

## Eau, canaux et maladies

*Les canaux ioniques commencent à être bien connus : réglant, avec les transporteurs, les échanges membranaires entre compartiments différents, notamment entre milieu intra- et extracellulaire, ils sont en cause dans de nombreuses maladies génétiques ou acquises et sont les cibles privilégiées de médicaments divers. Ces derniers mois, des progrès rapides ont été faits dans la caractérisation des trois sous-unités du canal sodique épithélial. Des mutations activatrices de ces sous-unités entraînent un syndrome hypertensif avec rétention de sel, alors que la perte de fonction du canal s'accompagne, au contraire, d'un tableau néonatal dramatique de perte de sel. Ce canal joue aussi un rôle dans le contrôle des échanges de liquide et de sels entre les capillaires pulmonaires et la lumière alvéolaire ; son immaturité pourrait aggraver, avec l'insuffisance de sécrétion du surfactant, les syndromes de détresse respiratoire des prématurés. Jusqu'à il y a peu, on pensait que l'eau utilisait passivement des canaux spécifiques de solutés, ou diffusait passivement à travers les membranes selon le gradient de pression osmotique. En fait, de nombreux canaux spécifiques de l'eau existent, dénommés aquaporines. En particulier, l'un d'eux est la cible de la vasopressine et sa mutation entraîne une forme de diabète insipide génétique, par l'incapacité de l'hormone d'activer le canal à eau au niveau des tubes collecteurs du rein.*

## Histoires d'aquaporines : des canaux qui font couler beaucoup d'eau

La 6<sup>e</sup> édition du Colloque « Canaux Ioniques » s'est tenue à La Londe-les-Maures (France) du 28 au 30 septembre 1995. Nous résumons ici l'une des dix sessions qui permit une mise au point sur les aquaporines, des canaux membranaires perméables à l'eau. S'appuyant sur leurs données les plus récentes, J.-F. Hubert (Rennes), C. Maurel (Gif-sur-Yvette), P. Ripoche (Saclay), C.H. van Os (Nijmegen, Pays-Bas) et A.S. Verkman (San Francisco, CA, USA) ont illustré les tâtonnements, la renaissance, et l'évolution exponentielle des connaissances sur ces protéines dont l'identification moléculaire démythifie la description des mouvements d'eau dans l'organisme (*m/s n° 3, vol. 9, p. 334; m/s n° 2, vol. 11, p. 299; m/s n° 7, vol. 11, p. 1051*). Cela illustre (si besoin était) qu'une utilisation raisonnée des outils de biologie moléculaire permet de caractériser des protéines, mais aussi, de faire évoluer les concepts des physiologistes. L'évolution rapide de ce domaine provoquant l'apparition d'interprétations quelquefois divergentes, nous nous en tiendrons ici à l'essentiel afin de ne pas noyer le lecteur dans les spéculations. Bien entendu, le lecteur assoiffé de détails est invité à se plonger dans de vastes revues [1-11], mais aussi à s'abreuver des discussions des articles les plus récents.

*« Not until the cDNA for this mystery protein was isolated, could the penny really drop. »*

(C.H. van Os et al., [5].)

### Naissance d'une idée

Du point de vue d'une cellule, la pression osmotique est une contrainte préoccupante s'exerçant sur ses membranes. Elle peut être réglée par des mouvements d'ions ou d'autres solutés [1, 4, 7, 8, 11], sur lesquels nous n'insisterons pas ici, et également par des mouvements transmembranaires d'eau [2, 5, 6, 9, 10]. Une simple bicouche lipidique, bien qu'hydrophobe, possède une perméabilité à l'eau faible mais mesurable [2, 5, 8]. Cependant, les hématies, ou certaines cellules épithéliales rénales, possèdent une perméabilité pour l'eau 5 à 700 fois supérieure aux perméabilités de bicouches lipidiques (qu'elles soient artificielles ou purifiées à partir de membranes cellulaires) [5, 8]. Ces fortes perméabilités hydriques sont inhibées par les sels de mercure, connus pour modifier les résidus cystéine des protéines. De plus, elles sont caractérisées par une énergie d'activation ( $E_a$ ) proche de l'énergie nécessaire au mouvement de molécules d'eau dans une phase aqueuse ( $E_a \sim 3$  kcal/mol) alors qu'au contraire, dans les cellules faiblement perméables, l'énergie d'activation associée au passage de l'eau avoisine celle d'une bicouche lipidique ( $E_a > 10$  kcal/mol) [2, 5].

Du point de vue du physiologiste, l'activité de canal d'une protéine – éventuellement spécifique pour l'eau – pourrait expliquer les fortes

perméabilités mesurées dans certaines cellules. A charge pour les convaincus d'en caractériser le support moléculaire tout en démontrant le caractère spécifique, des démonstrations qui permettraient d'emporter l'adhésion des plus sceptiques. En effet, nombreuses sont les protéines membranaires (telles que les canaux ioniques ou les transporteurs) qui permettent, dans une certaine mesure, un transport facilité de l'eau au travers des membranes. Toutefois, parmi les diverses protéines successivement étudiées, aucune n'a jamais pu rendre compte de façon satisfaisante des perméabilités natives les plus élevées [2, 5, 8, 10].

### Naissance de AQP1 et de ses sœurs

Derrière chaque découverte authentique se cache une petite histoire [2, 5, 9]. C'est lors de la purification d'une sous-unité (32 kDa) des polypeptides Rhésus humains de l'hématie qu'émergea la première aquaporine (AQP1) de l'histoire. Cette protéine de 28 kDa (alors dénommée «CHIP28») aurait pu être un produit de protéolyse partielle d'un polypeptide Rhésus. Cependant, elle possédait des propriétés antigéniques distinctes. De plus, elle était abondante non seulement dans les membranes des hématies ( $2 \times 10^5$ /hématie) mais aussi dans les

tubules rénaux. Elle apparaissait sous forme glycosylée (40 à 60 kDa) et semblait capable de former des oligomères (135 kDa). La protéine CHIP28 eut à subir une multitude de traitements [2]. Les étapes de clonage et de séquençage de son ADN complémentaire (ADNc, isolé d'une banque de foie foetal humain) furent déterminantes pour établir sa véritable activité (*m/s n° 3, vol. 9, p. 334*). En effet, l'étude des transports d'eau est simplifiée par l'utilisation de l'ovocyte de *Xenopus laevis*, un système d'expression classique. Dans ce modèle, la perméabilité membranaire est mesurée par la variation de volume de l'ovocyte lorsque celui-ci

Tableau I  
LES AQUAPORINES ET LA FAMILLE MIP

Protéine	Activité identifiée	Espèces exclues	Inhibition par les sels de mercure	Protéine kinases possiblement impliquées	Localisation(s) principale(s)	Références
MIP26	canal ionique (anions)	> 1,5 kDa	non	PKA, PKC, PK-Cam	œil (cellules des fibres du cristallin)	[3, 6]
AQP1	canal hydrique (polyols à 3C)	ions, urée, polyols à 4C	oui (Cys189)	PKC	érythrocytes, rein, œil, cerveau (plexus choroïde), cœur, poumon, etc.	[3, 5, 6, 18]
AQP2	canal hydrique	urée	oui (Cys189 ?)	PKA, PKC, CasKII	rein (tubule collecteur)	[3, 5, 6, 12, 13]
AQP3	canal hydrique (glycérol, urée)	acides aminés, sucres, ions	oui	CasKII	rein, appareil gastro-intestinal, poumon, vessie	[5, 6, 13, 14]
AQP4	canal hydrique	ions, urée, glycérol	non		cerveau, œil, rein, poumon, intestin	[5, 6, 15]
AQP5	canal hydrique	ions, urée, glycérol	oui (Cys182 ?)	PKA	glandes salivaires et lacrymales, trachée, poumon, œil	[6, 16]
FA-CHIP	canal hydrique (polyols à 3C)	urée, polyols à 4C	oui (Cys193 ?)		vessie, peau, poumon, vésicule biliaire, côlon, cerveau, foie	[17, 18, 22, 23]
$\alpha$ -TIP	canal hydrique	ions		PKA, PK-Ca, PK-GMPc	vacuoles des graines	[27]
P25	canal hydrique		oui		appareil digestif (chambre filtrante)	[21]

MIP26: major intrinsic protein 26 kDa; AQP: aquaporine; FA-CHIP: frog aquaporin-channel forming integral protein; TIP: tonoplast intrinsic protein; PKA: protéine kinase dépendante de l'AMP cyclique; PKC: protéine kinase C; PK-Cam: protéine kinase dépendante de la calmoduline; CasKII: caséine kinase II; PK-Ca: protéine kinase dépendante du calcium; PK-GMPc: protéine kinase dépendante du GMP cyclique.

est soumis à un choc osmotique [2, 5]. L'injection d'une construction contenant l'ARNc codant pour AQP1 provoque la synthèse de la protéine (maximale après 72 heures d'incubation), qui s'accompagne d'une augmentation de la perméabilité membranaire pour l'eau. Alors que les ovocytes témoins possèdent une perméabilité pour l'eau à forte énergie d'activation,  $E_a$  est proche de 3 kcal/mol dans les ovocytes injectés. En d'autres termes, l'eau traverse la membrane sans contrainte, ce qui assigne à AQP1 une caractéristique de canal. Ce canal n'est pas un canal ionique puisque son activité électrique est indécélable [2, 5, 10]. La découverte d'AQP1 enclencha la recherche d'homologues et permit l'identification de quatre autres AQP (Tableau 1), toutes capables d'augmenter la perméabilité membranaire pour l'eau après expression de leur gène dans l'ovocyte [12-16]. A l'exception de AQP4 [15], ces canaux sont inhibés par les sels de mercure [12-14, 16], tout comme les

fortes perméabilités pour l'eau mesurées dans des organes isolés [2, 5]. Cela permit de proposer que les AQP devaient participer aux mouvements d'eau dans ces organes. De fait, la fonction de canal hydrique de AQP1 fut confirmée par l'étude des propriétés de CHIP28 (AQP1 native) purifiée à partir d'hématies [2]. La sélectivité de chaque AQP a été étudiée pour certains solutés susceptibles de défier la spécificité du pore vis-à-vis de l'eau. Jusqu'à la découverte de AQP3, les AQP avaient la réputation d'être imperméables aux ions et aux autres petits solutés, comme l'urée, le glycérol ou le glucose [2, 5]. Cela a peut-être permis une acceptation plus spontanée du concept de canal hydrique. Mais avec AQP3, les « aquaporistes » découvrent une AQP perméable à l'urée [13, 14]. De ce point de vue, AQP3 reste une exception dans la famille. AQP3 est également perméable au glycérol ( $E_a \sim 6$  kcal/mol) [13]. Or, une étude récente montre que la surexpression de AQP1 (humaine) ou de FA-CHIP

(son homologue de la vessie de grenouille [17]) augmente la perméabilité des membranes d'ovocytes au glycérol et à d'autres petits polyols à trois atomes de carbone [18]. Ainsi, il est clair que la sélectivité des AQP n'est pas uniquement déterminée par la taille de l'espèce considérée (*voir aussi* [6]). En effet, les molécules d'eau (et à plus forte raison d'urée et de glycérol) qui peuvent traverser ces canaux, sont plus encombrantes que la plupart des espèces ioniques « physiologiques », qui en sont exclues. Les AQP possèderaient donc un « filtre de sélectivité » capable de discriminer entre les différentes espèces. Dès lors, il paraît indispensable de préciser en termes moléculaires les attributs de ces pores.

### Les AQP ont une famille

Un simple calcul des homologies de séquences permet de classer les AQP, non pas dans la famille des canaux ioniques, mais dans la famille MIP (*major intrinsic protein*) [2, 3, 5,

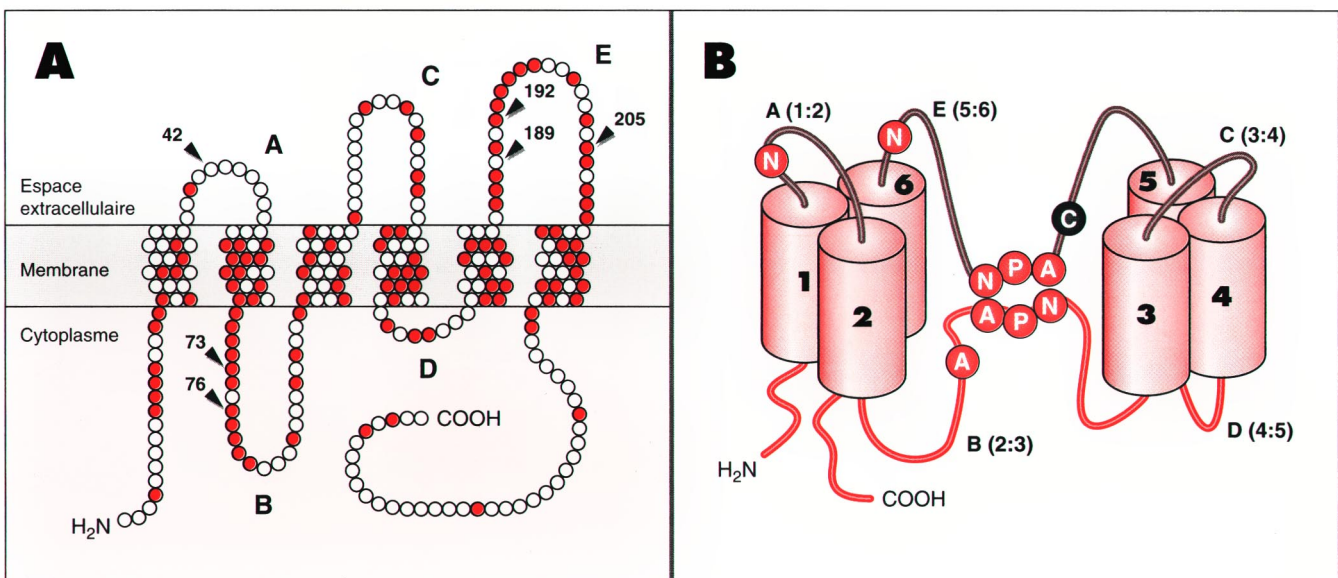


Figure 1. **Structures de la protéine AQP1.** **A.** Structures primaire et secondaire déduites de la séquence de son ADNc. La protéine comprendrait six domaines transmembranaires reliés entre eux par cinq boucles (A, B, C, D, E) dont trois (A, C, E) situées sur la face extracellulaire. Les acides aminés représentés en rouge sont les résidus fortement conservés dans la famille des protéines MIP. Les flèches indiquent les résidus Asn (76 et 192) des motifs NPA (Asn-Pro-Ala), les sites Asn putatifs de glycosylation (42 et 205), le résidu Cys de sensibilité aux sels de mercure (189) et son homologue Ala dans la boucle B (73). (D'après [5].) **B.** Schéma hypothétique de l'organisation des différents domaines (de I à VI). L'interaction entre les boucles B et E, provoquée par les motifs NPA, serait responsable de la formation du pore aqueux. Les résidus Ala73 (A), Cys189 (C), Asn42 (N) et Asn205 (N) sont représentés. (D'après [2, 19].)

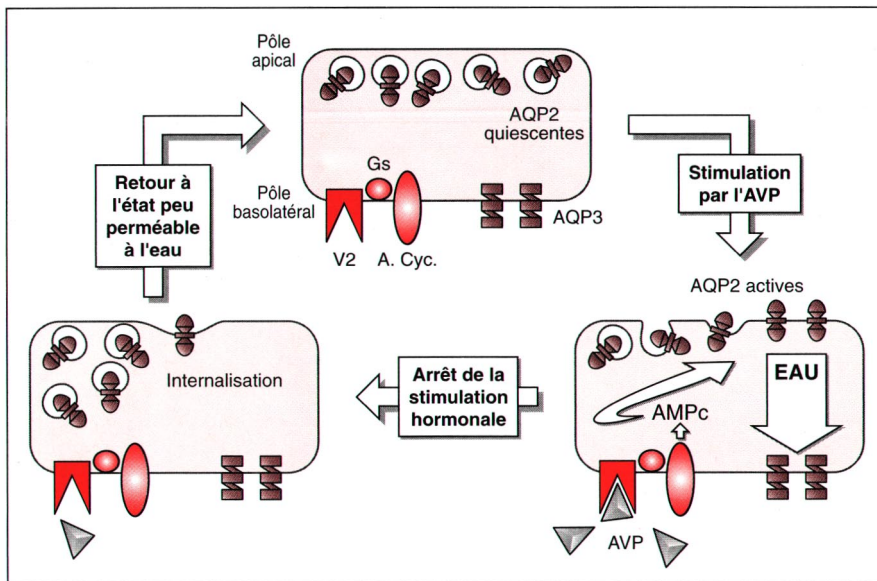


Figure 2. **Régulation de la perméabilité à l'eau de la cellule épithéliale du canal collecteur rénal: une hypothèse.** En l'absence d'AVP, en haut, les AQP2 sont concentrées dans des vésicules proches de la membrane apicale. AQP3 est présente dans la membrane basolatérale. À droite, la présence d'AVP sur les récepteurs V2 stimule la voie de l'adénylyl cyclase, entraînant la fusion des vésicules contenant AQP2 avec la membrane apicale, dont la perméabilité à l'eau augmente. Dans cette hypothèse, AQP3 pourrait participer à la réabsorption d'eau. À gauche, la disparition de l'AVP induit l'internalisation des AQP2 dans les endosomes, et une baisse de la perméabilité à l'eau de la membrane apicale. Les endosomes resteraient mobilisables par l'hormone. (D'après [5, 6, 9, 12, 14, 25].) AVP: vasopressine; V2: récepteur de la vasopressine; Gs: protéine hétérotrimérique stimulatrice liant le GTP; A.Cyc: adénylyl cyclase; AMPc: AMP cyclique.

12-17]. La topologie des protéines de cette famille semble assez constante, pour autant qu'on puisse la déduire du profil d'hydrophobicité issu de leur séquence primaire. Ces protéines possèdent six segments transmembranaires, constitués d'hélices  $\alpha$  d'au moins vingt acides aminés chacun (figure 1A, mais voir aussi [6, 10]). Les boucles reliant les domaines transmembranaires plongent alternativement à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule. Des sites présomptifs de glycosylation sont identifiés dans toutes les AQP. Les extrémités N et C terminales baignent dans le cytoplasme. Toutes les protéines de la famille MIP possèdent deux motifs Asn-Pro-Ala (NPA) situés, l'un dans la boucle B intracellulaire, l'autre, dans la boucle E extracellulaire. Il a été proposé [19] que la formation du pore des AQP

résulte de l'interaction entre ces motifs NPA (figure 1B). De fait, certaines mutations dirigées dans la boucle B ou dans la boucle E de AQP1 engendrent des canaux hydriques peu actifs, suggérant que ces domaines de la protéine seraient proches du pore [2, 5, 6]. Toutefois, tous les membres de la famille MIP ne sont pas des canaux hydriques (voir [3]). Il doit donc exister des motifs structuraux particuliers aux AQP qui les différencient des autres membres de la famille MIP.

Dans AQP1, une cystéine proche du motif NPA dans la boucle E (Cys189) est la cible des sels de mercure [2, 5, 6, 19]. Cela s'appliquerait également à AQP2 et AQP5, sensibles aux sels de mercure et possédant une Cys en position équivalente [12, 16]. En revanche, alors que AQP3 est inhibée par les sels de mercure, son

domaine E est dépourvu de résidu Cys [13, 14]. Il est vrai que AQP3 possède au moins deux résidus Cys sur lesquels pourrait s'exercer l'inhibition (suivant les auteurs ces résidus n'occupent pas la même place dans la molécule). Cela étant, la présence d'une Cys dans une boucle extramembranaire n'est pas synonyme d'inhibition par les sels de mercure. Pour preuve, on relève la présence de plusieurs Cys dans AQP4, alors que celle-ci n'est pas inhibée par ces sels [15]. Et, bien que la mutation ponctuelle Ala210Cys confère à AQP4 une boucle E homologue de celle de AQP1, le mutant reste insensible aux agents qui se fixent sur les groupements thiols.

Pendant que la structure primaire des AQP résiste aux interprétations, leur structure quaternaire semble moins « pudique » [5, 6, 10, 20]. Cryofractures, microscopie électronique et analyses hydrodynamiques permettent d'attribuer un diamètre de 3,2 nm à la forme monomérique de AQP1 [20]. Par comparaison, le diamètre d'une molécule d'eau est de 0,3 nm et celui d'une molécule d'urée de 0,4 nm. Les monomères s'organisent sous forme de tétramères ayant un diamètre moyen de 7 à 8,5 nm. De manière surprenante, la co-expression de AQP1 et de mutants inactifs affecte la perméabilité à l'eau des ovocytes injectés d'une manière inversement proportionnelle à la quantité de AQP1 présente [10, 19]. Ce résultat suggère qu'un monomère garde sa fonction même s'il est associé à d'autres monomères inactifs. La tétramérisation ne serait donc pas nécessaire à la fonction de canal de la protéine mais peut-être uniquement à son insertion correcte dans la membrane.

### Les AQP et les mouvements d'eau dans l'organisme

Les AQP sont exprimées dans les tissus fortement perméables à l'eau [2, 3, 5, 6, 9, 10]. A cet égard, le tube digestif des insectes homéoptères suceurs de sève est particulier [21]. Une chambre filtrante y est bordée de cellules épithéliales qui permettent l'élimination de l'eau présente en quantité excessive dans la sève



ingérée. En microscopie électronique, ces cellules présentent un réseau dense de particules intramembranaires constituées par la protéine P25. Tout comme AQP1, P25 s'organise sous forme de tétramères. Injectés directement dans l'ovocyte, des liposomes contenant P25 ou AQP1 provoquent (4 à 48 heures après l'injection) l'apparition d'une perméabilité pour l'eau à faible énergie d'activation et inhibée par les sels de mercure (J.-F. Hubert). Ainsi, cet épithélium, qui possède une indiscutable perméabilité à l'eau, exprime un canal hydrique de manière abondante et constitutive.

La vessie d'amphibien est un autre modèle classique de tissu possédant une perméabilité à l'eau considérable, raison pour laquelle il fait souvent l'objet de travaux pratiques en Faculté de Sciences. C'est FA-CHIP qui est identifiée dans les cellules endothéliales des vaisseaux de la vessie, et dans les cellules du mésothélium qui séparent la vessie de la cavité abdominale [22]. Sa présence permet des mouvements d'eau rapides, après le passage de la barrière épithéliale, vers le sang et la cavité abdominale. Mais FA-CHIP n'est pas spécifique de la vessie puisque son ARNm est détecté dans d'autres tissus traversés par des flux d'eau importants tels que la peau, le poumon, la vésicule biliaire, le côlon et le foie [23]. En outre, la protéine est identifiée dans le cerveau [22], un organe où les mouvements d'eau commencent seulement à être décrits. Il est à noter que FA-CHIP est absente du rein des amphibiens [23], ce qui constitue une particularité par rapport aux mammifères. D'un point de vue physiologique, la quantité d'ARNm codant pour FA-CHIP est fortement accrue dans la peau et la vessie des animaux devant s'adapter à un milieu salé, hyperosmotique [23]. Cette surexpression favoriserait la lutte des amphibiens contre la déshydratation. N'oublions pas que la déshydratation de l'organisme est immédiatement critique pour ces animaux chez lesquels la peau humide est responsable d'une partie des échanges gazeux.

Chez les mammifères, il est maintenant difficile de trouver un tissu

dans lequel une AQP ne serait pas synthétisée [2, 3, 5, 6, 9, 10]. Nous choisissons deux exemples de répartition tissulaire des AQP qui permettent de discuter leurs rôles respectifs *in vivo*, en commençant inévitablement par le rein (qui filtre et réabsorbe 180 litres d'eau par 24 heures). AQP1 est mise en évidence dans le tubule proximal [2, 3, 5, 6, 9]. Dans cette structure, AQP1 représenterait 3 à 4 % des protéines de la bordure en brosse. AQP1 est aussi présente sur toute la longueur de la partie descendante de l'anse de Henle. Cette AQP est peu présente dans les structures rénales qui, à l'état basal, sont faiblement perméables à l'eau. Ainsi, un polynucléotide antisens dirigé contre l'ARNm de AQP1 abolit 70 %, 100 % et 30 % de la perméabilité à l'eau provoquée par l'injection dans l'ovocyte d'ARNm issus respectivement, du cortex, de la médullaire et de la papille rénales [24]. AQP1 est donc quantitativement l'une des principales bases moléculaires de la perméabilité constitutive à l'eau dans le rein. AQP2 est exclusivement présente dans le tubule collecteur, principalement dans la région médullaire mais aussi dans le cortex [5, 6, 9, 12]. La perméabilité de ce segment est constitutivement basse, mais elle s'élève en présence de l'hormone antidiurétique, la vasopressine (AVP). En l'absence de l'hormone, AQP2 est concentrée dans des vésicules proches de la membrane apicale [6, 9, 25]. En présence d'AVP, un grand nombre de ces vésicules fusionnent avec la membrane apicale (figure 2) ce qui permet l'insertion de AQP2 face à la lumière du canal collecteur, pour y faciliter la réabsorption de l'eau (*m/s n° 2, vol. 11, p. 299*). Enfin, la présence de AQP2 dans des endosomes non acides augmente dès l'interruption d'une stimulation du rein par l'AVP, alors que la densité de la protéine diminue nettement dans la membrane apicale [9, 25]. AQP2 resterait mobilisable par l'AVP. AQP3 est synthétisée de manière constitutive dans le tubule collecteur, plus particulièrement dans la région médullaire mais aussi dans le cortex [6, 13, 14, 26]. A l'inverse de AQP2, sa localisation est essentiellement basolatérale. Ainsi, la présence simul-

tanée de AQP2 et de AQP3, respectivement sur les membranes basolatérale et apicale, permettrait un flux d'eau transcellulaire de la lumière des tubules vers le milieu interstitiel. Les outils actuels permettraient de tester directement cette hypothèse séduisante. La participation de AQP3 aux mouvements physiologiques d'urée est tout aussi hypothétique [9, 26]. Il ne faut pas oublier que, *in vivo*, les mouvements d'eau et d'urée semblent relever de mécanismes distincts. Le rein produit une quatrième AQP [5, 6, 15]. En effet, le protocole d'étude des messagers par protection contre la ribonucléase permet d'identifier la présence très discrète de l'ARNm de AQP4 dans le tubule collecteur. Cette protéine, comme AQP3, serait située dans la membrane basolatérale. Selon certains, cette redondance serait « justifiée » par une hypothétique hétérogénéité axiale de la synthèse de ces AQP le long du tubule collecteur [6].

La spécificité de la synthèse des protéines de la famille MIP est bien documentée dans le globe oculaire [2, 3, 16]. Dans la cornée par exemple, AQP1 dans l'endothélium et AQP5 dans l'épithélium contrôleraient l'humidification et la transparence de cette structure. Les résultats d'hybridation *in situ* et d'immunologie indiquent que AQP1 est également présente dans l'épithélium ciliaire et dans celui de l'iris, où elle réglerait l'osmolarité de l'humeur. Dans le cristallin, AQP1 est synthétisée dans les cellules épithéliales mais pas dans les cellules des fibres (rappelons que les cellules des fibres sont en permanence renouvelées par la différenciation des cellules épithéliales qui bordent la face antérieure). AQP1 caractériserait certaines cellules en division, où elle jouerait un rôle important dans la transition de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire. A l'inverse, MIP26 constitue 60 % des protéines membranaires des cellules des fibres mais n'est pas présente dans les cellules épithéliales. Cette protéine peut donc être utilisée comme marqueur de différenciation cellulaire. La localisation spécifique de AQP1 et de MIP26 dans le cristallin assurerait le maintien de sa transparence. D'ailleurs, il est à noter que

dans l'œil qui présente une cataracte, l'expression de MIP26 est diminuée. En périphérie de l'œil, c'est AQP5 qui nous fait pleurer. Sa caractérisation dans les glandes exocrines, en particulier lacrymales, a mis fin aux spéculations puisque la présence de AQP1 semble controversée dans les glandes sudoripares et parotides [2, 5, 6]. Le rôle de AQP4, dont la présence est toute aussi discrète dans l'œil que dans le rein, n'a fait l'objet d'aucune hypothèse [15].

### Régulations hormonales des AQP

Les séquences primaires de plusieurs AQP indiquent la présence de motifs consensus de phosphorylation pour diverses protéine kinases (voir *Tableau 1*) [5, 12, 14, 16]. C'est le cas de AQP2 qui possède, notamment, un site putatif de phosphorylation pour la protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA) [12]. Or, dans le tubule collecteur rénal, l'augmentation de la perméabilité membranaire à l'eau induite par l'AVP fait intervenir, d'une part, l'AMPc et, d'autre part, le mécanisme de mobilisation de AQP2 [5, 6, 9, 24, 25] (*figure 2*). En se liant aux récepteurs V2 de la membrane basolatérale, l'hormone stimule la synthèse du nucléotide (par l'adénylyl cyclase), ce qui permet l'activation de la PKA. Cette dernière jouerait un rôle important dans l'augmentation de la perméabilité membranaire à l'eau en intervenant dans la fusion des vésicules sous-membranaires (contenant AQP2) avec la membrane apicale et/ou en phosphorylant directement AQP2. Cependant, il n'est pas établi que AQP2 soit effectivement phosphorylée lors de ce processus physiologique (voir [5, 6, 9]). Toutefois, nous pouvons le suggérer puisque d'autres membres de la famille MIP, en particulier MIP26 [3] et  $\alpha$ -TIP (voir *ci-dessous*), voient leur activité modifiée par les phosphorylations. Un travail récent illustre le changement d'activité d'une aquaporine végétale,  $\alpha$ -TIP (*tonoplast intrinsic protein*), après phosphorylation par la PKA [27]. Comme chez les animaux, les aquaporines végétales ont une localisation spécifique et une synthèse réglable en fonction des condi-

tions physiologiques. Ainsi,  $\alpha$ -TIP s'accumule dans les membranes des vacuoles de stockage protéique des graines, pendant la période tardive de maturation et pendant les périodes précoces de germination, périodes nécessitant des ajustements hydriques spécifiques. La séquence primaire en acides aminés de  $\alpha$ -TIP (déduite de son ADNc) révèle cinq sites putatifs de phosphorylation. Seules ou en combinaison, les mutations ponctuelles de quatre de ces sites (Ser7, Ser23, Ser99 et Ser131) engendrent des mutants dont la perméabilité à l'eau est plus faible que celle d' $\alpha$ -TIP native. Les réductions les plus importantes sont observées pour les mutants affectés au niveau des sites cytoplasmiques les plus accessibles (Ser7 et Ser99), ce qui s'accorde bien avec l'existence d'une phosphorylation de  $\alpha$ -TIP native par une protéine kinase intracellulaire. En revanche, il demeure surprenant que la mutation au niveau de Ser131 soit aussi associée à une perméabilité réduite alors que ce résidu s'orienterait dans la vacuole. Mais on retiendra surtout que : (1)  $\alpha$ -TIP peut être phosphorylée *in vitro* par la PKA et (2) une accumulation d'AMPc peut rester sans effet sur l'activité du triple mutant affecté au niveau des sites Ser7, Ser23 et Ser99, mais peut stimuler l'activité des simples et doubles mutants correspondants ainsi que, d'une manière plus importante, celle de  $\alpha$ -TIP native. Il apparaît donc que l'activité de  $\alpha$ -TIP est stimulée consécutivement à la phosphorylation des trois sites par la PKA. Cependant, la phosphorylation de chacun de ces sites peut, indépendamment, moduler le transport d'eau par la protéine. Il est urgent de réaliser ce type d'expériences chez l'animal afin d'y caractériser les voies de régulation modulant l'activité des AQP. Cela permettrait d'intégrer ces protéines dans les processus de régulations neurohormonales.

### AQP et maladies

Alors, pourrait-on vivre sans un répertoire complet de AQP? Chez l'homme, le gène polyintronique *AQP1* se situe sur le chromosome 7p14 (voir [2]). Or, aucune maladie

héréditaire n'est associée à ce *locus*. A l'origine, plusieurs auteurs spéculèrent qu'un défaut (d'origine génétique) dans la fonction de AQP1 serait associé à un handicap majeur, voire un phénotype léthal [2, 5]. Cette hypothèse fut mise à mal par l'identification de mutations sévères du gène *AQP1* chez trois individus sains [28] (voir aussi [6, 9]). Chez deux individus, AQP1 n'est pas synthétisée du tout (dû à une délétion du premier exon dans un cas et à une insertion déplaçant la phase de lecture dans l'autre cas). Chez le troisième individu, une isoforme de AQP1 (ne différant que par l'acide aminé 38) est produite, mais est peu active, principalement non glycosylée et moins stable que la protéine « saine ». Chez les trois individus, les perméabilités à l'eau des hématies sont amoindries de 80 % en moyenne (par rapport à des individus non déficients en AQP1). De plus, ces hématies se caractérisent par une  $E_a$  élevée (9,5 kcal/mol) indiquant la quasi-inexistence de pores aqueux dans ces membranes. L'absence de AQP1 n'y est donc pas compensée par l'expression d'une autre AQP. Ces résultats ne sont pas sans rappeler que certains animaux transgéniques « apparemment normaux » sont pourtant amputés d'isoformes de protéines *a priori* indispensables. On en est réduit à s'interroger sur les fondements moléculaires des adaptations de ces organismes. Il était légitime de spéculer sur l'intervention de AQP dans certaines maladies rénales d'origine génétique. Le diabète insipide néphrogénique congénital se traduit par une polyurie, s'expliquant par une absence de réabsorption d'eau, en réponse à l'AVP, dans le tubule collecteur rénal. Certains malades souffrent d'un défaut d'expression du gène codant pour le récepteur V2 de l'AVP, ce qui peut rendre compte du symptôme. Il s'agit, dans ce cas, d'un diabète insipide néphrogénique lié au chromosome X, le gène codant pour le récepteur V2 étant localisé à l'extrémité distale du bras long de ce chromosome (voir [5, 9]). Une autre population de patients, présentant une forme autosomique récessive de la maladie, est caractérisée par des

mutations au niveau du gène *AQP2*, localisé sur le chromosome 12q13 (*m/s n° 6-7, vol. 10, p. 727*) [5, 9, 29, 30]. Il peut s'agir d'une délétion ponctuelle qui déplace la phase ouverte de lecture, ou de simples mutations ponctuelles engendrant des isoformes qui ne diffèrent de *AQP2* qu'au niveau d'un seul acide aminé (en position 64, 187 ou 216). Ces isoformes ne sont pas fonctionnelles puisque leur expression dans l'ovocyte de xénope n'engendre pas d'augmentation de perméabilité à l'eau. En fait, les mutations ponctuelles du gène *AQP2* provoquent un défaut de transport intracellulaire de la protéine qui est incapable de s'insérer dans la membrane plasmique en réponse à l'AVP. En conséquence, ces mutations limiteraient suffisamment la réabsorption d'eau par le rein pour entraîner la polyurie dont souffrent les patients (*m/s n° 7, vol. 11, p. 1051*).

Quant aux autres AQP, on attend tout d'abord des études à venir qu'elles nous indiquent si la localisation chromosomique de leur gène coïncide avec une affection humaine héréditaire.

### Et voquent les AQP !

Ainsi, après l'émergence des premiers arguments en faveur de canaux hydriques, il aura fallu une quarantaine d'années pour en établir l'existence. Et moins de deux ans après la naissance de *AQP1*, « les aquaporistes » abordent déjà sa cristallisation et l'analyse des cristaux en 2 et 3 dimensions [31]. La famille des AQP pose maintenant des questions de tout ordre. L'élaboration d'outils pharmacologiques – voire thérapeutiques – paraît un développement indispensable à l'étude de l'hétérogénéité de la famille AQP. Cela s'accompagnera probablement d'une détermination des motifs structuraux à l'origine de leur singularité. Après la nouvelle vague de données concernant la biologie moléculaire et la biochimie des AQP, il reste indispensable de compléter la description de leur(s) fonction(s) dans leur véritable bain, leur environnement physiologique. A cet égard, les méthodes macroscopiques actuelles semblent

difficilement adaptables pour des expériences sur « cellules uniques », voire sur « canal isolé », qui permettraient de comprendre la surprenante diversité des AQP et la spécificité de leur expression. On découvre des AQP dans des types cellulaires peu accessibles aux études de flux d'eau. Même nos neurones ne sont plus « étanches ». La présence de *AQP4* dans les neurones des noyaux supraoptiques et paraventriculaires, qui sécrètent l'AVP, suggère un rôle nouveau pour cette AQP [15]. Alors que l'activité de *AQP2* est conditionnée par l'AVP, *AQP4* participerait au contrôle de la sécrétion de l'hormone. Alors, si l'on n'explique pas tous les mouvements d'eau par l'activité des AQP, il est maintenant limpide que l'étude de ces protéines contribue déjà de manière spectaculaire à la description des mouvements d'eau dans l'organisme ■

### Remerciements

Nous remercions Pierre Ripoche dont l'aide experte et généreuse nous a permis de rester à flot sur la vague déferlante des publications récentes.

### RÉFÉRENCES

1. Wang W, Sackin H, Giebisch G. Renal potassium channels and their regulation. *Annu Rev Physiol* 1992; 54: 81-96.
2. Agre P, Preston GM, Smith BL, Jung JS, Raina S, Moon C, Guggino WB, Nielsen S. Aquaporin CHIP: the archetypal molecular water channel. *Am J Physiol* 1993; 265: F463-76.
3. Chepelinsky AB. The MIP transmembrane channel gene family. In: Peracchia C, ed. *Handbook of membrane channels: molecular and cellular physiology*. New York: Academic Press, 1994: 413-32.
4. Garty H. Molecular properties of epithelial, amiloride-blockable  $\text{Na}^+$  channels. *FASEB J* 1994; 8: 522-8.
5. Van Os CH, Deen PMT, Dempster JA. Aquaporins: water selective channels in biological membranes. Molecular structure and tissue distribution. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1197: 291-309.
6. Agre P, Brown D, Nielsen S. Aquaporin water channels: unanswered questions and unresolved controversies. *Curr Op Cell Biol* 1995; 7: 472-83.
7. Burg MB. Molecular basis of osmotic regulation. *Am J Physiol* 1995; 268: F983-96.
8. Fischbarg J, Vera JC. Multifunctional transporter models: lessons from the transport of water, sugars and ring compounds by GLUTs. *Am J Physiol* 1995; 268: C1077-89.
9. Nielsen S, Agre P. The aquaporin family of water channels in kidney. *Kidney Int* 1995; 48: 1057-68.
10. Verkman AS, Lan-Bo S, Frigeri A, Hasegawa H, Farinas J, Mitra A, Skach W, Brown D, van Hoek AN, Ma T. Structure and function of kidney water channels. *Kidney Int* 1995; 48: 1069-81.
11. Reuss L, Altenberg GA. cAMP-activated- $\text{Cl}^-$  channels: regulatory role in gallbladder and other absorptive epithelia. *Neurosci Biophys Sci* 1995; 10: 86-91.
12. Fushimi K, Uchida S, Hara Y, Hirata Y, Marumo F, Sasaki S. Cloning and expression of apical membrane water channel of rat kidney collecting tubule. *Nature* 1993; 361: 549-52.
13. Ishibashi K, Sasaki S, Fushimi K, Uchida S, Kuwahara M, Saito H, Furukawa T, Nakajima K, Yamaguchi Y, Gojobori T, Marumo F. Molecular cloning and expression of a member of the aquaporin family with permeability to glycerol and urea in addition to water expressed at the basolateral membrane of kidney collecting duct cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 6269-73.
14. Echevarria M, Windhager EE, Tate SS, Frindt G. Cloning and expression of *AQP3*, a water channel from the medullary collecting duct of rat kidney. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 10997-1001.
15. Jung JS, Bhat RV, Preston GM, Guggino WB, Baraban JM, Agre P. Molecular characterization of an aquaporin cDNA from brain: candidate osmoreceptor and regulator of water balance. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 13052-6.
16. Raina S, Preston GM, Guggino WB, Agre P. Molecular cloning and characterization of an aquaporin cDNA from salivary, lacrimal, and respiratory tissues. *J Biol Chem* 1995; 270: 1908-12.
17. Abrami L, Simon M, Rousselet G, Berthouaud V, Buhler JM, Ripoche P. Sequence and functional expression of an amphibian water channel, FA-CHIP: a new member of the MIP family. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1192: 147-51.
18. Abrami L, Tacnet F, Ripoche P. Evidence for a glycerol pathway through aquaporin 1 (CHIP28) channels. *Pflügers Arch Eur J Physiol* 1995; 430: 447-58.
19. Jung JS, Preston GM, Smith BL, Guggino WB, Agre P. Molecular structure of the water channel through aquaporin CHIP. The hourglass model. *J Biol Chem* 1994; 269: 14648-54.

## RÉFÉRENCES

20. Verbavatz JM, Brown D, Sabolic I, Valenti G, Ausiello DA, van Hoek AN, Ma T, Verkman AS. Tetrameric assembly of CHIP28 water channels in liposomes and cell membranes: a freeze-fracture study. *J Cell Biol* 1993; 123: 605-18.
21. Beuron F, Le Cahérec F, Guillam MT, Cavalier A, Garret A, Tassan JP, Delamarche C, Schultz P, Mallouh V, Rolland JP, Hubert JF, Gouranton J, Thomas D. Structural analysis of a MIP family protein from the digestive tract of *Cicadella viridis*. *J Biol Chem* 1995; 270: 17414-22.
22. Abrami L, Gobin R, Berthonaud V, LamThanh H, Chevalier J, Ripoche P, Verbavatz JM. Localisation of the FA-CHIP water channel in frog urinary bladder. *Eur J Cell Biol* 1996 (sous presse).
23. Abrami L, Capurro C, Ibarra C, Parisi M, Buhler JM, Ripoche P. Distribution of mRNA encoding the FA-CHIP water channel in amphibian tissues: effects of salt adaptation. *J Membrane Biol* 1995; 143: 199-205.
24. Echevarria M, Frindt G, Preston GM, Milovanovic S, Agre P, Fischbarg J, Windhager EE. Expression of multiple water channel activities in *Xenopus* oocytes injected with mRNA from rat kidney. *J Gen Physiol* 1993; 101: 827-41.
25. Nielsen S, Chou CL, Marples D, Christensen EI, Kishore BK, Knepper MA. Vasopressin increases water permeability of kidney collecting duct by inducing translocation of aquaporin-CD water channels to plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 1013-7.
26. Ecelbarger CA, Terris J, Frindt G, Echevarria M, Marples D, Nielsen S, Knepper MA. Aquaporin-3 water channel localization and regulation in rat kidney. *Am J Physiol* 1995; 269: F663-72.
27. Maurel C, Kado RT, Guern J, Chrispeels MJ. Phosphorylation regulates the water channel activity of the seed-specific aquaporin  $\alpha$ -TIP. *EMBO J* 1995; 14: 3028-35.
28. Preston GM, Smith BL, Zeidel ML, Moulds JJ, Agre P. Mutations in aquaporin-1 in phenotypically normal humans without functional CHIP water channels. *Science* 1994; 265: 1585-7.
29. Deen PMT, Verdijk MAJ, Knoers NVAM, Wieringa B, Monnens LAH, van Os CH, van Oost BA. Requirement of human renal water channel aquaporin-2 for vasopressin-dependent concentration of urine. *Science* 1994; 264: 92-5.
30. Deen PMT, Croes H, van Aubele RAMH, Ginsel LA, van Os CH. Water channels encoded by mutant aquaporin-2 genes in nephrogenic diabetes insipidus are impaired in their cellular routing. *J Clin Invest* 1995; 95: 2291-6.
31. Mitra AK, van Hoek AN, Wiener MC, Verkman AS, Yeager M. The CHIP28 water channel visualized in ice by electron crystallography. *Nature Struct Biol* 1995; 2: 726-9.

### Évelyne Benoit

Chargée de recherche au Cnrs  
Laboratoire de Physiologie Cellulaire,  
Cnrs ERS 0100, bâtiment 443, Université  
Paris-Sud, 91405 Orsay Cedex, France.

### Pierre-François Méry

Chargé de recherche à l'Inserm  
Laboratoire de Cardiologie Cellulaire et  
Moléculaire, Inserm U. 446, Faculté de  
Pharmacie, Châtenay-Malabry, France.

### Frédérique Tacnet

Chercheur au CEA  
Département de Biologie Cellulaire et  
Moléculaire, CEA/Saclay, Gif-sur-Yvette,  
France.

### Fabien Tell

Maître de conférence  
Département de Physiologie, Cnrs Ura  
1832, Faculté Saint-Jérôme, Marseille,  
France.

### TIRÉS À PART

E. Benoit.

### ERRATUM

médecine/sciences n° 5, vol. 12, mai 1996, page 567

Dans l'article de Pedro D'Orléans-Juste, *et al.* le Ro 46-8443, présenté comme agoniste sélectif et non peptidique dans le *Tableau I*, est plutôt un antagoniste sélectif non peptidique des récepteurs ET<sub>B</sub>.

La Rédaction