

LITHIASÉ RÉNALE ET TUBULOPATHIE COMPLEXE : LE PARADIGME DE LA MALADIE DE DENT

par

F. JOURET*, P. J. COURTOY** et O. DEVUYST*

La maladie lithiasique rénale représente un problème de santé publique majeur. Elle affecte près de 12 p. 100 des hommes et 5 p. 100 des femmes arrivés à l'âge de 70 ans, et peut se compliquer de néphrocalcinose et d'insuffisance rénale terminale [1]. Bien que la lithiasé rénale soit une maladie familiale associée à une hypercalciurie dans plus de la moitié des cas [2], les bases moléculaires de la néphrolithiasé héréditaire sont longtemps restées méconnues. Récemment, des études génétiques ont permis de mieux connaître la physiopathologie des prédispositions à la lithiasé rénale, et partant, d'envisager de nouvelles approches thérapeutiques.

Trois maladies familiales caractérisées par une néphrolithiasé hypercalciurique liée au chromosome X – la néphrolithiasé récessive liée à l'X, le rachitisme hypophosphatémique récessif lié à l'X et la protéinurie de bas poids moléculaire (BPM) familiale idiopathique japonaise – ont été rassemblées sous le même vocable de « maladie de Dent » [3]. Cette maladie se caractérise par une dysfonction du tube proximal (TP), associant invariablement une protéinurie de BPM à une hypercalciurie. Les autres manifestations biologiques et cliniques de cette tubulopathie, à savoir amino-acidurie, glycosurie, hyperuricosurie, phosphaturie, néphrocalcinose, néphrolithiasé, hématurie et insuffisance rénale, se retrouvent de façon variable d'un patient à l'autre [4]. L'analyse de liaison, orientée par la sélection de gènes candidats situés sur le chromosome X, a permis d'identifier des mutations inactivatrices des gènes *CLCN5* (Xp11.22) et *OCRL1* (Xq26.1) chez les patients atteints de la maladie de Dent [3, 5]. Le produit du gène *CLCN5* est le canal ClC-5, un membre de la famille CLC des canaux chlorure voltage-dépendants [6], tandis que le gène *OCRL1* code l'enzyme phospho-inositide (4,5) bisphosphate (PIP₂)

* Service de Néphrologie ; **Unité CELL, Faculté de Médecine, Université catholique de Louvain, Bruxelles, Belgique.

5-phosphatase qui régule le niveau d'expression d'un lipide membranaire signalétique [7].

Dans la présente revue, nous résumons les principales études moléculaires ayant permis de mieux comprendre la physiopathologie de la maladie de Dent, en tant que paradigme des tubulopathies complexes. Ces études montrent, en particulier, le rôle crucial du canal chlorure CIC-5 dans le trafic vésiculaire au pôle apical des cellules épithéliales tubulaires rénales, affectant l'homéostasie des protéines, du calcium et des protons.

DISTRIBUTION DE CIC-5 ET PHÉNOTYPE TUBULAIRE COMPLEXE DE LA MALADIE DE DENT

Le gène *CLCN5* appartient à la famille CLC des canaux Cl^- voltage-dépendants dont neuf membres ont été identifiés chez les mammifères [8]. Ces transporteurs sont importants pour le contrôle de l'excitabilité membranaire, le transport trans-épithélial, et probablement la régulation du volume cellulaire. Le gène *CLCN5* est exprimé de façon prédominante dans le rein, mais aussi dans le foie, la prostate, les surrénales et la thyroïde [9, 10]. CIC-5, une protéine de 746 acides aminés comportant 18 segments trans-membranaires, induit un courant Cl^- rectificateur sortant lorsqu'il est exprimé dans un système d'expression hétérologue. Ce courant est fortement réduit, voire aboli, par les mutations causant la maladie de Dent qui entraînent une perte de fonction et/ou d'expression de la protéine CIC-5 à la membrane plasmique [3, 6, 11].

L'analyse par *immunoblotting* de reins humains identifie CIC-5 comme une large bande glycosylée de ≈ 80 kDa. En immunohistochimie, CIC-5 est détecté dans les cellules épithéliales du TP, de la branche ascendante épaisse de l'anse de Henlé et dans les cellules intercalaires (CI) du canal collecteur (CC) [12]. Le fractionnement sub-cellulaire analytique de rein humain montre que CIC-5 co-distribue avec la pompe à protons vacuolaire (V-ATPase), ainsi qu'avec un marqueur des endosomes précoces, Rab5a [13]. Les études expérimentales sur rein de souris confirment que CIC-5 co-distribue dans des vésicules apicales des cellules du TP avec des traceurs endocytaires, la β_2 -microglobuline ou la peroxydase de raifort [14, 15]. Dans les cellules dérivées du rein d'opossum (OK) ou de porc (LLC-PK1), deux modèles *in vitro* du TP, l'analyse en microscopie confocale confirme que CIC-5 est associé à des vésicules qui participent à l'endocytose [12, 16].

Ces travaux ont établi un premier lien entre la distribution de CIC-5 dans divers segments du néphron et le phénotype complexe de la maladie de Dent. D'une part, la perte fonctionnelle de CIC-5 dans les endosomes du TP pourrait altérer le trafic vésiculaire, et par là non seulement inhiber la réabsorption des protéines de BPM, mais aussi perturber le contingent de transporteurs apicaux et générer ainsi une dysfonction cellulaire généralisée [12, 14]. D'autre part, l'absence de CIC-5 dans la branche ascendante épaisse de l'anse de Henlé, site majeur de la réabsorption contrôlée du Ca^{++} et de la genèse du gradient cortico-papillaire, pourrait rendre compte de l'hypercalciurie et du déficit de pouvoir de concentration urinaire observés dans cette maladie [4]. Enfin, la dysfonction de CIC-5 dans les CI de type α expliquerait le déficit d'acidification urinaire retrouvé chez la moitié des patients [17].

CO-DISTRIBUTION DE CIC-5 ET DE LA V-ATPase DURANT LA NÉPHROGENÈSE ET DANS LE REIN MATURE

Les manifestations cliniques de la maladie de Dent apparaissent souvent durant l'enfance. Qui plus est, l'apparition d'une protéinurie de BPM dès les premiers mois de vie chez certains patients suggère que la distribution segmentaire rénale du CIC-5 est acquise à la naissance [18]. Ces observations nous ont incités à explorer l'ontogénie de CIC-5, sa maturation et sa co-distribution segmentaire avec les différentes sous-unités de la V-ATPase durant la néphrogenèse murine et humaine [19]. Chez la souris, l'expression de CIC-5 se caractérise par une induction rapide à un stade précoce de la néphrogenèse, suivie par une maturation progressive durant la néphrogenèse tardive. La co-distribution de CIC-5 et des sous-unités ubiquitaires de la V-ATPase dans les cellules tubulaires proximales est acquise dès le stade embryonnaire E15.5 [19]. Au contraire, les sous-unités de la V-ATPase spécifiques des CI apparaissent tardivement dans certaines cellules du CC, où elles co-localisent avec CIC-5 [20]. Chez l'homme, CIC-5 est détecté à partir du second trimestre, d'abord dans les cellules du TP, puis dans les CI [19]. Ces résultats confortent d'autres observations montrant que l'expression apicale des composants de la bordure en brosse, et plus particulièrement du système mégaline-cubiline, coïncide avec le début de la filtration glomérulaire [21]. La co-expression de CIC-5 et de la V-ATPase dans les cellules du TP dès le début de la filtration glomérulaire renforce le concept d'une maturation progressive de la fonction tubulaire rénale [22], et rend compte des variants phénotypiques précoces de la maladie de Dent.

Dans le rein humain mature, CIC-5 co-distribue avec la V-ATPase dans les cellules tubulaires proximales et intercalaires [12]. L'analyse histologique de huit biopsies rénales de patients atteints de la maladie de Dent, chez lesquels une mutation du gène *CLCN5* avait été documentée [13], a permis de mieux apprécier les conséquences de la perte fonctionnelle de CIC-5. Ces reins avaient une architecture rénale soit normale, soit anormale (glomérulosclérose, dédifférentiation tubulaire ou fibrose interstitielle modérée). Des dépôts calcifiés ont néanmoins été identifiés dans toutes les biopsies au niveau de la lumière de l'anse de Henlé. Malgré la dysfonction du TP, aucune anomalie ultrastructurale des cellules du TP ou de l'appareil endocyttaire n'a été mise en évidence. Cependant, l'examen immunohistochimique des cellules tubulaires proximales a révélé une localisation baso-latérale inattendue de la V-ATPase, contrastant avec sa polarisation apicale dans le rein normal. Cette inversion de polarité était spécifique, n'affectant ni la distribution apicale de l'aminopeptidase et de la mégaline, ni la restriction basolatérale de la Na^+/K^+ -ATPase. Dans les CI de type α , l'expression apicale de la V-ATPase était perdue. Ces modifications de polarité et/ou d'expression de la V-ATPase suggèrent l'existence d'interactions étroites entre cette dernière et le domaine C-terminal de CIC-5, qui pourraient être essentielles pour l'orientation correcte et la stabilité de cette pompe [13]. Ces données illustrent l'importance des interactions moléculaires impliquant le CIC-5 et proposent une explication physiopathologique du phénotype d'acidose tubulaire [17].

CARACTÉRISATION D'UN MODÈLE MURIN DE LA MALADIE DE DENT

L'étude d'un modèle murin invalidé (knock-out, KO) pour le gène *Cln5* par recombinaison homologue de l'exon 6 nous a permis de mieux comprendre le rôle du CIC-5 dans la physiopathologie de la maladie de Dent [23]. Les souris *Cln5* KO sont viables et ont une croissance et une survie normales. En revanche, ces animaux développent invariablement une tubulopathie sévère qui inclut protéinurie de BPM, amino-acidurie, glycosurie, phosphaturie, polyurie (fig. 1a et b). Ces souris présentent en outre une hypercalciurie et une néphrocalcinose, évoluant progressivement vers l'insuffisance rénale [24].

Les protéines de BPM (< 70 kDa) ultrafiltrées par le glomérule sont réabsorbées par le processus d'endocytose médiée par récepteurs au niveau des cellules tubulaires proximales, dans lesquelles CIC-5 est présent au niveau des endosomes précoces [12, 14]. Nous avons cherché à mieux comprendre ce processus en injectant les souris avec de la peroxydase de raifort, un traceur endocyttaire ultrafiltré et réabsorbé par le TP. L'analyse en cytochimie a montré un déficit sévère de l'endocytose apicale au niveau du TP des souris *Cln5* KO : la peroxydase liée à la bordure en brosse n'y était pratiquement pas transférée vers les vésicules endocytaires (fig. 1c et d) [23]. Ces données, qui ont été essentiellement confirmées dans un autre modèle murin [25], démontrent que l'invalidation du gène *Cln5* chez la souris entraîne une perturbation majeure de la fonction endocyttaire du TP, rendant compte de la protéinurie de BPM observée de façon constante chez les patients atteints de la maladie de Dent.

INVALIDATION DE CIC-5 ET DÉFICIT DU TRAFIC INTRACELLULAIRE DANS LE TUBE PROXIMAL

L'endocytose des protéines de BPM implique les récepteurs multiligands, mégaline et cubiline, qui sont abondamment exprimés dans la bordure en brosse du TP [21]. Ces récepteurs interagissent avec différents ligands spécifiques présents dans l'ultrafiltrat, et sont rassemblés et internalisés au niveau de régions spécialisées (*coated pits*) de la membrane apicale des cellules du TP. L'invalidation du gène codant pour la mégaline chez la souris [26], ainsi que la perte fonctionnelle de la cubiline chez des patients atteints de la maladie d'Imerslund-Grasbeck (mutations du gène *CUBN*) [27], sont toutes deux associées à une protéinurie de BPM sévère.

Après séquestration dans des *coated vesicles*, la progression des complexes récepteur/ligand le long de l'appareil endocyttaire dépend de l'acidification endosomale par la V-ATPase [28]. Dès lors, le déficit d'endocytose associé au dysfonctionnement de CIC-5 dans la maladie de Dent [3] et la souris *Cln5* KO [23, 25] a été attribué à un déficit d'acidification endosomale secondaire à la perte de la perméabilité au Cl⁻ (fig. 2). Cette hypothèse reste néanmoins controversée, d'autant que divers agents pharmacologiques inhibant l'acidification vacuolaire n'affectent pas le taux de capture endocyttaire, mais bouleversent le recyclage vésiculaire et arrêtent le transfert aux lysosomes [15]. Il est donc concevable qu'une perte de CIC-5 induise une altération plus spécifique de la voie endocyttaire, touchant sélec-

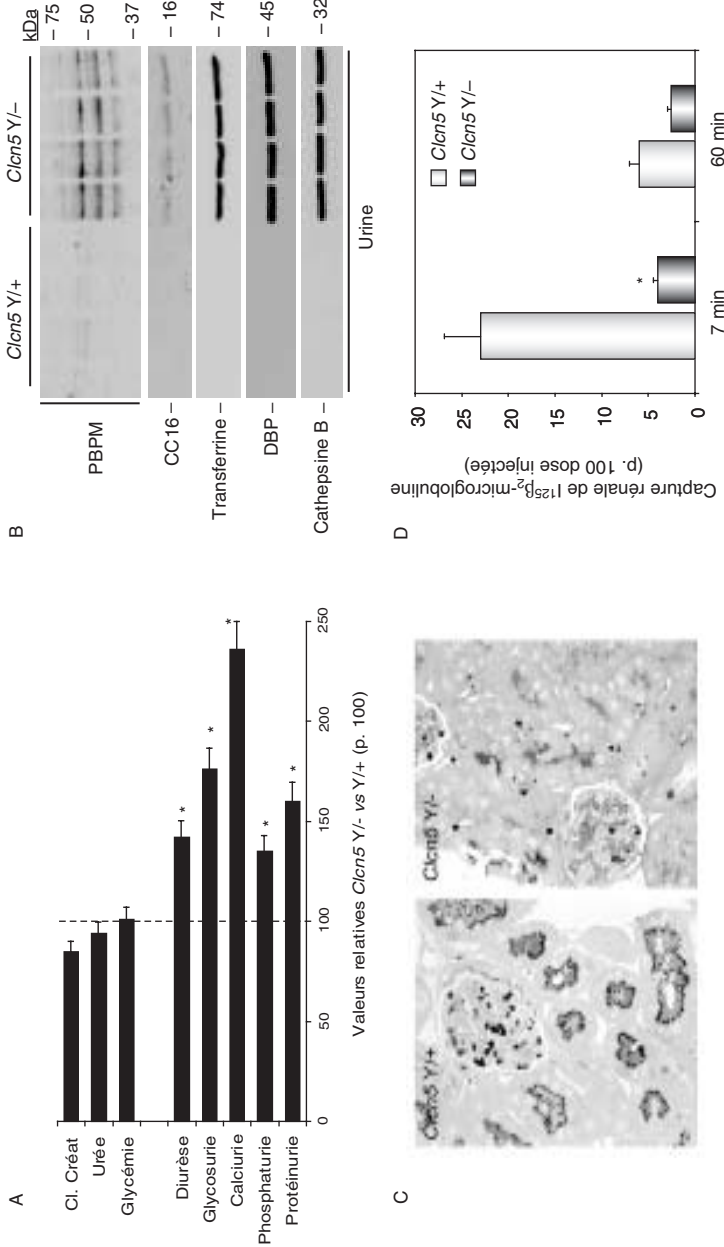


Fig. 1. — Phénotype des souris *Clcn5* KO.

A. Paramètres biologiques sanguins et urinaires. Par rapport aux contrôles, les souris *Clcn5*^{Y^{-/-}} sont polyuriques, et présentent une dysfonction tubulaire proximale sévère avec glycosurie, hyper-calciurie et -phosphaturie, et protéinurie (n = 50 ; *, p < 0,05). **B. Caractérisation de la protéinurie de BPM.** L'analyse par immunoblotting des urines de souris *Clcn5*^{Y^{+/+}} vs *Clcn5*^{Y^{-/-}} démontre, parmi les protéines de BPM, la présence de ligands de la cubiline (CC16 ; transferrine) et de la mégaline (protéine porteuse de la vitamine D, DBP), et d'enzymes lysosomiaux (cathépsine B) dans les échantillons des souris *Clcn5*^{Y^{-/-}}. **C-D. Investigation de l'endocytose apicale du TP : capture de peroxydase de raifort (C) et de β₂-microglobuline marquée à l'¹²⁵I (D).** À 5 minutes après injection intraveineuse, la détection cytochimique de la peroxydase (C) montre, dans les reins contrôles, de nombreuses vésicules endocytaires localisées sous la bordure en brosse du TP. Au contraire, la peroxydase est très mal captée par les cellules du TP des reins *Clcn5*^{Y^{-/-}}, où elle reste dans la lumière tubulaire. À 7 minutes après injection intraveineuse, la capture rénale de l'¹²⁵I β₂-microglobuline (D) est fortement réduite chez les animaux *Clcn5*^{Y^{-/-}} par rapport à leur contrôle (n = 4 ; *, p < 0,001). À 60 minutes après l'injection, on note en outre un ralentissement de la dégradation de la β₂-microglobuline captée dans les reins *Clcn5*^{Y^{-/-}}. D'après [15] et [23].

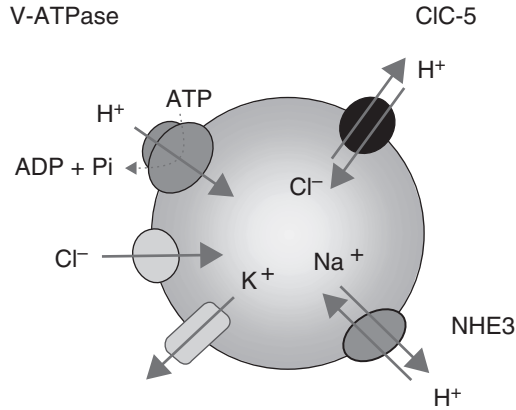


FIG. 2. — Partenaires de l'acidification endosomale.

L'acidification endosomale est générée par la H^+ -ATPase vacuolaire (ou V-ATPase), une pompe qui assure le transport actif de protons du cytosol vers l'endosome, couplé à la consommation d'ATP. La charge électrique positive est neutralisée, soit par une fuite de cations (H^+ , K^+), soit par un transfert parallèle de Cl^- via le canal chlorure CIC-5, et possiblement d'autres canaux anioniques. Deux groupes ont récemment démontré que, dans certaines conditions expérimentales, CIC-5 permet un échange H^+/Cl^- [36, 37]. Par ailleurs, l'échangeur Na^+/H^+ , NHE3, participe à l'acidification endosomale. (D'après Marshansky V, Ansiello DA, Brown D. Physiological importance of endosomal acidification : potential role in proximal tubulopathies. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2002 ; 11 : 527-537.)

tivement les récepteurs mégaline et cubiline. En effet, l'étude détaillée des souris *Clcn5* KO a mis en évidence une diminution significative du contenu rénal total en mégaline et cubiline, ainsi que leur disparition sélective de la bordure en brosse des cellules du TP (fig. 3a). Ce déficit explique la perte urinaire importante des ligands de ces récepteurs, incluant des enzymes lysosomiaux (voir fig. 1b). En outre, le *processing* des protéines « endocytées » apparaît ralenti dans les reins des souris *Clcn5* KO (voir fig. 1d). L'ensemble de ces observations permet de conclure que la perte fonctionnelle de CIC-5 provoque une perte sélective de la mégaline et de la cubiline à la bordure en brosse des cellules du TP, reflétant une anomalie généralisée du trafic intracellulaire dans ces cellules [15] (fig. 3b).

DÉFICIT DE L'ENDOCYTOSE APICALE ET HYPERCALCIURIE

Parmi les protéines de BPM filtrées par le glomérule et réabsorbées par endocytose au niveau du TP, l'on retrouve des complexes protéines porteuses/vitamines, tels que la DBP/vitamine D, RBP/rétinol, transcobalamine/vitamine B12 [29]. Après internalisation via le système mégaline/cubiline, ces complexes sont métabolisés le long de la voie endocyttaire, avec dégradation des protéines porteuses et stockage, sécrétion ou activation des vitamines. La perte fonctionnelle de CIC-5

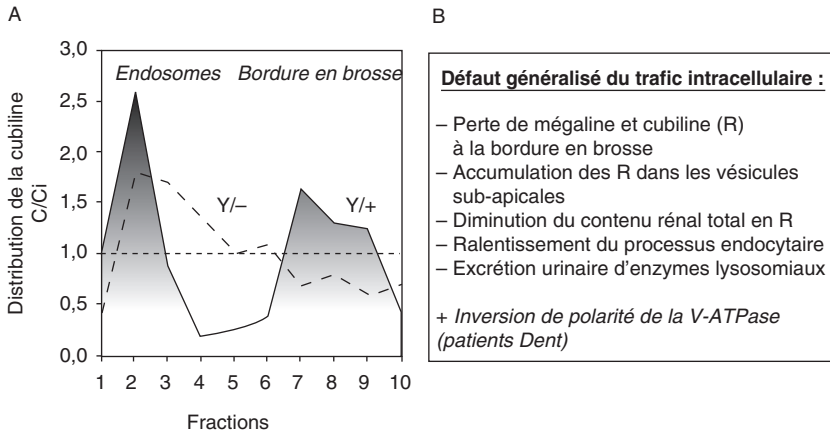


FIG. 3. — Invalidation de CIC-5 et dysfonction tubulaire proximale généralisée.

A. Distribution de la cubiline dans les reins de souris *Clcn5* Y/- vs Y/+ (fractionnement sub-cellulaire analytique). Dans les reins contrôles, la cubiline se retrouve dans les fractions endosomales (fractions # 1-3) et dans la bordure en brosse (fractions # 7-9). L'invalidation de CIC-5 entraîne une re-distribution de la cubiline vers les endosomes, avec perte d'expression à la bordure en brosse. B. Résumé du déficit de trafic intracellulaire dans le TP observé chez la souris *Clcn5* KO. D'après [13] et [15].

entraîne une excrétion urinaire accrue de complexes transporteur/vitamine, particulièrement pour la 25 (OH)D₃, ou pro-vitamine D (voir fig. 1b). De manière paradoxale, les patients atteints de maladie de Dent [17], ainsi que les souris invalidées pour *Clcn5* [30], présentent une concentration plasmatique augmentée en 1,25 (OH)₂ vitamine D₃. L'explication de ce paradoxe est complexe et fait intervenir la parathormone (PTH). Celle-ci est librement filtrée par le glomérule, et rapidement dégradée par endocytose médiée par la mégaline dans le TP [31]. Le déficit endocyttaire dû à l'inactivation de CIC-5 maintient une concentration élevée en PTH au pôle apical des cellules du TP où elle stimule son récepteur. Cette stimulation induit la transcription accrue de la 1 α -hydroxylase mitochondriale, qui active la 25 (OH)D₃ en 1,25 (OH)₂D₃ [6]. La balance entre la perte urinaire du substrat 25 (OH)D₃ et l'induction de la 1 α -hydroxylase mitochondriale, entraîne une production variable de la forme active 1,25 (OH)₂ vitamine D₃. Ceci explique sans doute la différence de sévérité de l'hypercalciurie observée chez les patients [4], ainsi qu'entre les modèles murins de maladie de Dent [23, 25]. À noter enfin, que l'hypercalciurie observée chez les souris *Clcn5* KO apparaît être principalement d'origine osseuse et rénale, et non intestinale, impliquant éventuellement la branche épaisse de l'anse de Henlé [30].

Ces observations démontrent l'existence d'un déficit sévère de l'homéostasie du Ca⁺⁺ chez les patients atteints de la maladie de Dent, pouvant rendre compte de l'hypercalciurie et de leur prédisposition à la lithiase rénale. Des travaux récents proposent des pistes pour y remédier. Ainsi, chez la souris, un traitement préventif à base de citrate permet de ralentir la progression de l'insuffisance rénale [24]. Chez les patients atteints de la maladie de Dent, la réponse hypocalciurique aux thiazides est par ailleurs préservée [32].

RELATION STRUCTURE-FONCTION

L'analyse biophysique de CIC-0, le premier isoforme de la famille CLC, avait conduit à proposer un modèle en « double tonneau », dans lequel deux protéines identiques, possédant chacune un pore, s'associent dans la membrane [33]. L'analyse cristallographique aux rayons X de deux homologues CLC bactériens a confirmé que les protéines CLC s'associent sous forme d'homodimères avec une configuration en « double tonneau » [34]. Chaque sous-unité possède son propre pore et 18 hélices α enchâssées dans la membrane plasmique selon une orientation anti-parallèle qui rapproche les résidus responsables de la sélectivité du pore [8]. À partir de ce modèle, l'analyse de la distribution de 15 mutations faux sens a montré qu'aucune de celles-ci ne concernait la sélectivité du pore, mais que la majorité des mutations (12/15) intéressait des résidus situés à l'interface de l'homodimère [35]. À l'avenir, l'évaluation des conséquences fonctionnelles d'autres mutations pathogènes permettra sans doute de mieux définir le rôle de certains domaines de CIC-5, tels les motifs C-terminaux d'internalisation, d'ubiquitinylation et de contrôle allostérique, sur sa fonction ou son trafic intracellulaire [11].

Par ailleurs, deux groupes indépendants ont récemment rapporté que les isoformes CIC-5 et CIC-4 fonctionnaient comme des échangeurs H^+/Cl^- voltage-dépendants [36, 37]. De tels échangeurs pourraient contribuer à faciliter l'acidification vésiculaire, en couplant les gradients de Cl^- au gradient de pH. Néanmoins, ces travaux relancent la discussion quant au rôle de CIC-5 dans la conductance anionique nécessaire à l'acidification endosomale par la V-ATPase (voir fig. 2). Une étude préliminaire du groupe de T.J. Jentsch a montré, in vitro, un déficit d'acidification des vésicules endocytaires isolées de souris *Clcn5* KO [38]. Cependant, ces vésicules n'avaient pas été clairement identifiées comme endosomes précoces, d'autant que le dérèglement du trafic intracellulaire pourrait perturber leur isolement, et contaminer la préparation d'organelles non endocytaires. Le groupe de A. Verkman a rapporté un déficit modéré d'acidification, limité aux endosomes précoces, dans des cultures primaires de cellules tubulaires proximales isolées de souris *Clcn5* KO [39]. Ces auteurs postulent néanmoins l'existence de canaux Cl^- autres que CIC-5 dans la membrane endosomale, ainsi que des acteurs cellulaires propres à la cellule du TP, pour expliquer le mécanisme de l'acidification endosomale. Enfin, dans une approche in vivo couplée au fractionnement sub-cellulaire permettant d'isoler formellement la fraction endosomale rénale précoce, nous n'avons pas retrouvé de différence d'acidification entre les souris *Clcn5* KO et contrôles [40]. Le rôle précis de CIC-5 dans la fonction endosomale reste donc largement débattu.

HÉTÉROGÉNÉITÉ GÉNÉTIQUE DE LA MALADIE DE DENT

À ce jour, près de 75 mutations du gène *CLCN5* (Xp11.22) ont été rapportées dans plus de 100 familles atteintes de la maladie de Dent [11, 41]. Ces mutations sont de différents types : faux sens, non sens, décalage du cadre de lecture ou modification de l'épissage alternatif du messenger *CLCN5*, insertion ou microdélétion de nucléotides (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/hgmd0.html>). Les conséquences fonc-

tionnelles de ces mutations sur l'activité du canal CIC-5 sont diverses : modification de la cinétique du courant Cl^- , perte de sélectivité ionique, perturbation de l'homodimérisation, ou déficit de trafic intracellulaire [3, 11, 35]. Des travaux récents ont démontré que la structure correcte de CIC-5, ainsi que son orientation membranaire, est non seulement nécessaire à la fonction de CIC-5 mais aussi à sa sortie du Golgi [11]. L'étude de mutations impliquant les extrémités N- et C-terminales de CIC-5 a mis en évidence l'importance de séquences-motifs, telles que les domaines CBS et PY-like, pour le trafic intracellulaire correct des canaux CIC [42]. À l'heure actuelle, il est difficile d'établir une relation génotype-phénotype claire dans la maladie de Dent, d'autant plus que certaines mutations de *CLCN5* entraînent, au sein de la même famille, un phénotype de sévérité variable [4]. Il serait dès lors utile de classer les mutations pathogènes de *CLCN5* selon leur effet sur l'expression, la maturation et la distribution de CIC-5, à l'instar des classifications proposées dans d'autres maladies comme la mucoviscidose [43] ou le syndrome de Gitelman [44].

Par ailleurs, le groupe de S. Scheinman a récemment rapporté une large série de 32 familles répondant aux critères stricts de la maladie de Dent, dans laquelle 13 patients étaient exempts de mutation du gène *CLCN5* [41]. Parmi ces 13 familles, l'analyse de liaison autour des loci Xq25 – Xq27, orientée vers certains gènes candidats (*CLCN4*, *SLC9A6*, *OCRL1*), a permis d'identifier 5 mutations du gène *OCRL1* [5]. Ce gène, localisé au niveau du chromosome Xq26.1, code l'enzyme PIP_2 5-phosphatase, déficient dans le syndrome oculo-cérébro-rénal de Lowe (OCRL) [7]. Par son activité d'hydrolyse enzymatique du $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ en $\text{PI}(4)\text{P}$, la protéine OCRL1 contrôle la concentration relative de ces 2 phospho-inositides signalétiques, et participerait ainsi à la régulation du trafic membranaire réciproque entre les endosomes précoces et l'appareil de Golgi *trans* [45]. D'autres 5-phosphatases, telles que la synaptojanine de type 1 dans les neurones, contrôlent en effet les stades précoces de la formation des vésicules endocytaires [46]. En outre, OCRL1 interviendrait dans la régulation dynamique du cytosquelette d'actine [7]. Le syndrome OCRL, causé par mutation du gène *OCRL1*, se caractérise par l'association d'une tubulopathie proximale de type Fanconi, d'une cataracte bilatérale congénitale et d'un retard mental sévère. Les mutations pathogènes du gène *OCRL1* entraînent une perte de l'activité 5-phosphatase et/ou une instabilité accrue de la protéine (<http://research.nhgri.nih.gov/lowe/>). De façon intéressante, les mutations inactivatrices d'*OCRL1* décrites chez les patients atteints de la maladie de Dent, n'avaient jamais été associées au syndrome OCRL [5]. Pas plus que les autres patients atteints de la maladie de Dent, les cinq patients porteurs d'une mutation du gène *OCRL1* ne présentaient atteinte oculaire ou déficit mental. Le rôle potentiel de la PIP_2 5-phosphatase dans la physiopathologie du déficit endocyttaire du TP, retrouvé et dans la maladie de Dent et dans le syndrome OCRL, reste à élucider.

In fine, l'absence de mutation dans les gènes *CLCN5* et *OCRL1* chez les huit patients restants de la série décrite *supra* suggère qu'au moins un 3^e gène est impliqué dans la maladie de Dent [5]. Ce gène coderait a priori pour un partenaire direct ou indirect de CIC-5. Par exemple, une relation fonctionnelle entre le domaine C-terminal de CIC-5 avec la cofiline, une protéine impliquée dans la dépolymérisation de l'actine au voisinage direct des endosomes, a été documentée *in vitro* [47]. Cette interaction pourrait être déterminante dans la capture de l'albumine par les cellules tubulaires proximales.

DÉVELOPPEMENTS RÉCENTS

À côté de son rôle crucial dans l'endocytose médiée par récepteurs de la cellule du TP, CIC-5 a été récemment impliqué dans l'adaptation cellulaire à l'hypertonicité au niveau de la branche ascendante épaisse de l'anse de Henlé, ainsi que dans le fonctionnement de la glande thyroïdienne. Les cellules de la branche épaisse de l'anse de Henlé participent à l'homéostasie du Ca^{++} et à la balance hydro-sodée. Des études récentes, tant *in vivo* qu'*in vitro*, ont démontré que l'hypertonicité de la médulla induit une augmentation d'expression de CIC-5, aux niveaux transcriptionnel et protéique [48]. Ces données suggèrent que CIC-5 intervient dans l'adaptation cellulaire à un environnement hypertonique en préservant une activité endocyttaire et un trafic cellulaire corrects.

D'autre part, le canal CIC-5 a été localisé au pôle apical des cellules épithéliales bordant certains follicules thyroïdiens [10]. Les souris invalidées pour le gène *Cln5*, bien qu'euthyroïdiennes, développent un goitre caractérisé par une accumulation de thyroglobuline et d'iodure. Ce phénotype s'expliquerait par un ralentissement de l'efflux apical d'iodure dû à une diminution d'expression de l'échangeur d'anions I^-/Cl^- , pendrine [10].

Enfin, la perte fonctionnelle de CIC-5 entraîne des conséquences cellulaires et métaboliques plus générales au niveau de la cellule du TP chez les souris *Cln5* KO et les patients atteints de maladie de Dent [49]. En effet, l'inactivation de CIC-5 provoque une accélération de la prolifération cellulaire et une augmentation du stress oxydatif dans le TP. Ces modifications sont associées à une surexpression tubulaire de l'anhydrase carbonique de type III (ACIII), une isoforme jusque-là inconnue dans le rein. Ces résultats ont été confirmés dans une biopsie rénale d'un patient atteint de la maladie de Dent, ainsi que dans un autre modèle de dysfonction tubulaire (souris invalidée pour le gène de la mégaline). Étant donné que l'ACIII est considérée comme un agent protecteur contre le stress oxydatif dans d'autres organes [50], nous avons exposé des cellules OK à des concentrations croissantes d' H_2O_2 , et montré que l'expression de l'ACIII est significativement augmentée dans les cellules traitées par rapport aux contrôles. Les caractéristiques biochimiques et structurales de l'ACIII, ainsi que sa régulation dans différents modèles de dysfonction tubulaire proximale, suggèrent que l'ACIII pourrait protéger les cellules du TP en souffrance contre le stress oxydatif.

CONCLUSION

La maladie de Dent apparaît bien aujourd'hui comme le paradigme d'une tubulopathie héréditaire complexe associant syndrome de Fanconi rénal et hypercalciurie. La caractérisation de la distribution segmentaire et sub-cellulaire de CIC-5 le long du néphron, ainsi que l'étude systématique d'un modèle murin invalidé pour le gène *Cln5*, a permis de proposer de multiples rôles de ce transporteur dans le fonctionnement rénal [6, 51]. Bien plus, ces investigations ont fourni de nouvelles informations sur l'endocytose apicale du TP, sur le traitement tubulaire des protéines de BPM et du Ca^{++} , et sur les relations structure-fonction de cette classe de transporteurs. Enfin, elles ont révélé que la maladie de Dent pouvait

résulter d'une mutation inactivatrice d'un autre gène, codant pour une enzyme contrôlant le niveau d'un régulateur du trafic membranaire, la PI(4,5)P₂ 5-phosphatase. On peut espérer que ces nouvelles données permettront de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques spécifiques à la maladie de Dent, aux syndromes de Fanconi, et à la maladie lithiasique.

Remerciements

Les auteurs remercient R. Beauwens, A. Blanchard, E.I. Christensen, S. Guggino, W.B. Guggino, T. Igarashi, T.J. Jentsch, P. Moulin, Y. Pirson, S.J. Scheinman, R.V. Thakker, M.-F. van den Hove et A.A. Zdebik pour leur soutien et leurs commentaires judicieux.

Ces travaux ont été soutenus par la Fondation Alphonse et Jean Forton, Amgen, le Fonds National de la Recherche Scientifique, les Actions de Recherche concertées, les Pôles d'Attraction interuniversitaire et le programme EuReGene (FP6).

BIBLIOGRAPHIE

1. COE FL, EVAN A, WORCESTER E. Kidney stone disease. *J Clin Invest*, 2005 ; **115** : 2598-2608.
2. MOE OW, BONNY O. Genetic hypercalciuria. *J Am Soc Nephrol*, 2005 ; **16** : 729-745.
3. LLOYD SE, PEARCE SH, FISHER SE et al. A common molecular basis for three inherited kidney stone diseases. *Nature*, 1996 ; **379** : 445-449.
4. SCHEINMAN SJ. X-linked hypercalciuric nephrolithiasis : clinical syndromes and chloride channel mutations. *Kidney Int*, 1998 ; **53** : 3-17.
5. HOOPES RR Jr, SHRIMPTON AE, KNOHL SJ et al. Dent Disease with mutations in OCRL1. *Am J Hum Genet*, 2005 ; **76** : 260-267.
6. JENTSCH TJ, MARITZEN T, ZDEBIK AA. Chloride channel diseases resulting from impaired transepithelial transport or vesicular function. *J Clin Invest*, 2005 ; **115** : 2039-2046.
7. LOWE M. Structure and function of the Lowe syndrome protein OCRL1. *Traffic*, 2005 ; **6** : 711-719.
8. JENTSCH TJ, STEIN V, WEINREICH F et al. Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol Rev*, 2002 ; **82** : 503-568.
9. FISHER SE, VAN BAKEL I, LLOYD SE et al. Cloning and characterization of CLCN5, the human kidney chloride channel gene implicated in Dent disease (an X-linked hereditary nephrolithiasis). *Genomics*, 1995 ; **29** : 598-606.
10. VAN DEN HOVE M-F, CROIZET-BERGER K, JOURET F et al. The loss of the chloride channel, CIC-5, delays apical iodide efflux and induces an euthyroid goiter in the mouse thyroid gland. *Endocrinology*, 2006 ; **147** : 1287-1296.
11. LUDWIG M, DOROSZEWICZ J, SEYBERTH HW et al. Functional evaluation of Dent's disease-causing mutations : implications for CIC-5 channel trafficking and internalization. *Hum Genet*, 2005 ; **117** : 228-237.
12. DEVUYST O, CHRISTIE PT, COURTOY PJ et al. Intra-renal and subcellular distribution of the human chloride channel, CLC-5, reveals a pathophysiological basis for Dent's disease. *Hum Mol Genet*, 1999 ; **8** : 247-257.
13. MOULIN P, IGARASHI T, VAN DER SMISSEN P et al. Altered polarity and expression of H⁺-ATPase without ultrastructural changes in kidneys of Dent's disease patients. *Kidney Int*, 2003 ; **63** : 1285-1295.
14. GUNTHER W, LUCHOW A, CLUZEAUD F et al. CIC-5, the chloride channel mutated in Dent's disease, colocalizes with the proton pump in endocytotically active kidney cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998 ; **95** : 8075-8080.

15. CHRISTENSEN EI, DEUYST O, DOM G et al. Loss of chloride channel CIC-5 impairs endocytosis by defective trafficking of megalin and cubilin in kidney proximal tubules. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003 ; **100** : 8472-8477.
16. DOWLAND LK, LUYCKX VA, ENCK AH et al. Molecular cloning and characterization of an intracellular chloride channel in the proximal tubule cell line, LLC-PK1. *J Biol Chem*, 2000 ; **275** : 37765-37773.
17. WRONG OM, NORDEN AG, Feest TG. Dent's disease ; a familial proximal renal tubular syndrome with low-molecular-weight proteinuria, hypercalciuria, nephrocalcinosis, metabolic bone disease, progressive renal failure and a marked male predominance. *QJM*, 1994 ; **87** : 473-493.
18. NAKAZATO H, HATTORI S, FURUSE A et al. Mutations in the CLCN5 gene in Japanese patients with familial idiopathic low-molecular-weight proteinuria. *Kidney Int*, 1997 ; **52** : 895-900.
19. JOURET F, IGARASHI T, GOFFLOT F et al. Comparative ontogeny, processing, and segmental distribution of the renal chloride channel, CIC-5. *Kidney Int*, 2004 ; **65** : 198-208.
20. JOURET F, AUZANNEAU C, DEBAIX H et al. Ubiquitous and kidney-specific subunits of vacuolar H⁺-ATPase are differentially expressed during nephrogenesis. *J Am Soc Nephrol*, 2005 ; **16** : 3235-3246.
21. CHRISTENSEN EI, VERRONST PJ. Megalin and cubilin, role in proximal tubule function and during development. *Pediatr Nephrol*, 2002 ; **17** : 993-999.
22. STUART RO, BUSH KT, NIGAM SK. Changes in global gene expression patterns during development and maturation of the rat kidney. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001 ; **98** : 5649-5654.
23. WANG SS, DEUYST O, COURTOY PJ et al. Mice lacking renal chloride channel, CLC-5, are a model for Dent's disease, a nephrolithiasis disorder associated with defective receptor-mediated endocytosis. *Hum Mol Genet*, 2000 ; **9** : 2937-2945.
24. CEBOTARU V, KAUL S, DEUYST O et al. High citrate diet delays progression of renal insufficiency in the CIC-5 knockout mouse model of Dent's disease. *Kidney Int*, 2005 ; **68** : 642-652.
25. PIWON N, GUNTHER W, SCHWAKE M et al. CIC-5 Cl⁻-channel disruption impairs endocytosis in a mouse model for Dent's disease. *Nature*, 2000 ; **408** : 369-373.
26. LEHESTE JR, MELSEN F, WELLNER M et al. Hypocalcemia and osteopathy in mice with kidney-specific megalin gene defect. *FASEB J*, 2003 ; **17** : 247-249.
27. AMINOFF M, CARTER JE, CHADWICK RB et al. Mutations in CUBN, encoding the intrinsic factor-vitamin B12 receptor, cubilin, cause hereditary megaloblastic anaemia. *Nat Genet*, 1999 ; **21** : 309-313.
28. MARSHANSKY V, AUSIELLO DA, BROWN D. Physiological importance of endosomal acidification : potential role in proximal tubulopathies. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2002 ; **11** : 527-537.
29. CUTILLAS PR, CHALKLEY RJ, HANSEN KC et al. The urinary proteome in Fanconi syndrome implies specificity in the reabsorption of proteins by renal proximal tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2004 ; **287** : F353-F364.
30. SILVA IV, CEBOTARU V, WANG H et al. The CIC-5 knockout mouse model of Dent's disease has renal hypercalciuria and increased bone turnover. *J Bone Miner Res*, 2003 ; **18** : 615-623.
31. HILPERT J, NYKJAER A, JACOBSEN C et al. Megalin antagonizes activation of the parathyroid hormone receptor. *J Biol Chem*, 1999 ; **274** : 5620-5625.
32. RAJA KA, SCHURMAN S, D'MELLO RG et al. Responsiveness of hypercalciuria to thiazide in Dent's disease. *J Am Soc Nephrol*, 2003 ; **13** : 2938-2944.
33. MILLER C. Open-state substructure of single chloride channels from Torpedo electroplax. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1982 ; **299** : 401-411.
34. DUTZLER R, CAMPBELL EB, CADENE M et al. X-ray structure of a CIC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity. *Nature*, 2002 ; **415** : 287-294.
35. WU F, ROCHE P, CHRISTIE PT et al. Modeling study of human renal chloride channel (hCLC-5) mutations suggests a structural-functional relationship. *Kidney Int*, 2003 ; **63** : 1426-1432.
36. PICOLLO A, PUSCH M. Chloride/proton antiporter activity of mammalian CLC proteins CIC-4 and CIC-5. *Nature*, 2005 ; **436** : 420-423.
37. SCHEEL O, ZDEBIK AA, LOURDEL S et al. Voltage-dependent electrogenic chloride/proton exchange by endosomal CLC proteins. *Nature*, 2005 ; **436** : 424-427.
38. GUNTHER W, PIWON N, JENTSCH TJ. The CIC-5 chloride channel knock-out mouse – an animal model for Dent's disease. *Pflugers Arch*, 2003 ; **445** : 456-462.

39. HARA-CHIKUMA M, WANG Y, GUGGINO SE et al. Impaired acidification in early endosomes of CIC-5 deficient proximal tubule. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005 ; **329** : 941-946.
40. AUZANNEAU C, FUCHS R, DOM G et al. The loss of CIC-5 does not impair acidification of apical endosomes in proximal tubule cells. *J Am Soc Nephrol*, 2005 ; **16** : 117A.
41. HOOPES RR Jr, RAJA KM, KOICH A et al. Evidence for genetic heterogeneity in Dent's disease. *Kidney Int*, 2004 ; **65** : 1615-1620.
42. SCHWAPPACH B, STOBRAWA S, HECHENBERGER M et al. Golgi localization and functionally important domains in the NH2 and COOH terminus of the yeast CLC putative chloride channel Gef1p. *J Biol Chem*, 1998 ; **273** : 15110-15118.
43. ROWE SM, MILLER S, SORSCHER EJ. Cystic Fibrosis. *N Engl J Med*, 2005 ; **352** : 1992-2001.
44. DE JONG JC, VAN DER VLIET WA, VAN DEN HEUVEL LP, et al. Functional expression of mutations in the human NaCl cotransporter : evidence for impaired routing mechanisms in Gitelman's syndrome. *J Am Soc Nephrol*, 2002 ; **13** : 1442-1448.
45. CHOUDHURY R, DIAO A, ZHANG F et al. Lowe syndrome protein OCRL1 interacts with clathrin and regulates protein trafficking between endosomes and the trans-Golgi network. *Mol Biol Cell*, 2005 ; **16** : 3467-3479.
46. CREMONA O, DI PAOLO G, WENK MR et al. Essential role of phosphoinositide metabolism in synaptic vesicle recycling. *Cell*, 1999 ; **99** : 179-88.
47. HRYCIW DH, WANG Y, DEVUYST O et al. Cofilin interacts with CIC-5 and regulates albumin uptake in proximal tubule cell lines. *J Biol Chem*, 2003 ; **278** : 40169-40176.
48. PHAM PC, DEVUYST O, PHAM PT et al. Hypertonicity increases CLC-5 expression in mouse medullary thick ascending limb cells. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2004 ; **287** : F747-F752.
49. JOURET F, GAILLY Ph, WILLNOW TE et al. Role of type III carbonic anhydrase in proximal tubule function : lessons from Dent's disease and *Cln5* knock-out mouse. *J Am Soc Nephrol*, 2005 ; **16** : 62A.
50. RAISANEN SR, LEHENKARI P, TASANEN M et al. Carbonic anhydrase III protects cells from hydrogen peroxide-induced apoptosis. *FASEB J*, 1999 ; **13** : 513-522.
51. DEVUYST O, GUGGINO WB. Chloride channels in the kidney : lessons learned from knockout animals. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2002 ; **283** : F1176-F1191.