n'a que très peu d'effet sur le canal de 10 pS. La dépendance au chlore intracellulaire est une propriété des CIC et en particulier du CIC-2. Il a été montré qu'une augmentation du chlore intracellulaire pouvait induire une activation des canaux CIC-2 pour des potentiels positifs [Niemeyer et al., 2003]. Dans notre cas, il semble y avoir un léger effet sur l'activité des canaux pour de petites concentrations en chlore (< 10mM) qui semble diminuer l'activité pour des potentiels positifs.

4- Les propriétés du canal sur tissu natif par rapport à celles des CIC en expression hétérologue.

Les CIC fonctionnent en dimères et leur activité est contrôlée indépendamment par deux mécanismes : les deux protopores qui fonctionnent indépendamment l'un de l'autre et la porte commune qui contrôle l'ouverture et la fermeture simultanée des deux protopores [Push et al., 2004 ; Jentsch, 2008]. Les mécanismes responsables de l'ouverture et la fermeture des protopores résident dans une protonation / déprotonation d'un glutamate qui est absent chez les CIC-K. Les mécanismes contrôlant la porte commune ne sont, quant à eux, toujours pas élucidés. Pour CIC-0 et CIC-2, ces mécanismes sont des mécanismes lents (environ 10s) et aboutissent à une inactivation lors d'une dépolarisation et pour CIC-1, de façon plus rapide (quelques centaines de millisecondes) lors d'une hyperpolarisation.

Il faut noter que la régulation par les protons est plus importante que celle par le calcium pour le canal CIC-Kb. En effet, il a été montré dans des systèmes d'expression hétérologues que les courants enregistrés en présence de calcium extracellulaire [Gradogna et al., 2010, Andrini et al., 2013] ou en absence de calcium extracellulaire [Estévez et al., 2001 ; Waldegger et al., 2002] sont relativement similaires alors qu'une acidification extracellulaire par les protons entraîne une disparition du canal [Estevez et al., 2001, Gradogna et al., 2010, Andrini et al., 2013]. Il a été proposé, grâce à des études sur l'ovocyte de xénope, que la régulation des CIC-K par le calcium extracellulaire passe par une modulation de la probabilité d'ouverture des canaux par des mécanismes de liaison courtes dans le temps entraînant l'ouverture ou l'obstruction du canal [Gradogna et al., 2010]. Dans cette étude, nos résultats ne montrent pas de modification de la probabilité d'ouverture. Les effets du potentiel négatif, de faible concentration en calcium externe et du pH acide sur le canal de 10pS sont principalement dus à une diminution du nombre de canaux actifs. Nous supposons donc que dans ces conditions, un certain nombre de canaux présents à la membrane entrent lentement dans un état d'inactivation. Autrement dit, il semblerait que ces mécanismes touchent principalement la régulation de la porte commune des canaux induisant des changements conformationnels qui

vont permettre aux canaux présents d'entrer dans un état d'activation augmentant ainsi le nombre de canaux actifs visibles par patch-clamp.

Nous avons également montré que le canal est observé lors d'une dépolarisation. Ces mécanismes de régulation sont plus décrits chez certains CIC que ceux induit par le calcium extracellulaire. En effet, chez les CIC-0 et CIC-1 la probabilité d'ouverture des protopores est augmentée lors d'une dépolarisation suite aux flux de chlore passant à travers les canaux [Push, 2004]. Cependant, ces phénomènes sont du principalement à la régulation des protopores par le glutamate en position 166 or les CIC-K ne possèdent pas ce glutamate. Cela va donc encore une fois dans le sens d'une régulation via la porte commune. De plus, la conductance des protopores est très rarement détectées pour le canal de 10 pS [Lourdé et al., 2003]. Dans nos expériences nous n'avons pas observé de demi-conductance caractéristique des protopores traduisant que la dépendance au voltage des canaux doit affecter les deux protopores de façon simultanée.

Par ailleurs nous avons également observé que le pH pouvait influencer sur la dépendance au voltage des canaux ce qui est une propriété commune aux canaux CIC. Il a récemment été décrit la présence d'un site de régulation par le pH des CIC-K correspondant à une histidine en position 497 comme étant responsable de la sensibilité au proton extracellulaire [Gradogna et al., 2010]. Il a d'ailleurs été décrit, avant cela, qu'une histidine en position 532 jouerait également un rôle dans les mécanismes de régulation par les protons des CIC-0 et CIC-1 et correspondrait à celle retrouvée en position 497 chez le CIC-Ka. Il est donc possible que certains mécanismes de régulation observés pour le supposé canal CIC-K2 rénal passent par ce site de régulation.

5- Importance physiologique de ces mécanismes de régulation.

Si la compréhension des mécanismes précédemment décrits n'est pas encore totale, leur importance au niveau de la physiologie rénale est elle aussi encore à étudier. Au niveau rénal, les cellules intercalaires β jouent un rôle important dans les mécanismes de sécrétions de bicarbonate et de réabsorption du Cl^- [Andrini et al., 2011 ; Sepulveda et al., 2015]. Par ailleurs, des modèles mathématiques, confortés par des études de microperfusion sur tubules isolés ont permis de montrer que le canal collecteur pouvait réabsorber passivement du Ca^{2+} par voie paracellulaire [Edwards A., 2015]. Il est donc possible que ces mécanismes de sécrétion des bicarbonates et la réabsorption du calcium puissent jouer un rôle dans l'activité des canaux chlorures présent au niveau basolatéral par les mécanismes précédemment décrits.

Par ailleurs, cette régulation pourrait être fondamentale en tant que mécanisme compensatoire dans le cadre d'une alcalose qui augmenterait ainsi l'activité des canaux chlorure et de ce fait l'activité générale des cellules intercalaire β qui augmenteraient alors la sécrétion de bicarbonate afin de compenser l'alcalose. Dans un autre contexte, le syndrome de Bartter de type III est la conséquence de mutations du gène *ClCKNB* codant pour le ClC-Kb. L'étude en expression hétérologue a permis d'établir que certaines mutations [Andrini O, Keck M. et al. 2014] entraînent des perturbations de la sensibilité au pH et au Ca^{2+} des canaux ClC-Kb et ainsi pourraient perturber en plus de l'activité de la TAL, l'activité d'autres segments comme le CNT ou le canal collecteur. L'importance de l'étude des mécanismes de régulation de ces canaux demeurent donc fondamentale pour la bonne compréhension d'une part de la physiologie du néphron distal mais également des mécanismes prenant place dans le cadre de pathologies comme le syndrome de Bartter de type III.

II- Les canaux potassiques Kir4.2/Kir5.1 : analyse phénotypique et caractérisation fonctionnelle.

L'importance de la sous-unité Kir5.1 dans le rein a clairement été établie lors de l'étude de Marc Paulais sur les souris invalidées pour le gène *Kcnj16* codant pour cette sous-unité [Paulais M. et al. 2011]. En effet, ces souris ayant une acidose métabolique hyperchlorémique, une hypokaliémie et une hypercalciurie en l'absence de Kir5.1, cela démontre l'importance de cette sous-unité dans la fonction rénale. Par ailleurs, les données provenant de l'analyse phénotypique de ces souris montrent que certains traits, comme l'acidose ou l'augmentation de l'excrétion d'ammonium, ne peuvent pas s'expliquer par une seule atteinte du néphron distal ; elles suggèrent une atteinte du tubule proximal. Dans notre étude, la caractérisation des canaux potassiques basolatéraux du PCT et l'analyse de leur rôle suggèrent la présence et l'importance des sous-unités Kir4.2 et Kir5.1 dans ce segment.

1- Caractérisation des canaux potassiques de la membrane basolatérale du PCT de souris.

Les propriétés des homotétramères Kir4.2 et hétérotétramères Kir4.2/Kir5.1 et les différences avec les hétérotétramères Kir4.1/Kir5.1 ont clairement été établies dans des systèmes d'expression hétérologue tels que l'ovocyte de xénope. En effet, l'homomère Kir4.2 est un canal potassique dont l'activité dépend de la concentration en potassium extracellulaire [Edvinsson et al., 2011], avec une conductance avoisinant les 25pS et dont la sensibilité au pH

intracellulaire dans une gamme physiologique est plus importante que celle de Kir4.1 ($pK_a=7.1$ vs 5.99 pour Kir4.1) [Pessia et al., 2001]. L'hétérotétramérisation de Kir4.2 avec Kir5.1 rend le canal plus sensible au pH_i mais cette différence de sensibilité n'est pas aussi importante que pour le Kir4.1/Kir5.1 ($pK_a =7.5$ pour les 2 types d'hétéromères). Elle augmente la conductance pour avoisiner les 50pS et diminue la probabilité d'ouverture du canal ($p<0.3$) [Pessia et al., 2001]. Par ailleurs, ces canaux sont connus pour présenter une rectification entrante induite par le Mg^{2+} intracellulaire [Hibino et al., 2010] ou des polyamines [Oliver et al., 2000].

La caractérisation fonctionnelle des canaux potassiques basolatéraux du PCT à l'aide de la technique du patch-clamp en canal unitaire que j'ai réalisée démontre la présence d'un canal dont la conductance est compatible avec la présence d'un canal constitué d'homomères Kir4.2 ($g=25 \pm 1.58$) (fig.23B) mais également avec la présence d'homomères de Kir2.1 dont l'expression d'ARNm par RT-PCR suggère sa localisation dans le PCT [Derst et al. 2001] et dont la conductance avoisine les 25pS [Kubo et al. 1993]. Cependant, la faible fréquence d'apparition du canal (moins de 20% des patches) ne m'a pas permis de déterminer en détails ses propriétés.

Dans les mêmes conditions, l'autre canal observé dans environ 33% des enregistrements présente une conductance d'environ 47pS, une rectification entrante induite par le Mg^{2+} intracellulaire et une sensibilité au pH_i (avec une augmentation de l'activité par une alcalinisation du milieu intracellulaire) ainsi qu'une probabilité d'ouverture faible ($p=0,24$) (fig 23B, 25A et 25B). Ces données sont compatibles avec celles d'un canal potassique Kir sur la membrane basolatérale du PCT. Dans ce segment du néphron, il a été décrit la présence à la membrane basolatérale d'un canal Kir6.1 sensible à l'ATP intracellulaire [U.R. Maurer et al. 1998]. Cependant, l'absence d'ATP dans nos enregistrements en configuration « inside-out » écarte la possibilité que le canal puisse être un canal Kir sensible à l'ATP. En revanche, les données sont compatibles avec la présence d'un hétérotétramère constitué de sous-unités Kir4.2/Kir5.1. Les propriétés de cet hétérotétramère ont été décrites dans l'ovocyte de xénope et sont très proches du canal endogène du PCT [Pessia M. et al. 2001]. Par ailleurs, ces résultats sont confortés par les données de RT-PCR obtenues par le laboratoire indiquant la présence des ARNm de Kir4.2 et de Kir5.1 dans le PCT mais pas ceux de Kir4.1 (fig.26). De plus, il faut mentionner que les mesures réalisées en présence de Ba^{2+} dans la pipette (un bloquant des canaux Kir) permettent une disparition totale de ces deux canaux potassiques mais permette l'observation d'un troisième canal (fig.25), ce qui confirme bien leur appartenance à la famille des canaux Kir. Afin de s'assurer de l'identité de ce canal, seront effectuées, par la suite, des

expériences de patch-clamp mais cette fois sur des souris invalidées pour la protéine Kir4.2. Cela devrait donc permettre de constater soit la disparition du canal de 47pS et du canal de 25pS (si celui-ci est bien un homomère de Kir4.2) soit la disparition seule du canal de 47pS. Des mesures sur des souris invalidées cette fois pour Kir5.1 pourrait également permettre d'appuyer le fait que le canal de 47pS serait un hétérotétramère Kir4.2/Kir5.1 car ce canal devrait alors être le seul à disparaître chez ces souris.

En ce qui concerne ce troisième canal, il a été décrit dans le PCT un canal appartenant à la famille des TASK. Il s'agit du canal TASK2 [Warth et al. 2004 ; Barriere et al. 2003]. Ce canal est connu comme ayant une conductance d'environ 60pS [Reyes et al. 1998] et est bloqué par le TPA. Ces propriétés sont compatibles avec celles observées pour ce troisième canal. De plus la présence de barium dans le milieu extracellulaire montre que ce canal n'est pas un Kir. Il est donc possible qu'il s'agisse d'un canal TASK2.

2- Localisation des sous-unités Kir4.2 et Kir5.1 dans le rein de souris.

Les expériences réalisées sur les cellules HEK293T ont permis de mettre en évidence la spécificité des anticorps dirigés contre les sous-unités Kir4.2. En effet, le western-blot mené sur les extraits protéiques de cellules transfectées par la sous-unité Kir4.1, Kir4.2 ou Kir5.1 démontre la reconnaissance des sous-unités Kir4.2 par son anticorps et non celles des autres sous-unités (fig.22). Les anticorps reconnaissent toujours leur sous-unité respective dans leur configuration native en immunocytochimie (fig.23).

Sur la base de ces données nous avons donc cherché à déterminer la localisation tissulaire de ces sous-unités par western-blot (fig.27) sur des tubules proximaux isolés et sur des extraits protéiques de reins entiers de souris WT et KO et par immunohistochimie sur coupe de rein (fig.28) et sur tubules proximaux isolés (fig.29).

Il a déjà été montré que la sous-unité Kir5.1 rénale apparaissait aux environs de 45kDa sur des western-blots provenant d'extraits protéiques de rein [Tanemoto M. et al. 2000]. Le western-blot (fig.27) démontre la présence d'une bande attendue pouvant correspondre à la sous-unité Kir5.1 aux environs de 45kDa aussi bien sur les extraits protéiques de reins que dans les PCT isolés. Cela suggère la présence de cette sous-unité dans le PCT. Concernant la sous-unité Kir4.2, l'apparition de 3 bandes aux environs de 43 kDa, au niveau des extraits protéiques de rein ou dans les extraits de PCT, est conforme à ce qui a déjà été décrit dans la littérature au niveau rénal. En effet, le groupe d'Hibbino et collaborateurs a montré en 2004 que l'expression protéique de Kir4.2 dans le rein par western blot se manifeste sous la forme de 3

bandes aux environs de 43kDa [Hibbino H. et al. 2004]. Les bandes les plus hautes correspondent à 2 états différents de glycosylation et la bande la plus basse correspond à la forme de Kir4.2 non glycosylée [Hibbino H. et al. 2004].

L'immunohistochimie (fig.28) que nous avons réalisée avec l'anticorps anti-Kir4.2 sur coupe de rein permet de constater la présence d'un marquage à la membrane apicale du tubule proximal, dans le glomérule et dans les artérioles. Il a déjà été décrit la présence de canaux Kir dans les vaisseaux sanguins [Hibino H. et al. 2010], ces données sont donc compatibles avec une expression de Kir4.2 dans cette structure. De façon surprenante, aucun marquage n'est cependant visible à la membrane basolatérale du PCT, ce qui suggère soit une réelle absence de Kir4.2 à ce niveau, soit une difficulté de marquage de cette partie du tubule du fait de la disposition très compacte des tubules. Il est à noter qu'aucun marquage n'est observé dans les autres segments du néphron ce qui concorde avec les données de RT-PCR présentées précédemment. L'immunohistochimie réalisée sur tubules proximaux isolés (fig.29) nous permet cette fois de visualiser un marquage uniquement basolatéral des tubules de souris WT (fig.29 en haut). Cela va de pair avec nos résultats de patch-clamp laissant supposer la possibilité d'un canal Kir4.2/Kir5.1 à la membrane basolatérale des PCT et confirme les résultats obtenus par western blot sur les extraits protéiques de rein et de PCT isolés. La confirmation de ce marquage chez les souris KO révèle toutefois un marquage inattendu aussi bien au niveau basolatéral qu'apical des cellules du PCT. Il a été mentionné précédemment que l'inactivation de *Kcnj16* chez le modèle de souris que nous avons utilisé se fait en remplaçant une partie de la séquence codante pour le pore et le deuxième segment transmembranaire par une cassette « NEO ». Toutefois, la partie C-terminale de la protéine est conservée et c'est à ce niveau que l'anticorps anti-Kir4.2 reconnaît la protéine. L'apparition d'un marquage aux deux pôles de la cellule bien qu'étonnant pourrait donc s'expliquer par la possible formation d'une protéine tronquée qui serait donc exprimée partout dans la cellule.

Il est, toutefois, important de mentionner que l'obtention de souris invalidées pour Kir4.2 fut très difficile pour des raisons que ne maîtrisons pas. En effet, les souris hétérozygotes en couple ne donnent que très peu de souris KO (environ 1 KO pour 15 souris nées). Il a donc dans ces conditions été très difficile de réaliser ces expériences de marquage et il est donc nécessaire de réitérer ces expériences sur d'autres souris KO pour confirmer le résultat obtenu par WB et par immunohistochimie. Des expériences d'immunohistochimie sur souris invalidées pour *Kcnj16* codant pour Kir5.1 seraient également à envisager afin d'évaluer la localisation apicale et/ou basolatérale de la sous-unité. En outre, un co-marquage permettrait de déterminer si Kir4.2 et Kir5.1 sont exprimés ou non aux mêmes endroits de la cellule.

3- Phénotype des souris invalidées pour le gène *Kcnj16*.

L'analyse des paramètres biologiques des souris Kir4.2^{+/+} et Kir4.2^{-/-} en cage à métabolisme a permis de mettre en évidence un léger phénotype lors de l'inactivation du gène *Kcnj15* chez cette lignée. Comme mentionné précédemment le nombre de souris Kir4.2^{-/-} obtenues sur différentes portées à partir de couple hétérozygote n'est pas mendélien et le pourcentage de souris arrivant à maturité est également très faible.

Nos données montrent que les souris Kir4.2^{-/-} ne boivent pas plus mais urinent plus que les souris WT, cela suggère l'absence d'une déshydratation éventuelle mais l'augmentation du volume urinaire peut être le reflet d'un stress dû à un mal être des souris KO qui serait accentué par leur placement en cage à métabolisme. Leur débit de filtration glomérulaire est comparable tout comme leur concentration en créatinine urinaire. Elles ne souffrent donc pas d'un dysfonctionnement de la filtration glomérulaire. Il en est de même pour la pression artérielle (systolique et diastolique) et la fréquence cardiaque qui ne sont pas statistiquement différentes. L'osmolarité urinaire des souris KO est plus faible que celle observée chez les WT mais cette baisse est probablement la conséquence de l'augmentation du volume urinaire ce qui rend donc les urines plus diluées. L'analyse du contenu en ions des urines révèle une augmentation de l'excrétion de Mg²⁺, de phosphate et une diminution de l'excrétion des protéines. Ces différences au niveau du phosphate et des protéines (qui sont tous deux réabsorbés au niveau du proximal) révèlent donc une atteinte au niveau du PCT. En effet, le phosphate est réabsorbé, majoritairement au niveau du proximal, du côté apical conjointement au Na⁺ via un co-transporteur Na⁺/P et via un transporteur encore non-identifié du côté basolatéral [Murer H. et al. 2000]. Les protéines sont endocytées au niveau du PCT via l'activation de récepteurs mégaline et cubiline [Christensen E.I. et al. 2004]. Le magnésium, quant à lui, par rapport à la quantité filtré par le glomérule, la structure du proximal et sa capacité de réabsorption, est très peu réabsorbé au niveau de ce segment (environ 20%) [Weisinger J.R. et al. 1998]. On peut toutefois imaginer qu'une atteinte des fonctions de transport du tubule proximal pourrait entraîner une diminution de la réabsorption de Mg²⁺ qui serait suffisante pour augmenter la quantité excrétée dans les urines et il n'y aurait visiblement pas de compensation au niveau de la TAL et du DCT. En outre, il est important de souligner que l'excrétion urinaire de Na⁺ n'est pas augmentée de façon significative chez les souris KO (41,49±1,86 vs 35,07±2,9 chez les WT, p=0,06) mais il existe tout de même une tendance à perdre plus de Na⁺ chez ses souris ce qui conforterait l'hypothèse d'une atteinte du PCT. Enfin, le pH urinaire des souris KO est plus acide que celui des souris WT

($6,17 \pm 0,05$ vs $6,5 \pm 0,09$ chez les WT). Afin d'expliquer ce phénomène il aurait été intéressant de mesurer les concentrations en bicarbonate et en ammonium urinaire chez les WT et les KO afin de voir s'il existe une différence. Toutefois cette mesure n'est pas simple à réaliser mais cette piste mériterait ultérieurement d'être explorée afin de pouvoir expliquer cette différence de pH.

Au niveau des paramètres sanguins et plasmatiques, seul le pH plasmatique est différent entre les souris WT ($7,22 \pm 0,02$) et les souris KO ($7,31 \pm 0,02$). Cependant il n'est pas possible de conclure quant à la signification physiologique de cette différence de pH car, de part l'expérience du laboratoire, au niveau des souris WT, un pH de 7,22 n'est pas une valeur attendu pour des souris contrôles soumises à un régime standard A04. On peut donc raisonnablement imaginer que si le pH des WT se situait aux environs du pH plasmatique physiologique normal de 7.4, nous aurions peut-être pu observer une alcalose chez nos souris KO. L'une des origines de ce problème peut provenir de la nourriture qui a été donnée aux souris lors de nos expériences. En effet, le fournisseur habituel de nourriture A04 du Centre d'Explorations Fonctionnelles du Centre de Recherche des Cordeliers (SAFE) ayant été remplacé par Mucedola. Lors des expérimentations il s'est avéré que plusieurs équipes de recherche rencontraient des problèmes avec leurs expériences, à savoir qu'elles ne retrouvaient pas les mêmes résultats qu'avec d'anciennes souris WT malgré un protocole identique. Par ailleurs, il faut noter que la teneur en ions de ce régime (sodium, potassium, calcium, magnésium, chlore, phosphore) chez le nouveau fournisseur est plus importante qu'avec l'ancien entraînant ainsi une augmentation, parfois très importante, des excrétions urinaires en ions (3 fois plus de potassium excrétés avec le nouveau fournisseur). Enfin, la croissance des jeunes souris a été également retardée depuis le changement de fournisseur. De ce fait, les souris sont maintenant sevrées au minimum 1 mois après la naissance des souris (au lieu de 3 semaines) Cela explique également en partie le fait que nous n'ayons eu à notre disposition que très peu de souris KO pour réaliser nos expériences. Il s'avère donc nécessaire d'effectuer une série d'expérimentations en cages à métabolisme avec des souris WT et KO soumises cette fois à un régime A04 de chez SAFE afin de confirmer ou d'infirmer les résultats précédemment discutés.

4- Les hétérotétramères Kir4.2/Kir5.1 impliqués dans la conductance potassique basolatérale des cellules du PCT ?

Grace à cette étude, nous avons pu mettre en évidence l'expression protéique des sous-unités Kir4.2 et Kir5.1 dans les PCT de souris. Kir4.2 semble bien se trouver au niveau basolatéral des cellules du PCT et formerait un canal hétérotétramérique en s'associant avec Kir5.1 et donc les propriétés analysées ici correspondent à ce qui est actuellement connu pour ces canaux. L'importance physiologique de ces canaux semble encore floue mais il faut signaler qu'il n'est pas si étonnant de n'observer qu'un léger phénotype lors de l'invalidation de *Kcnj15*. En effet cela a déjà pu être observé lors d'une étude de R. Wart sur des souris invalidée pour le canal potassique TASK2 lui aussi présent à la membrane basolatérale du PCT [Warth et al., 2004]. Afin de mettre à jour un phénotype observable, il a fallu ajouter une charge alcaline (ajout de bicarbonate) par perfusion intraveineuse chez les souris. Ce type d'expérimentation pourrait donc être intéressant dans le cadre de l'étude des souris KO Kir4.2 afin de mettre en évidence de façon claire une éventuelle atteinte du tubule proximal.

Références Bibliographiques

- Accardi A. and Miller C., Secondary active transport mediated by a prokaryotic homologue of ClC Cl-channels. *Nature*; 427: 803-7, 2004.
- Adachi S, Uchida S, Ito H, Hata H, Hiroe M, Marumo F and Sasaki S, Two isoforms of a chloride channel predominantly expressed in thick ascending limb of Henle's loop and collecting ducts of rat kidney. *J Biol Chem*; 269(26): 17677-83, 1994.
- Anderson M.P, Rich DP, Gregory RJ, Smith AE, Welsh MJ. Generation of cAMP-activated chloride currents by expression of CFTR. *Science*, 251 (4994): 679-82, 1991.
- Andrini O, Keck M, Briones R, Lourdel S, Vargias-Poussou R, Teulon J. ClC-K chloride channels: Emerging pathophysiology of Bartter Syndrome type 3. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2015.
- Andrini O, Keck M, L'Hoste S, Briones R, Mansour-Hendili L, Grand T, Sepúlveda FV, Blanchard A, Lourdel S, Vargias-Poussou R, Teulon J. CLCNKB mutations causing mild Bartter syndrome profoundly alter the pH and Ca²⁺ dependence of ClC-Kb channels. *Pflugers Arch*; 466(9):1713-23; 2014.
- Ashcroft F, Kakei M. ATP-sensitive K⁺ channels in rat pancreatic β -cells: modulation by ATP and Mg²⁺ ions. *J Physiol*; 416: 349–367, 1989.
- Bailey MA, Cantone A, Yan Q, MacGregor GG, Leng Q, Amorim JB, Wang T, Hebert SC, Giebisch G, Malnic G. 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, 2006.
- Bandulik S, Schmidt K, Rockenhauer D, Zdebik AA, Humberg E, Kleta R, Warth R, Reichold M. The salt-wasting phenotype of EAST syndrome, a disease with multifaceted symptoms linked to the KCNJ10 K⁺ channel. *Pflugers Arch – Eur J Physiol*; 461:423-435, 2011.
- Bandulik S, Tauber P, Schweda F, Teqtmeyer I, Sterner C, Lalli E, Lesage F, Hartmann M, Barhanin J, Warth R, Severe hyperaldosteronism in neonatal Task3 potassium channel knockout mice is associated with activation of the intraadrenal renin-angiotensin system. *Endocrinology*; 154(8): 2712-22, 2013.
- Barriere H, Belfodil R, Rubera I, Tauc M, Lesage F, Poujeol C, Guy N, Barhanin J, Poujeol P. Role of TASK2 potassium channels regarding volume regulation in primary cultures of mouse proximal tubules. *J Gen Physiol*. 122(2): p. 177-90, 2003.

- Bear C.E., Purification and functional reconstitution of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *Cell*, 68(4):809-18, 1992.
- Beesley A.H, Qureshi IZ, Giesberts AN, Parker AJ, White SJ. Expression of sulphonylurea receptor protein in mouse kidney. *Pflugers Arch.* 438(1): p. 1-7, 1999.
- Berger H.A, Anderson MP, Gregory RJ, Thompson S, Howard PW, Maurer RA, Mulligan R, Smith AE, Welsh MJ. Identification and regulation of the cystic fibrosis transmembrane regulator-generated chloride channel. *Clin Invest*, 88(4):1422-31, 1991.
- Bi MM, Hong S, Zhou HY, Wang HW, Wang LN, Zheng YJ. Chloride channelopathies of ClC-2. *Int J Mol Sci.*15(1):218-49. 2013.
- Birkenhäger R, Otto E, Schürmann MJ, Vollmer M, Ruf EM, Maier-Lutz I, Beekmann F, Fekete A, Omran H, Feldmann D, Milford DV, Jeck N, Konrad M, Landau D, Knoers NV, Antignac C, Sudbrak R, Kispert A, Hildebrandt F. Mutation of BSND causes Bartter syndrome with sensorineural deafness and kidney failure. *Nat Genet* ; 29(3):310-4, 2001.
- Blanz J, Schweizer M, Auberson M, Maier H, Muenscher A, Hübner CA, Jentsch TJ. Leukoencephalopathy upon disruption of the chloride channel ClC-2. *J Neurosci.* 27(24):6581-9. 2007.
- Blot-Chabaud M, Wanstok F, Bonvalet JP, Farman N. Cell Sodium-Induced Recruitment of Na⁺-K⁺-ATPase Pumps in Rabbit Cortical Collecting Tubules Is Aldosterone-dependant. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol.265 N°20 pp.11676-11681, 1990.
- Bockenhauer D, Feather S, Stanescu HC, Bandulik S, Zdibik AA, Reichold M, Tobin J, Lieberer E, Sterner C, Landoure G, Arora R, Sirimanna T, Thompson D, Cross JH, Van't Hoff W, Al Masri O, Tullus K, Yeung S, Anikster Y, Klootwijk E, Hubank M, Dillon MJ, Heitzmann D, Arcos-Burgos M, Knepper MA, Dobbie A, Gahi WA, Warth R, Sheridan E, Kleta R. Epilepsy, Ataxia, Sensorineural Deafness, Tubulopathy, and KCNJ10 Mutations. *N Engl J Med*; 360;19, 2009.
- Boim M.A, Ho K, Shuck ME, Bienkowski MJ, Block JH, Slightom JL, Yang Y, Brenner BM, Hebert SC. ROMK inwardly rectifying ATP-sensitive K⁺ channel. II. Cloning and distribution of alternative forms. *Am J Physiol.* 268(6 Pt 2): p. F1132-40, 1995.
- Bond C.T, Pessia M, XiaXM, Lagrutta A, Kavanaugh MP, Adelman JP. Cloning and expression of a family of inward rectifier potassium channels. *Receptors Channels.* 2(3): p. 183-91, 1994.
- Bösl MR, Stein V, Hübner C, Zdebik AA, Jordt SE, Mukhopadhyay AK, Davidoff MS, Holstein AF, Jentsch TJ. Male germ cells and photoreceptors, both dependent on close cell-cell interactions, degenerate upon ClC-2 Cl(-) channel disruption. *Embo J*; 20(6): 1289-99, 2001.
- Brandt S, Jentsch TJ. ClC-6 and ClC-7 are two novel broadly expressed members of the CLC chloride channel family. *FEBS Lett* ; 377(1): 15-20, 1995.

- Brecht, D.S, Wang TL, Cohen NA, Guggino WB, Snyder SH. Cloning and expression of two brain-specific inwardly rectifying potassium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92(15): p. 6753-7, 1995.
- Briet M, Vargas-Poussou R, Lourdel S, Houillier P, Blanchard A. How Bartter's and Gitelman's syndromes, and Dent's disease have provided important insights into the function of three renal chloride channels: CLC-KA/b and ClC-5. *Nephron Physiol* ; 103(1): p7-13,2006.
- Brochard K, Wallendorf B, Gagnon D, LapradeR, Lapointe JY. Phenotype-genotype correlation in antenatal and neonatal variants of Barttes syndrome. *Nephrol Dial Transplant*, 24(5):1455-64, 2009.
- Brochiero E., et al., *Cloning of rabbit Kir6.1, SUR2A, and SUR2B: possible candidates for a renal K(ATP) channel*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2002. 282(2): p.F289-300.
- Burg M.B., Thick ascending limb of Henle's loop. *Kidney Int.*, 22:454-64, 1982.
- C.Huang, A. Sindic, C.E. Hill, K.M. Hujer, K.W. Chan, M. Sassen, Z. Wu, Y.Kurachi, S. Nielsen, M.F. Romero, R.T. Miller. Interaction of the Ca²⁺-sensign receptor with the inwardly rectifying potassium channels Kir4.1 and Kir4.2 results in inhibition of channel function. *Am. J. Physiol*; 292:F1073-F1081, 2007 .
- Chan K.W, Langan MN, Sui JL, Kozak JA, Pabon A, Ladias JA, Logothetis DE. A recombinant inwardly rectifying potassium channel coupled to GTP-binding proteins. *J Gen Physiol*. 107(3): p. 381-97, 1996.
- Chavez, R.A, Gray AT, Zhao BB, Kindler CH, Mazurek MJ, Mehta Y, Forsaveth JR, Yost CS. TWIK-2, a new weak inward rectifying member of the tandem pore domain potassium channel family. *J Biol Chem*. 274(12): p. 7887-92, 1999.
- Chen MF, Chen TY. Different fast-gate regulation by external Cl⁻ and H⁺ of the muscle-type ClC chloride channels. *J Gen Physiol*,118(1):23-32, 2001.
- Chen P, Guzman JP, Leong PK, Yang LE, Perianayagam A, Babilonia E, Ho JS, Young JH, Wang WH, McDonough AA. Modest dietary K⁺ restriction provokes insulin resistance of cellular K⁺ uptake and phosphorylation of renal outer medulla K⁺ channel without fall in plasma K⁺ concentration. *Am J Cell Physiol*, 290(5): PC1355-63, 2006.
- Cleiren E, Bénichou O, Van Hul E, Gram J, Bollerslev J, Singer FR, Beaverson K, Aledo A, Whyte MP, Yoneyama T, deVernejoul MC, Van Hul W. Albers-Schönberg disease (autosomal dominant osteopetrosis, type II) results from mutations in the ClCN7 chloride channel gene. *Hum Mol Genet* ; 10(25): 2861-7, 2001.
- Cluzeaud, F, Reyes R, Escoubet B, Fay M, Lazdunski M, Bonvalet JP, Lesage F, Garman N. Expression of TWIK-1, a novel weakly inward rectifying potassium channel in rat kidney. *Am J Physiol*. 275(6 Pt 1): p. C1602-9, 1998.

- Crawford I, Maloney PC, Zeitlin PL, Guggino WB, Hyde SC, Turley H, Gatter KC, Harris A, Higgins CF. Immunocytochemical localization of the cystic fibrosis gene product CFTR. *Proc Natl Sci USA*, 88(20):9262-6, 1991.
- Cui, J., D.H. Cox, and R.W. Aldrich, Intrinsic voltage dependence and Ca²⁺ regulation of mslo large conductance Ca-activated K⁺ channels. *J Gen Physiol*. 109(5): p. 647-73, 1997.
- D. Oliver, T. Baukrowitz, B. Fakler. Polyamines as gating molecules of inward-rectifier K⁺ channels. *Eur. J. Biochem*, 267, 5824-5829, 2000.
- Dahlmann, A, Li M, Gao Z, McGarrigle D, Sackin H, Palmer LG. Regulation of Kir channels by intracellular pH and extracellular K(+): mechanisms of coupling. *J Gen Physiol*. 123(4): p. 441-54, 2004.
- deHart G.W, Jin T, McCloskey DE, Pegg AE, Sheppard D. The $\alpha 9\beta 1$ integrin enhances cell migration by polyamine-mediated modulation of an inward-rectifier potassium channel. *PNAS*; Vol 105 n°20 7188-7193, 2008.
- Demolombe, S, Franco D, De Boer P, Juperschmidt S, Roden D, Pereon Y, Jarry A, Moorman AF, Escande D. Differential expression of KvLQT1 and its regulator IsK in mouse epithelia. *Am J Physiol Cell Physiol*. 280(2): p. C359-72, 2001.
- Depienne C, Bugiani M, Dupuits C, Galanaud D, Touitou V, Postma N, van Berkel C, Polder E, Tollard E, Darios F, Brice A, de Die-Smulders CE, Vles JS, Vanderver A, Uziel G, Yalcinkaya C, Frints SG, Kalscheuer VM, Klooster J, Kamermans M, Abbink TE, Wolf NI, Sedel F, van der Knaap MS. Brain white matter oedema due to ClC-2 chloride channel deficiency: an observational analytical study. *Lancet Neurol*. 12(7):659-68. 2013.
- Derst C, Karschin C, Wischmeyer E, Hirsch JR, Preisig-Müller R, Rajan S, Engel H, Grzeschik K, Daut J and Karschin A, Genetic and functional linkage of Kir5.1 and Kir2.1 channel subunits. *FEBS Lett*; 491(3) :305-11, 2001 .
- Derst, C, Hirsch JR, Preisig-Muller R, Wischmeyer E, Karschin A, Doring F, Thomzig A, Veh RW, Schlatter R, Kummer W, Daut J. Cellular localization of the potassium channel Kir7.1 in guinea pig and human kidney. *Kidney Int*. 59(6): p. 2197-205, 2001.
- Deschênes G¹, Fila M. Primary Molecular Disorders and Secondary Biological Adaptations in Bartter Syndrome. *Int J Nephrol*. 2011:396209. 2011.
- Devuyst O. and Luciani A. Chloride transporters and receptor-mediated endocytosis in the renal proximal tubule. *J Physiol*, 10.1113/JP270087, 2015.
- Devuyst O. Salt wasting and blood pressure. *Nat Genet* ; 40(5): 495-6, 2008.
- Doring, F, Derst C, Wischmeyer E, Karschin C, Schnaggenburger R, Daut J, Karschin A. The epithelial inward rectifier channel Kir7.1 displays unusual K⁺ permeation properties. *J Neurosci*. 18(21): p. 8625-36, 1998.

- Dutzler R., Campbell E.B. and MacKinnon R. Gating the selectivity filter in ClC Chloride Channels. *Science*, Vol 300:108-112, 2003.
- E.I.Christensen and J. Gburek, Protein reabsorption in renal proximal tubule-function and dysfunction in kidney pathophysiology. *Pediatr Nephrol*, 19:714-721, 2004.
- Edvinsson JM, Shah AJ, Palmer LG. Potassium-dependant activation of Kir4.2 K⁺ channel. *J Physiol*; 589.24 pp 5949-5963, 2011 .
- Edwards A, Layton AT. Calcium dynamics underlying the myogenic response of the renal afferent arteriole. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*. 306(1):F34-F48, 2014.
- Eladari D, Hübner CA. Novel mechanisms for NaCl reabsorption in the collecting duct. *Curr Opin Nephrol Hypertens*; 20(5): 506-11, 2011.
- Elble D.H, Ji G, Nehrke K, DeBiasio J, Kotlikoff MI, Pauli BU. Molecular and functional characterization of a murine calcium-activated chloride channel expressed in smooth muscle. *J Biol Chem*, 277(21): 18586-91, 2002.
- Estevez R., Boettger T, Stein V., Birkenhäger R., Otto E., Hildebrandt F., Jentsch TJ. Barttin is a Cl-channel beta-subunit crucial for renal Cl⁻ reabsorption and inner ear K⁺ secretion. *Nature*; 414(6863): 558-61, 2001.
- Evans S.R, Thoreson WB, Beck CL. Molecular and functional analysis of two new calcium-activated chloride channel family members from mouse ere and intestine. *J Biol Chem* 279(40): 41792-800, 2004.
- Fahlke C, Fischer M. Physiology and pathophysiology of ClC-K/barttin channels. *Front Physiol* ; 1: 155,2010.
- Feng L, Campbell EB, Hsiung Y, MacKinnon R. Structure of a eukaryotic CLC transporter defines an intermediate state in the transport cycle. *Science* ; 330(6004): 635-41, 2010.
- Feraille E. and Doucet A., Sodium-potassium-adenosinetriphosphatase-dependent sodium transport in the kidney: hormonal control. *Physiol Rev*, 81(1): p. 345-418, 2001.
- Field M.J, Staton BA, Giebisch GH. Differential acute effects of aldostérone, dexamethasone, and hyperkalemia on distal tubular potassium secretion in the rat kidney. *J Clin Inverst*, 74(5): p. 1792-802, 1984.
- Fischer M, Janssen AG, Fahlke C. Barttin activates ClC-K channel function by modulating gating. *J Am Soc Nephrol* ; 21(8): 1281-9, 2010.
- Fisher SE, Black GC, Lloyd SE, Hatchwell E, Wrong O, Thakker RV, Craig IW. Isolation and partial characterization of a chloride channel gene which is expressed in kidney and is a candidate for Dent's disease (an X-linked hereditary nephrolithiasis). *Hum Mol Genet* ; 3(11): 2053-9, 1994.

- Freudenthal B, Kulaveerasingam D, Lingappa L, Shah MA, Brueton L, Wassmer E, Ognjanovic M, Dorison N, Reichold M, Bockenbauer D, Kleta R, Zdebik AA. KCNJ10 mutations disrupt function in patients with EAST syndrome. *Nephron Physiol*; 1119 :p40-p48, 2011 .
- Friedrich T, Breiderhoff T, Jentsch TJ. Mutational analysis demonstrates that ClC-4 and ClC-5 directly mediate plasma membrane currents. *J Biol Chem* ; 274(2): 896-902, 1999.
- Frindt G, Palmer LG. Apical potassium channels in the rat connecting tubule. *Am J Physiol Renal Physiol* 287: F1030–F1037, 2004.
- Fu J, Fu J, Gao B, Wang L, Zhang N, Li X, Ji Q. Expression patterns of ClC-3 mRNA and protein in aortic smooth muscle, kidney and brain in diabetic rats. *Clin Invest Med*. 33(3):E146-54. 2010.
- Gandhi RE, Ible RC, Gruber AD, Schreur KD, Ji HL, Fuller CM, Pauli BU. Molecular and functional characterization of a calcium-sensitive chloride channel from mouse lung. *J Biol Chem*, 273(48): 32096-101, 1998.
- Giebisch G. and Wang W., Potassium transport: from clearance to channels and pumps. *Kidney Int*, 49(6): p. 549-55, 1996.
- Giebisch G., Renal potassium channels: function, regulation and structure. *Kidney Int*. 60(2): p. 436-45, 2001.
- Giebisch G., Renal potassium transport: mechanisms and regulation. *Am J Physiol*, 274(5 Pt 2): p. F817-33, 1998.
- Goldman, D.E., Potential, impedance, and rectification in membranes. *The Journal of General Physiology*. 27: p. 37-60, 1943.
- Gradogna A, Babini E, Picollo A, Pusch M. A regulatory calcium-binding site at the subunit interface of ClC-K kidney chloride channels. *J Gen Physiol*, 136(3):311-23, 2011.
- Grand T. 2010. Analyse fonctionnelle de mutations du gène CLCN5 impliquées dans la maladie de Dent. *Thèse de doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie*:48-58.
- Graves AR, Curran PK, Smith CL, Mindell JA. The Cl⁻/H⁺ antiporter ClC-7 is the primary chloride permeation pathway in lysosomes. *Nature* ; 453(7196): 788-92, 2008.
- Greger R. and Schlatter E., Properties of the lumen membrane of the cortical thick ascending limb Henle's loop of rabbit kidney. *Pflugers Arch*. 396(4): p. 315-24, 1983.
- Greger R. and Sckatter E., Presence of luminal K⁺, a prerequisite for active NaCl transport in the cortical ascending limb of Henle's loop of rabbit kidney. *Pflugers Arch*, 392:92-4, 1981.
- Greger R., Cation selectivity of the isolated cortical thick ascending limb of Henle's loop of rabbit kidney. *Pflugers Arch*, 390:30-7, 1981.
- Gruber A.D, Gandhi R, Pauli BU. The murine calcium-sensitive chloride channel (mCaCC) is widely expressed in secretory epithelia and in other select tissues. *Histochem Cell Biol*, 110(1): 43-9, 1998.

- Guggino SE, Guggino WB, Green N, Sacktor B. Blocking agents of Ca²⁺-activated K⁺ channels in cultured medullary thick ascending limb cells. *Am J Physiol* ; 252:C128–C137.1987.
- 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*; 95(14): 8075-80, 1998.
- Günther W, Piwon N, Jentsch TJ. The ClC-5 chloride channel knock-out mouse - an animal model for Dent's disease. *Pflugers Arch* ; 445(4): 456-62, 2003.
- Halperin M.L. and Kamel K.S., Potassium. *Lancet*, 352(9122): p135-40, 1998.
- Hamill, O.P, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch*. 391(2): p.85-100, 1981.
- Hara-Chikuma M, Wang Y, Guggino SE, Guggino WB, Verkman AS. Impaired acidification in early endosomes of ClC-5 deficient proximal tubule. *Biochem Biophys Res Commun*, 329(3):941-5, 2005.
- Haug K, Warnstedt M, Alekov AK, Sander T, Ramírez A, Poser B, Maljevic S, Hebeisen S, Kubisch C, Rebstock J, Horvath S, Hallmann K, Dullinger JS, Rau B, Haverkamp F, Beyenburg S, Schulz H, Janz D, Giese B, Müller-Newen G, Propping P, Elger CE, Fahlke C, Lerche H, Heils A. Mutations in CLCN2 encoding a voltage-gated chloride channel are associated with idiopathic generalized epilepsies. *Nat Genet*; 33(4): 527-32, 2003.
- Hebert S.C. and Andreoli T.E., Control of NaCl transport in the thick ascending limb, *Am J Physiol*, 246(6 Pt 2): p. F745-56, 1984.
- Hebert SC. Bartter syndrome. *Curr Opin Nephrol Hypertens* ; 12(5): 527-32, 2003.
- Hebert, S.C, Desir G, Giebisch G, Wang W. Molecular diversity and regulation of renal potassium channels. *Physiol Rev*, 85:319-371, 2005.
- Hibino, H., Fujita, A., Iwai, K., Yamada, M., and Kurachi, Y. Differential assembly of inwardly Rectifying K⁺ channel subunits, Kir4.1 and Kir5.1, in brain astrocytes. *J Biol Chem*, 279:44065-44073, 2004.
- Hibino, H., Inanobe, A., Furutani, K., Murakami, S., Findlay, I., and Kurachi, Y. Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol Rev*, 90:291-366, 2010.
- Hille, B., Ionic channels of excitable membranes. 2nd ed. 1992: Sinauer Associates Inc.
- Hirano J, Nakamura K, and Kubokawa M. Properties of a Ca(2+)-activated large conductance K(+) channel with ATP sensitivity in human renal proximal tubule cells. *Jpn J Physiol* 51: 481–489, 2001.

- Hirano J, Nakamura K, Itazawa S, Sohma Y, Kubota T, and Kubokawa M. Modulation of the Ca²⁺-activated large conductance K_v channel by intracellular pH in human renal proximal tubule cells. *Jpn J Physiol* 52: 267–276, 2002.
- Ho K, Nichols CG, Lederer WJ, Lytton J, Vassilev PM, Kanazirska MV, Hebert SC. Cloning and expression of an inwardly rectifying ATP-regulated potassium channel. *Nature*. 362(6415): p. 31-8, 1993.
- Hodgkin, A.L. and B. Katz, The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid. *J Physiol*. 108(1): p. 37-77, 1949.
- Hou J, Renigunta A, Yang J, Waldegger S. Claudin-4 forms paracellular chloride channel in the kidney and requires claudin-8 for tight junction localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* ; 107(42): 18010-5, 2010.
- Huang LY, He Q, Liang SJ, Su YX, Xiong LX, Wu QQ, Wu QY, Tao J, Wang JP, Tang YB, Lv XF, Liu J, Guan YY, Pang RP, Zhou JG. CIC-3 chloride channel/antiporter defect contributes to inflammatory bowel disease in humans and mice. *Gut*. 63(10):1587-95. 2014.
- Imbert-Teboul M, Doucet A, Marsy S, Siaume-Perez S. Alterations of enzymatic activities along rat collecting tubule in potassium depletion. *Am J Physiol*, 253(3 Pt 2): p. F408-17, 1987.
- J.M. Edvinsson, A.J. Shah, L.G. Palmer, Potassium-dependent activation of Kir4.2 K⁺. *J Physiol*, 589.24 pp 5949-5963, 2011.
- Jan, L.Y. and Y.N. Jan, Cloned potassium channels from eukaryotes and prokaryotes. *Annu Rev Neurosci*. 20: p. 91-123, 1997.
- Jentsch T.J., CIC chloride channels and transporters: from genes to protein structure, pathology and physiology, *Crit Rev Biochem Mol Biol*; 43(1): 3-36, 2008.
- Jentsch T.J., Steinmeyer K. and Schwarz G. Primary structure of *Torpedo marmorata* chloride channel isolated by expression cloning in *Xenopus* oocyte. *Nature*, 348(6301): 510-4, 1990.
- Jentsch TJ, Günther W, Pusch M, Schwappach B. Properties of voltage-gated chloride channels of the CIC gene family. *J Physiol* ; 482: 19S-25S, 1995.
- Jentsch T.J., Stein V., Weinreich F. and Zdebik A.A., Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol Rev*; 82(2): 503-68, 2002.
- Jeworutzki E., Lopez-Hernandez T., Capdevila-Nortes X., Sirisi S, Bengtsson L., Montolio M., Zifarelli G., Arnedo T., Müller CS., Schulte U., Nunes V, Martinez A., Jentsch TJ., Gasull X., Pusch M, Estevez R. GlialCAM, a protein defective in a leukodystrophy, serves as CIC-2 Cl⁻ channel auxiliary subunit. *Neuron*; 73(5): 951-61, 2012.
- Keck M. 2012. *Analyse fonctionnelle de mutations pathogènes du canal chlorure CIC-KB impliquées dans le syndrome de Bartter*. Thèse de doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie.

- Ketchum, K.A, Joiner WJ, Sellers AJ, Kaczmarek LK, Goldstein SA. A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. *Nature*. 376(6542): p. 690-5, 1995.
- Kieferle S, Fong P, Bens M, Vandewalle A and Jentsch TJ, Two highly homologous members of the ClC chloride channel family in both rat and human kidney. *Proc Natl Acad Sci USA*; 91(15): 6943-7, 1994.
- Kobayashi K, Uchida S, Mizutani S, Sasaki S, Marumo F. Intrarenal and cellular localization of CLC-K2 protein in the mouse kidney. *J Am Soc Nephrol*; 12(7): 1327-34, 2001.
- Kobayashi K, Uchida S, Okamura HO, Marumo F, Sasaki S. Human CLC-KB gene promoter drives the EGFP expression in the specific distal nephron segments and inner ear. *J Am Soc Nephrol* ; 13: 1992–1998,2002.
- Koch M.C.,Steinmeyer K.,Lorenz C.,Ricker K., Wolf F., Otto M., Zoll B., Lehmann-Horn F., Grzeschik K.-H., Jentsch T.J.The skeletal muscle chloride channel in dominant and recessive human myotonia. *Science* ; 257:797-800, 1992.
- Koeppen B.M. B.A. Stanton, Renal Physiology. Third ed, ed. W. Schmitt. 2001: Mosby.
- Kornak U, Kasper D, Bösl MR, Kaiser E, Schweizer M, Schulz A, Friedrich W, Delling G, Jentsch TJ. Loss of the ClC-7 chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man. *Cell*; 104(2): 205-15,2001.
- Krapivinsky G, Medina I, Eng L, Krapivinsky L, Yang Y, Clapham DE. A novel inward rectifier K⁺ channel with unique pore properties. *Neuron*. 20(5): p. 995-1005, 1998.
- Kubo Y, Baldwin TJ, Jan YN, Jan LY. Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel. *Nature*. 362(6416): p. 127-33, 1993.
- Kunzelmann K. CFTR interacting with everything ? *News Physiol Sci*, 167-70, 2001.
- L'Hoste S., Diakov A., Andrini O., Genete M., Pinelli L., Grand T., Keck M., Paulais M., Beck L., Korbmacher C., Teulon J. and Lourdel S. Characterization of the mouse ClC-K1/Barttin chloride channel. *Biochimica and Biophysica Acta*, p.2399-2409, 2013.
- Lachheb S, Cluzeaud F, Bens M, Genete M, Hibino H, Lourdel S, Kurachi Y, Vandewalle A, Teulon J, Paulais M. Kir4.1/Kir5.1 channel forms the major K⁺ channel in the basolateral membrane of mouse renal collecting duct principal cells. *Am J Renal Physiol* ; 294 :F1398-F1407, 2008.
- Lachheb S. Etude des canaux potassiques de la membrane basolatérale du nephron distal de souris. 2007
- Lam HD, Lemay AM, Briggs MM, Yung M, Hill CE. Modulation of Kir4.2 rectification properties and pH_i-sensitive run-down by association with Kir5.1. *Biochimica et Biophysica Acta* 1758(11): 1837-1845, 2006 .

- Lang, R, Lee G, Liu W, Tian S, Rafi H, Orias M, Segal AS, Desir GV. KCNA10: A novel ion channel functionally related to both voltagegated potassium and CNG cation channels. *Am J Physiol Renal Physiol*. 278(6): p. F1013-21, 2000.
- Lange PF., Wartosch L., Jentsch TJ., Fuhrmann JC. CIC-7 requires ostm1 as a beta-subunit to support bone resorption and lysosomal function. *Nature*; 440(7081): 220-3, 2006.
- Leichtle A, Rauch U, Albinus M, Benöhr P, Mack AF, Veh RW, Quast U, Russ U, Electrophysiological and melocular characterization of the inward rectifier in juxtglomerular cells from rat kidney. *J Physiol*; 560(Pt 2) :365-76, 2004 .
- Leisle L, Ludwig CF, Wagner FA, Jentsch TJ, Stauber T. CIC-7 is a slowly voltage-gated 2Cl(-)/1H(+)-exchanger and requires Ostml for transport activity. *Embo J* ; 30(11): 2140-52,2011.
- Lesage, F, Guillemare E, Fink M, Duprat F, Lazdunski M, Romey G, Barhanin J. TWIK-1, a ubiquitous human weakly inward rectifying K⁺ channel with a novel structure. *Embo J*. 15(5): p. 1004-11, 1996.
- Leviel F, Hubner CA, Houiller P, Morla L, El Moghrabi S, Brideau G, Hassan H, Parker MD, Kurth I, Kougioumtzes A, Sinning A, Pech V, Riemony KA, Miller RL, Hummier E, Shull GE, Aronson PS, Doucet A, Wall SM, Chambrey R, Eladari D. The Na⁺-dependent chloride-bicarbonate exchanger slc4a8 mediates an electroneutral na⁺ reabsorption process in the renal cortical collecting ducts of mice. *J.Clin. Invest*, 120, 1627-1635, 2010.
- Li X, Shimada K, Showalter LA, Weinman SA. Biophysical properties of CIC-3 differentiate it from swelling-activated chloride channels in Chinese hamster ovary-K1 cells. *J Biol Chem*; 275(46): 35994-8, 2000.
- Linley JE, Boese SH, Simmons NL, Gray MA. A voltage-dependent Ca²⁺ influx pathways regulates the Ca²⁺-dependent Cl(-) conductance of renal IMCD-3 cells. *J Membr Biol*. 230(2):57-68, 2009.
- Lloyd EE, Pandit LM, Crossland RF, Marrelli SP, Bryan RM Jr. Endothelium-dependent relaxations in the aorta from K2P6.1 knockout mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 305: R60–R67, 2013.
- Loewen M.E. and Forsyth G.W. Structure and function of CLCA proteins. *Physiol Rev*, 85(3):1061-92, 2005.
- Loffing J, Zecevic M, Féraille E, Kaissling B, Asher C, Rossier BC, Firestone GL, Pearce D, Verreyr F. Aldosterone induces rapid translocation of ENaC in early portion of renal collecting system: possible role of SGK. *Am J Physiol Renal Physiol*, 280(4): p. F675-82, 2001.
- Lourdel S, Grand T, Burgos J, Gonzales W, Sepulveda FV, Teulon J, CIC-5 mutations associated with Dent's disease: a major role of the dimer interface. *Pflugers Arch – Eur J Physiol*; 463: 2474-256, 2012.

- Lourdel S, Paulais M, Cluzeaud F, Bens M, Tanemoto M, Kurachi Y, Vandewalle A, Teulon J. 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, 2002.
- Lourdel S, Paulais M, Marvao P, Nissant A, Teulon J. A chloride channel at the basolateral membrane of the distal-convoluted tubule: a candidate ClC-K channel. *J Gen Physiol*; 121(4): 287-300,2003.
- Lu M, Leng Q, Egan ME, Caplan MJ, Boulpaep EL, Giebisch GH, Hebert SC. CFTR is required for PKA-regulated ATP sensitivity of Kir1.1 potassium channels in mouse kidney. *J Clin Invest* 116(3): p. 797-807, 2006.
- Lu M, Wang T, Yan Q, Yang X, Dong K, Knepper MA, Wang W, Giebisch G, Shull GE, Hebert SC. Absence of small conductance K_v 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, 2002.
- Lu M, Wang WH. Nitric oxide regulates the low-conductance K⁺ channel in basolateral membrane of cortical collecting duct. *Am J Physiol*, 270(5 Pt 1): p. C1336-42, 1996.
- Lueck JD, Rossi AE, Thornton CA, Campbell KP, Dirksen RT, Sarcolemmal-restricted localization of functional ClC-1 channels in mouse skeletal muscle. *J Gen Physiol*. 136(6):597-613, 2010.
- M. Tanemoto, N. Kittaka, A. Inanonbe, Y. Kurachi. In vivo formation of a proton-sensitive K⁺ channel by heteromeric subunit assembly of Kir5.1 with Kir4.1. *Journal of physiology*, 525.3, pp587-592, 2000.
- Ma L, Roman-Campos D, Austin ED, Eyries M, Sampson KS, Soubrier F, Germain M, Tregouet DA, Borczuk A, Rosenzweig EB, Girerd B, Montani D, Humbert M, Loyd JE, Kass RS, Chung WK. A novel channelopathy in pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 369: 351–361, 2013.
- Malnic G. et al., *Regulation of potassium excretion*. In : The Kidney physiology and pathophysiology, 2000, Edited by Seldin DW and Giebisch G. New York: Lippincott Williams and Wilkins.
- Maritzen T, Rickheit G, Schmitt A, Jentsch TJ. Kidney-specific upregulation of vitamin D3 target genes in ClC-5 KO mice. *Kidney Int* ; 70(1): 79-87, 2006.
- Maritzen T, Keating DJ, Neagoe I, Zdebik AA, Jentsch TJ. Role of the vesicular chloride transporter ClC-3 in neuroendocrine tissue. *J Neurosci*. 28(42):10587-98. 2008.
- Masour-Hendili L, Blanchard A, Pottier NL, Roncelin I, Lordel S, Tread C, Gonzales W, Vergara-Jaqua A, Morin G, Colin E, Holder-Espinasse M, Bacchetta J, Baudouin V, Benoit S, Berard E, Bourdat-Michel G, BouchirebK, Burtey S, Cailliez M, Cardon G, Cartery C, Champion G, Chauveau D, Chochat P, Dahan K, La Faille R, Devray FG, DehouxL, Deschenes G, Desport E,

Devuyst O, Diequez S, Emma F, Fischbach M, Fougue D, Fourcade J, François H, Gilbert-Dussardier B, Hannedouche T, Houiller P, Izzedine H, Janner M, Karras A, Knebelmann B, Lavocat MP, Lemoine S, Leroy V, Loirat C, Macher MA, Martin-Coignard D, Morin D, Niaudet P, Nivet H, Nobili F, Novo R, Faivre L, Rigotherier C, Rousey-Kesler G, Salomon R, Schleich A, Seillier-Leclerc AL, Souлами K, Triple A, Unlinski T, Vanhille P, Van Regemorter N, Jeunemaitre X, Vargas-Poussou R. Mutation Update of the CLCN5 gene responsible for Dent disease 1. *Human Mutation*, 2015.

- Mathews A.E.W, Mathews CE. Inherited β -cell dysfunction in lean individuals with type 2 diabetes. *Diabetes*; Vol.61 p.1734, 2012 .
- Matsuda JJ, Filali MS, Collins MM, Volk KA, Lamb FS. The ClC-3 Cl⁻/H⁺ antiporter becomes uncoupled at low extracellular pH. *J Biol Chem*; 285(4): 2569-79, 2010.
- Matsumura Y, Uchida S, Kondo Y, Miyazaki H, Ko S, Hayama A, Morimoto T, Liu W, Arisawa M, Sasaki S, Marumo F. Overt nephrogenic diabetes insipidus in mice lacking the CLC-K1 chloride channel. *Nat Genet* ; 21(1):95-8. 1999.
- Mauerer U.R, Boulpaep EL, Segal AS. Properties of an inwardly rectifying ATP-sensitive K⁺ channel in the basolateral membrane of renal proximal tubule. *J Gen Physiol*, 111(1): p. 139-60, 1998.
- Mennitt P.A, Frindt G, Silvers RB, Palmer LG. Potassium restriction downregulates ROMK expression in rat kidney. *Am J Renal Physiol*, 278(6) : p. F916-24, 2000.
- Millar ID, Taylor HC, Cooper GJ, Kibble JD, Barhanin J, Robson L. Adaptive downregulation of a quinidine-sensitive cation conductance in renal principal cells of TWIK-1 knockout mice. *Pflugers arch*. 453(1):107-16. 2006.
- Millar, I.D, Taylor HC, Cooper GJ, Kibble JD, Robson L. A Kir2.3-like K⁺ conductance in mouse cortical collecting duct principal cells. *J Membr Biol*. 211(3): p. 173-84, 2006.
- Mohammad-Panah R, Wellhauser L, Steinberg BE, Wang Y, Huan LJ, Liu XD, Bear CE. An essential role for ClC-4 in transferrin receptor function revealed in studies of fibroblasts derived from ClCN4-null mice. *J Cell Sci*. 122(8):1229-37. 2009.
- Morales M.M, Carroll TP, Morita T, Schwiebert EM, Devuyst O, Wilson PD, Lopes AG, Stanton BA, Dietz HC, Cutting GR, Guggino WB. Both the wild type and a functional isoform of CFTR are expressed in Kidney. *Am J Physiol*, 270(6 Pt 2): F1038-48, 1996.
- Morton, M.J, Abohamed A, Sivaprasadarao A, Hunter M. pH sensing in the two-pore domain K⁺ channel, TASK2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102(44): p. 16102-6, 2005.
- Murer H., Hernando N., Forster I. and Biber J. Proximal tubular phosphate reabsorption: molecular mechanisms. *Physiological review*, Vol.80, N°4, 2000.

- Muto S, Asano Y, Wang W, Seldin D, Giebisch G. Activation of the basolateral K⁺ channels is coupled to the Na⁺/K⁺-ATPase in the cortical collecting duct. *Am J Renal Physiol*, 285(5): p. F945-54, 2003.
- Nahum H, Paillard M, Prigent A, Leviel F, Bichara M, Gardin JP, Idatte JM Pseudohypoaldosteronism type II: proximal renal tubular acidosis and dDAVP-sensitive renal hyperkalemia. *Am J Nephrol*; 6:253-262, 1986.
- Neher, E. and B. Sakmann, Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature*. 260(5554): p. 799-802, 1976.
- Neher, E., Correction for liquid junction potentials in patch clamp experiments. *Methods Enzymol*. 207: p. 123-31, 1992.
- Ng, B. and P.H. Barry, The measurement of ionic conductivities and mobilities of certain less common organic ions needed for junction potential corrections in electrophysiology. *J Neurosci Methods*. 56(1): p. 37-41, 1995.
- Nie X, Arrighi I, Kaissling B, Pfaff I, Mann J, Barhanin J, Vallon V. Expression and insights on function of potassium channel TWIK-1 in mouse kidney. *Pflugers Arch*. 451(3):479-88. 2005.
- Niemeyer MI, Yusef YR, Cornejo I, Flores CA, Sepúlveda FV, Cid LP. Functional evaluation of human ClC-2 chloride channel mutations associated with idiopathic generalized epilepsies. *Physiol Genomics*; 19(1): 74-83, 2003.
- Niemeyer MI, Cid P, Peña-Münzenmayer G, Sepúlveda FV. Separate Gating Mechanisms Mediate the Regulation of K_{2p} Potassium Channel TASK-2 by Intra- and Extracellular pH. *The Journal of Biological Chemistry*, 285, 16467-16475. May 28, 2010.
- Nijenhuis T, Vallon V, Van Der Kemp AW, Loffing J, Hoenderop JG, Bindels RJ. Enhanced passive Ca²⁺ reabsorption and reduced Mg²⁺ channel abundance explains thiazide-induced hypocalciuria and hypomagnesemia. *J Clin Invest*; 115:1651–1658, 2005 .
- Nissant A, Lourdel S, Baillet S, Paulais M, Marvao P, Teulon J, Imbet-Teboul M. Heterogeneous distribution of chloride channels along the distal convoluted tubule probed by single-cell RT-PCR and patch-clamp. *Am J Physiol Renal Physiol*, 287: F1233-F1243, 2004.
- Nissant A, Paulais M, Lachheb S, Lourdel S, Teulon J. Similar chloride channels in the connecting tubule and cortical collecting duct of the mouse kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* ; 290(6): F1421-9, 2006.
- Nissant A. et al. *Similar chloride channels in the connecting tubule and cortical collecting duct of the mouse kidney*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2006, 290:F1421-9.
- Novarino G, Weinert S, Rickheit G, Jentsch TJ. Endosomal chloride-proton exchange rather than chloride conductance is crucial for renal endocytosis. *Science* ; 328(5984): 1398-401, 2010.

- Okamoto K, Iwasaki N, Dol K, Noiri E, Iwamoto Y, Uchigata Y, Fujita T, Tokunaga K. Inhibition of glucose-stimulated insulin secretion by KCNJ15, a newly susceptibility gene for type 2 diabetes. *Diabetes*, 61(7):1734-41, 2012.
- Orias, M, Velazquez H, Tung F, Lee G, Desir GV Cloning and localization of a double-pore K channel, KCNK1: exclusive expression in distal nephron segments. *Am J Physiol*. 273(4 Pt 2): p.F663-6, 1997.
- Palmer L.G, Antonian L, Frindt G. Regulation of apical K and Na channels and Na/K pumps in rat cortical collecting tubule by dietary K. *J Gen Physiol*, 104(4): p. 693-710, 1994.
- Panaghie, G., K.K. Tai, and G.W. Abbott, Interaction of KCNE subunits with the KCNQ1 K⁺ channel pore. *J Physiol*. 570(Pt 3): p. 455-67, 2006.
- Paulais M, Lachheb S, Teulon J. A Na⁺ and Cl⁻ activated K⁺ Channel in the Thick Ascending Limb of Mouse Kidney. *J. Gen. Physiol*, vol.127 N°2, 205-215. 2006.
- Paulais M, Lourdel S, Teulon J, Properties of an inwardly rectifying K(+) channel in the basolateral membrane of mouse TAL. *Am J Physiol Renal Physiol*; 282:F866-876,2002.
- Paulais M, Teulon J. cAMP-activated chloride channel in the basolateral membrane of the thick ascending limb of the mouse kidney. *J Membr Biol*, 113(3): 253-60, 1990.
- Paulais, M., Bloch-Faure, M., Picard, N., Jacques, T., Ramakrishnan, S.K., Keck, M., Sohet, F., Eladari, D., Houillier, P., Lourdel, S., Teulon J. et Tucker S.J. 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, 2011.
- Pearson, W.L, Dourado M, Schreiber M, Salkoff L, Nichois CG. Expression of a functional Kir4 family inward rectifier K⁺ channel from a gene cloned from mouse liver. *J Physiol*. 514 (Pt 3): p. 639-53, 1999.
- 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*. 532(Pt 2): p. 359-67, 2001.
- Picollo A. and Pusch M. Chloride/proton antiporter activity of mammalian CIC proteins CIC-4 and CIC-5. *Nature*; 436(7049): 420-3,2005.
- Piechotta PL, Rapedius M, Stansfeld PJ, Bollepalli MK, Erhlich G, Andres-Enguix I, Fritzenschaft H, Decher N, Sansom MSP, Tucker SJ, Baukowitz T. The pore structure and gating mechanism of K2P channels. *Embo J*, 30(17):306-3619, 2011.
- Piwon N, Günther W, Schwake M, Bösl MR, Jentsch TJ. CIC-5 Cl⁻ channel disruption impairs endocytosis in a mouse model for Dent's disease. *Nature* ; 408(6810): 369-73, 2000.

- Poët M, Kornak U, Schweizer M, Zdebik AA, Scheel O, Hoelter S, Wurst W, Schmitt A, Fuhrmann JC, Planells-Cases R, Mole SE, Hübner CA, Jentsch TJ. Lysosomal storage disease upon disruption of the neuronal chloride transport protein CLC-6. *Proc Natl Acad Sci* ; 103(37): 13854-9,2006.
- Preisig-Muller R, Schlichthorl G, Goerge T, Heinen S, Bruggemann A, Rajan S, Derst C, Veh RW, Daut J. Heteromerization of Kir2.x potassium channels contributes to the phenotype of Andersen's syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*; 99: 7774–7779, 2002 .
- Pusch M., Steinmeyer K., Jentsch J.T. Low single channel conductance of the major skeletal muscle chloride channel CLC-1. *Biophys J*; 66: 149-152,1994.
- Qu C, Liang F, Hu W, Shen Z, Spicer SS, Schulte BA. *Expression of CLC-K chloride channels in the rat cochlea.* *Hear Res* 2006 ; 213(1-2): 79-87.
- Qu Z, Wei RW, Hartzell HC. Characterization of Ca²⁺-activated Cl⁻ currents in mouse kidney inner medullary collecting duct cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 285: F326-F335, 2003.
- Reichold M, Zdebik AA, Lieberer E, Rapedius M, Schmidt K, Bandulik S, Sterner C, Tegmeier I, Penton D, Baukrowitz T, Hulton SA, Witzgall R, Ben-Zeev B, Howie AJ, Kleta R, Bockenhauer D, Warth R. KCNJ10 gene mutations causing EAST syndrome (epilepsy, ataxia, sensorineural deafness, and tubulopathy) disrupt channel function. *PNAS*; vol.107 n°32 14490-14495, 2010 .
- Reilly R.F., and Ellison D.H., Mammalian distal tubule: physiology, pathophysiology, and molecular anatomy. *Physiol Rev*, 80(1): p. 277-313, 2000.
- Reyes, R, Duprat F, Lesage F, Fink M, Salinas M, Farman N, Lazdunski M. Cloning and expression of a novel pH-sensitive two pore domain K⁺ channel from human kidney. *J Biol Chem.* 273(47): p. 30863-9, 1998.
- Rojas A, Cui N, Su J, Yang L, Muhumuza JP, Jiang C. Protein kinase C dependent inhibition of the heteromeric Kir4.1-Kir5.1 channel. *Biochim Biophys Acta.* 1768(9):2030-42. 2007.
- Rychkov GY, Pusch M, Astill DS, Roberts ML, Jentsch TJ, Bretag AH. Concentration and pH dependence of skeletal muscle chloride channel CLC-1. *J Physiol*,497(Pt2):423-35, 1996.
- Sage CL, Marcus DC. Immunolocalization of CLC-K chloride channel in strial marginal cells and vestibular dark cells. *Hear Res* ; 160(1-2): 1-9,2001.
- Sakamoto H, Sado Y, Naito I, Kwon TH, Inoue S, Endo K, Kawasaki M, Uchida S, Nielsen S, Sasaki S, Marumo F. Cellular and subcellular immunolocalization of CLC-5 channel in mouse kidney: colocalization with H⁺-ATPase. *Am J Physiol* ; 277: F957-65,1999.
- Sala-Rabanal M, Kucheryavykh LY, Skatchkov SN, Eaton MJ, Nichois CG. Molecular mechanisms of EAST/SeSAME syndrome mutations in Kir4.1 –KCNJ10). *Journal of biological chemistry*; volume 285 n°46 p. 36040-36048, 2010 .

- Salkoff, L, Butler A, Ferreira G, Santi C, Wei A. High-conductance potassium channels of the SLO family. *Nat Rev Neurosci.* 7(12): p. 921-31, 2006.
- Scheel O., Zdebik A.A., Lourdel S., Jentsch T.J. Voltage-dependant electrogenic chloride/proton exchange by endosomal ClC proteins. *Nature*; 436(7049): 424-7,2005.
- Schlatter E. and Schafer J.A., Electrophysiological studies in principal cells of rat cortical collecting tubules. ADH increases the apical membrane Na⁺-conductance. *Pflugers Arch*, 409(1-2): p. 81-92, 1987.
- Scholl UI, Choi M, Liu T, Ramaekers VT, Hausler MG, Grimmer J, Tobe SW, Farhi A, Nelson-Williams C, Lifton RP, 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, 2009.
- Sepulveda, F.V., L. Pablo Cid, J. Teulon, and M.I. Niemeyer. Molecular Aspects of Structure, Gating, and Physiology of pH-Sensitive Background K2P and Kir K⁺-Transport Channels. *Physiol Rev.* 95:179-217, 2015.
- Sergouniotis PI, Davidson AE, Mackay DS, Li Z, Yang X, Plagnol V, Moore AT, Webster AR. Recessive mutations in KCNJ13, encoding an inwardly rectifying potassium channel subunit, cause leber congenital amaurosis. *Am J Hum Genet* 89: 183–190, 2011.
- Shuck, M.E, Piser TM, Bock JH, Slightom JL, Lee KS, Bienkowski MJ. 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(1): p. 586-93, 1997.
- Simon DB, Bindra RS, Mansfield TA, Nelson-Williams C, Mendonca E, Stone R, Schurman S, Nayir A, Alpay H, Bakkaloglu A, Rodriguez-Soriano J, Morales JM, Sanjad SA, Taylor CM, Pilz D, Brem A, Trachtman H, Griswold W, Richard GA, John E, Lifton RP. Mutations in the chloride channel gene, CLCNKB, cause Bartter's syndrome type III. *Nat Genet*; 17(2): 171-8,1997.
- Simon DB, Karet FE, Hamdan JM, DiPietro A, Sanjad SA, Lifton RP. Bartter's syndrome, hypokalaemic alkalosis with hypercalciuria, is caused by mutations in the Na-K-2Cl cotransporter NKCC2. *Nat Genet* ; 13(2): 183-8,1996.
- Steinmeyer K, Schwappach B, Bens M, Vandewalle A, Jentsch TJ. Cloning and functional expression of rat CLC-5, a chloride channel related to kidney disease. *J Biol Chem* ; 270(52): 31172-7,1995.
- Steinmeyer K., Klocke R., Ortland C., Gronemeier M., Jockysch H., Gründer S., Jentsch T.J., Inactivation of muscle chloride channel by transposon insertion in myotonic mice. *Nature*; 354(6351): 304-8,1991.
- Stobrawa SM, Breiderhoff T, Takamori S, Engel D, Schweizer M, Zdebik AA, Bösl MR, Ruether K, Jahn H, Draguhn A, Jahn R, Jentsch TJ. Disruption of ClC-3, a chloride channel expressed on synaptic vesicles, leads to a loss of the hippocampus. *Neuron* ; 29(1): 185-96,2001.

- Stöling G, Fischer M and Fahlke C, ClC channel function and dysfunction in health and disease. *Frontiers in Physiology*; Volume 5, article 378, 2014.
- Subramanya AR, Ellison DH. Distal Convolutd Tubule. *Clin J Am Soc Nephrol*, 9(12):2147-63, 2014.
- Sugimoto, T, Tanabe Y, Shigemoto R, Iwai M, Takumi T, Ohkubo H, Nakanishi S. 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(1): p. 39-47, 1990.
- Suzuki Y, Yasuoka Y, Shimohama T, Nishikitani M, Nakamura N, Hirose S, Kawahara K, Expression of the K⁺ channel Kir7.1 in the developing rat kidney : role in K⁺ excretion. *Kidney Int*; 63(3) : 969-75, 2003 .
- Tabcharani J.A, Low W, Elie D, Hanrahan JW. Low-conductance chloride channel activated by cAMP in the epithelial cell line T84. *FEBS Lett*, 270(1-2): 157-64, 1990.
- Takahashi Y, Fujii T, Fujita K, Shimizu T, Higuchi T, Tabuchi Y, Sakamoto H, Naito I, Manabe K, Uchida S, Sasaki S, Ikari A, Tsukada K, Sakai H. Functional coupling of chloride-proton exchanger ClC-5 to gastric H⁺,K⁺-ATPase. *Biol Open*. 3(1):12-21. 2014.
- Takeuchi Y, Uchida S, Marumo F and Sasaki S, Cloning; tissue distribution, and intrarenal localization of ClC chloride channels in human kidney. *Kidney Int*; 48:1497-503,1995.
- Takumi, T, Ishii T, Horio Y, Morishige K, Takahashi N, Yamada M, Yamashita T, Kiyama H, Sohmiya K, Nakanishi S, Kurachi Y. A novel ATP-dependent inward rectifier potassium channel expressed predominantly in glial cells. *J Biol Chem*. 270(27): p. 16339-46, 1995.
- Tanaka M, Schmidlin O, Yi SL, Bollen AW, Morris RC Jr. Genetically determined chloride-sensitive hypertension and stroke. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(26): 14748-52, 1997.
- Tanemoto M, Kittaka N, Inanobe A, Kurachi Y. In vivo formation of a proton-sensitive K⁺ channel bu heteromeric subunit assembly of Kir5.1 with Kir4.1. *Journal f physiology* ; 525-3. Pp.587-592, 2000.
- Tanemoto, M, Fujita A, Higashi K, Kurachi Y. PSD-95 mediates formation of a functional homomeric Kir5.1 channel in the brain. *Neuron*. 34(3): p. 387-97, 2002.
- Tanemoto, M, Vanoye CG, Dong K, Welch R, Abe T, Hebert SC, Xu, JZ. Rat homolog of sulfonylurea receptor 2B determines glibenclamide sensitivity of ROMK2 in *Xenopus laevis* oocyte. *Am J Physiol Renal Physiol*. 278(4): p. F659-66, 2000.
- Tang CY, Chen TY. Physiology and Pathophysiology of CLC-1: Mechanisms of a chloride channel disease, myotonia. *J Biomed Biotechnol*. 2011:685328. 2011.

- Teulon J, Lourdel S, Nissant A, Paulais M, Guinamard R, Marvao P and Imbert-Teboul M, Exploration of the basolateral chloride channels in the renal tubule using the patch-clamp technique. *Nephron Physiol*; 99: p64-68,2005.
- Theilig F, Goranoca I, Hirsch JR, Wieske M, Ünsal S, Bachmann S, Veh RW and Derst C, 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, 2008 .
- Thiemann A., Gründer S., Pusch M., Jentsch T.J. A chloride channel widely expressed in epithelial and non-epithelial cells. *Nature*; 356(6364): 57-60, 1992.
- Todd-Turla K.M, Rusvai E, Naray-Toth A, Fejes-Toth G. CFTR expression in cortical collecting duct cells. *Am J Physiol*, 270 (1 Pt 2): F237-44, 1996.
- Tseng PY, Yu WP, Liu HY, Zhang XD, Zou X, Chen TY. Binding of ATP to the CBS domains in the C-terminal region of ClC-1. *J Gen Physiol*. 137(4):357-68. 2011.
- Tseng-Crank, J, Foster CD, Krause JD, Mertz R, Godinot N, DiChiara TJ, Reinhart PH. Cloning, expression, and distribution of functionally distinct Ca(2+)-activated K⁺ channel isoforms from human brain. *Neuron*. 13(6): p.1315-30, 1994.
- Tucker, S.J, Bond CT, Herson P, Pessia M, Adelman JP. Inhibitory interactions between two inward rectifier K⁺ channel subunits mediated by the transmembrane domains. *J Biol Chem*. 271(10): p.5866-70, 1996.
- Uchida S, Sasaki S, Furukawa T, Hiraoka M, Imai T, Hirata Y and Marumo F, Molecular cloning of a chloride channel that is regulated by dehydration and expressed predominantly in kidney medulla. *J Biol Chem*; 268(6): 3821-4, 1993.
- Uchida S. In vivo role of ClC chloride channels in the kidney. *Am J Renal Physiol*; 279: F802-F808, 2000.
- Van Slegtenhorst MA, Bassi MT, Borsani G, Wapenaar MC, Ferrero GB, de Conciliis L, Rugarli EI, Grillo A, Franco B, Zoghbi HY, Ballabio A. A gene from the Xp22.3 region shares homology with voltage-gated chloride channels. *Hum Mol Genet* ; 3(4): 547-52, 1994.
- Vandewalle A, Cluzeaud F, Bens M, Kieferie S, Steinmeyer K, Jentsch TJ. Localization and induction by dehydration of ClC-K chloride channels in the rat kidney. *Am J Physiol*, 272(5 pt 2): F678-88, 1997.
- Vandewalle A, Cluzeaud F, Peng KC, Bens M, Lüchow A, Günther W, Jentsch TJ. Tissue distribution and subcellular localization of the ClC-5 chloride channel in rat intestinal cells. *Am J Physiol Cell Physiol* ; 280(2): C373-81, 2001.
- Vinciguerra M., Deschênes G, Hasler U, Modasini D, Rousselot M, Doucet A, Vandewalle A, Martin PY, Féraille E. Intracellular Na⁺ controls cell surface expression of Na,K-ATPase via a cAMP-independent PKA pathway in mammalian kidney collecting duct cells. *Mol Biol Cell*. 14(7): p.2677-88, 2003.

- W. He, W, Liu, C.S. Chew, S.S. Baker, R.D. Baker, J.G. Forte, L. Zhu . Acid secretion-associated translocation of KCNJ15 in gastric parietal cells. *Am. J. Gastrointest Liver Physiol*; 301 G591-G600, 2001.
- Waldegger S, Jeck N, Barth P, Peters M, Vitzthum H, Wolf K, Kurtz A, Konrad M and Seyberth HW. Barttine increases surface expression and changes current properties of ClC-K channels. *Pflugers Arch*; 444(3): 411-8, 2002.
- Wang SS, Devuyst O, Courtoy PJ, Wang XT, Wang H, Wang Y, Thakker RV, Guggino S, Guggino WB. Mice lacking renal chloride channel, CLC-5, are a model for Dent's disease, a nephrolithiasis disorder associated with defective receptor-mediated endocytosis. *Hum Mol Genet* ; 9(20): 2937-45, 2000.
- Wang W. Regulation of renal K transport by dietary K intake. *Annu Rev Physiol*, 66:p. 547-69, 2004.
- Wang W., Renal potassium channels: recent developpements. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 13(5) : p. 549-55, 2004.
- Wang W.H., Regulation of ROMK (Kir 1.1) channels: new mechanisms and aspects. *Am J Renal Physiol*, 290(1): p. F14-9, 2006.
- Warth, R, Baarri re H, Meneton P, Bloch M, Thomas J, Tauc M, Heitmann D, Romeo E, Verrey F, Mengual R, Guy N, Bendahhou S, Lesage F, Poujeol P, Barhanin J. *Proximal renal tubular acidosis in TASK2 K⁺ channel-deficient mice reveals a mechanism for stabilizing bicarbonate transport.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(21): p. 8215-20.
- Wartosch L, Fuhrmann JC, Schweizer M, Stauber T, Jentsch TJ. Lysosomal degradation of endocytosed proteins depends on the chloride transport protein ClC-7. *FASEB J*. 23(12):4056-68. 2009.
- Weinreich F., Jentsch J.T., Pores formed by single subunits in mixed dimers of different ClC chloride channels. *J Biol Chem*; 276(4): 2347-53, 2001.
- Weinstein A.M., Modeling the proximal tubule: complications of the paracellular pathway. *Am J Physiol*, 254(3 Pt 2): p. F297-305, 1988.
- Weisinger J.R. and Bellorin-Font E. Magnesium and phosphorus. *The Lancet* ; Vol.352, 1998.
- Welling P.A. Regulation of renal potassium secretion: molecular mechanisms. *Seminar in Nephrology*, pp.215-228, 2013.
- Williams D.M, Lopes C MB, Rosenhouse-Dantsker A, Connelly HL, Matavel A, O-Uchi J, McBeath E, Gray DA. Molecular basis of decreased Kir4.1 function in SeSAME/EAST syndrome. *JASN* ; 2117-2129, 2010.
- Wingo CS, Cain BD. The renal H-K-ATPase : physiological significance and role in potassium homeostasis. *Annu. Rev. Physiol.*, 55: 323-347, 1993.

- Xiong D, Heyman NS, Airey J, Zhang M, Singer CA, Rawat S, Ye L, Evans R, Burkin DJ, Tian H, McCloskey DT, Valencik M, Britton FC, Duan D, Hume JR. Cardiac-specific, inducible *ClC-3* gene deletion eliminates native volume-sensitive chloride channels and produces myocardial hypertrophy in adult mice. *J Mol Cell Cardiol.* 48(1):211-9. 2010.
- Yao X, Tian S, Chan HY, Biemesderfer D, Desir GV. 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, 2002.
- Yoo D, Kim BY, Campo C, Nance L, King A, Maouyo D, Welling PA. 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, 2003.
- Younes-Ibrahim M, Barlet-Bas C, Buffin-Meyer B, Cheval L, Rajerison R, Doucet A.. Ouabain-sensitive and insensitive K-ATPase in rat nephron : effect of K depletion. *Am. J. Physiol.*, 268: F1141-F1147, 1995.
- Zaika OL, Mamenko M, Palygin O, Boukelmoune N, Staruschenko A, Pochynyuk O. Direct inhibition of basolateral Kir4.1/5.1 and Kir4.1 channels in the cortical collecting duct by dopamine. *Am J physiol Renal Physiol.* 305(9):F1277-87. 2013.
- Zdebik AA, Zifarelli G, Bergsdorf EY, Soliani P, Scheel O, Jentsch TJ, Pusch M. Determinants of anion-proton coupling in mammalian endosomal CLC proteins. *J. Biol. Chem.*, 283: 4219-4227, 2008.
- Zhang C, Wang L, Thomas S, Wang K, Lin DH, Rinehart J, Wang WH. Src family protein tyrosine kinase regulates the basolateral K channel in the distal convoluted tubule (DCT) by phosphorylation of *KCNJ10* protein. *J Biol Chem.* 228(36):26135-46. 2013.
- Zhang C, Wang L, Zhang J, Su XT, Lin DH, Scholl UI, Giebisch G, Lifton RP, Wang WH. *KCNJ10* determines the expression of the apical Na-Cl cotransporter (NCC) in the early distal convoluted tubule (DCT1). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 111: 11864-1198, 2014.
- Zhao Y, Wang H. Activation of SUR2B/Kir6.1-type K(ATP) channels protects glomerular endothelial mesangial and tubular epithelial cells against oleic acid renal damage. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi.* 28(6) :572-6. 2012.
- Zifarelli G, Murgia AR, Soliani P, Pusch M. Intracellular proton regulation of *ClC-0*. *J. Gen. Physiol.*, 132:185-198, 2008.

Résumé

Dans cette étude, nous avons cherché à caractériser les mécanismes de régulation du canal chlorure de 10pS de la membrane basolatérale des cellules intercalaires du CNT de souris. En parallèle, nous nous sommes intéressés au canal potassique Kir 4.2 dont le rôle, les propriétés *in situ* et la localisation précise au niveau du rein ne sont pas définis. Pour ce faire, nous avons mené des analyses par patch-clamp en canal unitaire et des analyses phénotypiques de souris sauvages et invalidées pour le canal Kir4.1 placées en cage à métabolisme.

Dans le canal connecteur, le laboratoire a préalablement mis à jour par patch-clamp en canal unitaire les propriétés électrophysiologiques d'un canal chlorure de 10 pS présent sur les membranes basolatérales des cellules intercalaires [Nissant et al., 2006]. Ce canal présente une sélectivité anionique et une sensibilité au Ca^{2+} et au H^+ externe proche de celle de CIC-K2, un membre de la famille des canaux et transporteurs de chlorure CIC. Si ce canal chlorure soutient très probablement la conductance chlorure basolatérale de ce segment de néphron, la régulation de son activité n'a pas encore été décrite. Nous avons recherché à l'aide des configurations « cellule-attachée » et « détachée face interne vers l'extérieur » de la technique du patch-clamp l'influence du voltage, du chlorure intracellulaire, du calcium externe et du pH extra- et intracellulaire sur l'activité de ces canaux. Nos données montrent que l'activité du canal est fortement dépendante du voltage mais est très peu sensible aux variations de chlorure intracellulaire. Par ailleurs, l'augmentation de la concentration en calcium extracellulaire entraîne une élévation de l'activité des canaux en augmentant leur nombre à la membrane plasmique sans modifier la probabilité d'ouverture. En revanche, une alcalinisation extracellulaire augmente le nombre de canaux à la membrane plasmique mais modifie également la dépendance au voltage rendant les canaux plus actifs pour des potentiels positifs. Une élévation du pH interne élève l'activité des canaux en augmentant leur nombre et élève également leur activité pour des potentiels négatifs. Ces données suggèrent que le calcium extracellulaire, le pH extra- et intracellulaire modulent l'activité des canaux *via* une action sur la porte commune plutôt que sur les protopores du CIC.

Le rôle des canaux potassiques basolatéraux du néphron distal ainsi que leur identité moléculaire commencent à être mieux connus. C'est le cas des canaux Kir4.1/Kir5.1, puisque des mutations pathogènes de Kir4.1 entraînent chez l'homme le syndrome de SeSAME/EAST qui entraîne notamment une perte rénale de sels, une alcalose métabolique, une hypokaliémie et une hypercalciurie. En revanche, le rôle des canaux basolatéraux du tubule contourné proximal (PCT) n'est pas encore bien déterminé. Des résultats préliminaires obtenus au laboratoire ont permis de déterminer la présence d'ARNm codant pour les sous-unités Kir4.2 et Kir5.1, deux membres de la famille des canaux Kir, au niveau du PCT. Nous avons donc caractérisé à l'aide de la technique du patch-clamp en canal unitaire les propriétés électrophysiologiques des canaux potassiques basolatéraux du PCT de souris afin de déterminer si un canal potassique présentant des propriétés similaires à celles des canaux Kir4.2/Kir5.1 est présent dans ce segment du néphron et auquel cas déterminer sa localisation précise et sa fonction. Ainsi, nous avons pu déterminer qu'au moins trois canaux potassiques sont présents à la membrane basolatérale du PCT. Le canal le plus fréquemment observé présente une conductance de 47 pS, une rectification entrante induite par le magnésium intracellulaire, une dépendance de son activité au pH intracellulaire, et un blocage par le baryum extracellulaire. Ces propriétés sont compatibles avec celles des canaux Kir4.2/Kir5.1. Nous avons par ailleurs démontré par western blot et par immunohistochimie que ces canaux sont exprimés sur la membrane basolatérale du PCT. L'étude de souris invalidées pour *Kcnj15* codant pour Kir4.2 a permis de mettre en évidence la présence de pertes urinaires accrues chez les KO pour le magnésium et le phosphate et une diminution

du pH urinaire et de l'excrétion protéique urinaire. Ce phénotype même léger, suggère ainsi une atteinte du tubule proximal.