



● Le microchimérisme d'origine maternelle persiste à l'âge adulte

Maloney, J Clin Invest 1999; 104: 41-7.

L'article référencé ci-dessus se caractérise par l'analyse de cellules chimériques d'origine maternelle chez des adultes sains ou présentant une sclérodémie. Cette thématique de travail repose sur l'hypothèse que des maladies auto-immunes pourraient en réalité être induites par des cellules provenant d'un autre individu, présentes en faible quantité (microchimérisme) et responsables d'une réaction anti-hôte. Dans ce cadre, les auteurs recherchent une nouvelle source de chimérisme, la transfusion materno-fœtale et évaluent son rôle dans la sclérodémie.

L'étude a comporté l'inclusion de deux groupes de familles. Le premier groupe comportait des familles au sein desquelles il n'y avait aucune morbidité et pas d'antécédents de transfusions. Le second groupe a comporté des familles ayant au moins un individu ayant une sclérodémie. Le séquençage génomique des allèles HLA DRB1, DRB3, DRB4, DQA1 et DQB1 a été réalisé dans ces familles. Les antigènes HLA de classe I étaient analysés par lymphocytotoxicité. Les mesures de précaution dirigées contre les contaminations des PCR ont été extrêmement strictes. Enfin des doubles hybridations in situ avec des sondes spécifiques des chromosomes X et Y ont été réalisées sur des frottis étalés avec des cellules mononucléées du sang périphérique de ces individus. Grâce à ce génotypage extrêmement fin, les auteurs pouvaient mettre en évidence la présence d'un haplotype maternel non partagé (non transmis) chez un individu adulte et donc démontrer la présence de cellules d'origine maternelle. A titre d'exemple, l'allèle HLA DRB1 04 maternel était retrouvé chez 10/18 adultes sains testés et 2/3 avec une sclérodémie. Au total, la présence d'ADN maternel était mise en évidence chez 55% des individus adultes testés, sans qu'il n'y ait de différence entre ceux ayant ou non une sclérodémie. Par hybridation in situ chez des hommes adultes ayant une sclérodémie, de très rares cellules femelles (XX) étaient mises en évidence chez 2/3 qui avaient une sclérodémie et 0/3 normaux.

Ces résultats originaux démontrent qu'il existe chez des individus à l'âge adulte, des cellules issues de la mère démontrant pour la première fois que le trafic bidirectionnel induit par la grossesse était persistant. En effet, si le trafic fœto-maternel a été largement décrit dans les cinq dernières années, le rôle et la persistance du trafic materno-fœtal restait lui encore peu évalué. Il avait pu être montré qu'il y avait des cellules de la mère dans le sang de cordon. De même, chez les enfants ayant un déficit

immunitaire combiné sévère (SCID), la présence de cellules maternelles avait été retrouvée; celle-ci pouvant même induire des tableaux de réaction du greffon contre l'hôte. Enfin, il avait pu aussi être démontré qu'il existait des transferts de cellules entre jumeaux hétérozygotes pendant la vie fœtale. La présente étude a été effectuée avec une méthodologie indiscutable basée sur une très bonne connaissance de l'amplification des séquences HLA de classe II. De nombreuses amorces ont été réalisées aux fins d'effectuer ce travail. Celui-ci démontre définitivement que des cellules maternelles sont transfusées à l'enfant et persistent de manière fréquente à l'âge adulte.

Cependant, le rôle des cellules chimériques reste mal connu. En particulier, il n'y a pas de surreprésentation de cette présence de cellules maternelles dans la sclérodémie adulte. Cette question vient à la suite de deux études récentes démontrant que la présence de cellules fœtales était plus fréquente chez les femmes ayant une sclérodémie par comparaison aux femmes contrôles.^{1,2} De même, le taux de cellules fœtales était quantitativement plus élevé chez les femmes ayant une sclérodémie par rapport aux contrôles.¹ Ces travaux suggéraient que la sclérodémie survenant chez des femmes ayant eu des grossesses antérieurement pouvait avoir été induite par des cellules fœtales résiduelles. Néanmoins, ce type de schéma physiopathologique ne pouvait pas expliquer les sclérodémies de l'enfant ou de l'homme chez lesquels il ne peut pas y avoir eu de transfusions de cellules fœtales par définition. Enfin, nous avons pu montrer que des cellules fœtales étaient responsables de maladies cutanées survenant pendant la grossesse.

Le travail référencé ici avait donc été entrepris par la même équipe que celle ayant mis en évidence le rôle des cellules fœtales, essentiellement pour démontrer que les sclérodémies de l'adulte mâle et/ou de l'enfant pouvaient être la conséquence d'un chimérisme cette fois materno-fœtal. Cette étude ne permet pas de confirmer cette hypothèse. Elle n'en reste pas moins passionnante de par la mise en évidence de la fréquence importante de la persistance de cellules maternelles chez les adultes sains. Il existe donc de très nombreuses sources potentielles de chimérisme: transfusion fœto-maternelle (à l'occasion de grossesses, mais aussi de grossesses interrompues même précocement), transfusion materno-fœtales, transfert entre jumeaux, transfusions sanguines (y compris anciennes) et greffe d'organes. Il existe une prévalence accrue du chimérisme fœtal dans la sclérodémie. Mais le chimérisme seul ne suffit pas à induire des maladies auto-immunes. Les équipes actuelles sont donc à la recherche d'autres cofacteurs qui chez des individus ayant un chimérisme, favoriseraient le développement d'auto-immunité.

Adresse de correspondance :

Dr Selim Aractingi
Unité de dermatologie
Hôpital Tenon
4, rue de la Chine
F-75970 Paris Cedex 20



Références

1. Nelson JL, et al. Microchimerism and HLA compatible relationships of pregnancy in scleroderma. *Lancet* 1998; 351: 191-4.
2. Artlett CM, et al. Identification of fetal DNA in skin lesions from women with systemic sclerosis. *N Engl J Med* 1998; 338: 1186-91.
3. Aractingi S, et al. Fetal DNA in skin of polymorphic eruptions of pregnancy. *Lancet* 1998; 352: 1898-901.

● Syndrome néphrotique congénital chez la souris knock-out pour le gène de CD₂AP, la protéine adaptatrice de CD₂

L'adhésion des lymphocytes T et des cellules natural killer aux cellules présentatrices d'antigène est favorisée par CD₂AP, une protéine adaptatrice membranaire qui renforce l'interaction de CD₂ avec son ligand sur la cellule cible. Il s'agit d'une protéine exprimée dans de nombreux tissus dont le rôle physiologique n'est pas encore complètement élucidé.

L'équipe de Shaw S. a généré des souris déficientes en CD₂AP chimériques par injection dans des blastocystes de deux clones recombinants homologues différents dans lesquels l'exon codant pour l'un des domaines SH3 de CD₂AP a été remplacé par un gène néomycine-résistant. Les lignées de souris homozygotes déficientes pour ce gène ont été obtenues par croisement des hétérozygotes avec une fréquence de 25% et leur génotype a été confirmé par analyse en southern blot (ADN). Les animaux n'exprimaient pas (homozygotes) ou faiblement (hétérozygotes) la protéine. A trois semaines de vie, les souris homozygotes présentaient un retard de croissance et leur durée de vie n'excédait pas six semaines. L'examen post-mortem des animaux a montré une cardiomégalie, une splénomégalie, une hypertrophie du thymus et la présence d'ascite. Mais ces animaux présentaient de plus une insuffisance rénale avec syndrome néphrotique, la protéinurie apparaissant à deux semaines de vie. L'étude des reins de ces souris en microscopie optique a montré une hypercellularité et une hypertrophie glomérulaire à J7 associée à partir de J14 à des dépôts mésangiaux et aboutissant à J28 à une sclérose glomérulaire et à des dilatations tubulaires. L'étude en microscopie électronique a mis en évidence des anomalies de la barrière de filtration glomérulaire. Celle-ci est habituellement constituée de la membrane des cellules endothéliales, de la membrane basale glomérulaire, et de la membrane des cellules épithéliales ainsi que de leurs prolongements pseudopodes. L'espace entre les pieds des podocytes est normalement régulier et contient une structure de jonction spécialisée en forme de fente nommée le

slit diaphragme. En 1978, Richard Rodewald et Morris Karnovsky ont montré que ce slit diaphragme fonctionne comme une fermeture éclair formée de molécules laissant le passage pour l'eau et les sucres mais retenant les protéines. Chez la souris déficiente en CD₂ à J7, on observait la perte de l'intégrité des pseudopodes podocytaires avec parfois oblitération de l'espace entre prolongements. Ces anomalies étaient retrouvées dans tous les glomérules et au sein d'un glomérule dans toutes les anses capillaires. La membrane basale glomérulaire et les cellules endothéliales étaient normales. Les dépôts mésangiaux apparaissant à quatre semaines étaient parfois extensifs oblitérant la lumière des anses capillaires. On pouvait noter l'absence de dépôts sous-endothéliaux ou sous-épithéliaux qui auraient évoqué une glomérulonéphrite auto-immune. Les dépôts étaient constitués de composants de la matrice extra-cellulaire normale telle qu'elle est sécrétée par les cellules mésangiales (fibronectine, collagène α 1IV, α 2IV, laminine α 1, α 2, et α 5 et β 1 et γ 1). Des isoformes différentes de la laminine et du collagène IV étaient retrouvées sous la membrane basale glomérulaire suggérant l'origine mésangiale pure des dépôts. En immunofluorescence, dans le rein de souris témoins, on a pu montrer que la CD₂AP est principalement exprimée dans les podocytes, de façon quasi superposable à la synaptopodine, un marqueur des pédicelles des podocytes.¹ Les cellules mésangiales des souris témoins étaient négatives mais on notait la positivité de certains tubules. Le marquage rénal était complètement négatif pour les souris déficientes pour le gène de CD₂AP.

Des mutations du gène de la néphrine ont récemment été décrites en association au syndrome néphrotique congénital Finlandais.² La néphrine, membre de la superfamille des immunoglobulines est exprimée exclusivement dans les podocytes et est le constituant majoritaire du slit diaphragme.³ C'est pourquoi les auteurs ont voulu déterminer si CD₂AP était associée à la néphrine au sein du podocyte. Ne pouvant pas solubiliser à partir de glomérules purifiés CD₂AP et la néphrine, ils ont utilisé une protéine chimérique comportant dans sa structure le domaine extracellulaire et transmembranaire du virus de la stomatite vésiculaire fusionné sur le domaine cytoplasmique de la néphrine. Après avoir exposé cette protéine à CD₂AP combiné à un marqueur (myc), la co-immunoprécipitation puis l'immunoblotting avec des anticorps anti-myc a suggéré que la protéine CD₂AP est bien associée à la néphrine.

Les auteurs se sont enfin intéressés à la fonction cellulaire T des souris déficientes pour le gène de CD₂AP. Des tests fonctionnels de prolifération (concanavaleine A) ont confirmé l'existence d'un dysfonctionnement des lymphocytes T. Pour étudier la responsabilité des anomalies immunologiques dans l'apparition de l'atteinte rénale, les auteurs ont transplanté la moelle de souris déficientes pour CD₂AP à des souris témoins irradiées. Les souris transplantées présentaient toujours les anomalies immunologiques mais avaient une fonction rénale normale ce qui indique que l'atteinte rénale n'est pas secondaire à la dysfonction lymphocytaire T.

Le rôle de CD₂AP dans le rein peut donc être considéré comme semblable à son rôle dans le système immunitaire où cette protéine favorise le rapprochement entre deux structures cellulaires dans la synapse immunologique. Dans le rein, CD₂AP semble essentielle à l'intégrité fonctionnelle du glomérule. Les lésions décrites chez la souris déficiente pour CD₂AP débutent par l'atteinte podocytaire. L'hypothèse des auteurs est que CD₂AP pourrait être un facteur déterminant dans la liaison de la

néphrine au cytosquelette. La description récente de l'association de CD₂AP à p130^{CAS} une protéine d'adhésion⁴ confirme le rôle de CD₂AP dans les contacts cellulaires spécialisés. Enfin, il n'y a pas encore de données chez l'homme permettant de discuter le rôle physiopathologique de CD₂AP dans les syndromes néphrotiques. Néanmoins avec ces travaux, de nouvelles informations essentielles sont apportées quant aux intervenants moléculaires mis en jeu dans la filtration glomérulaire.

Adresse de correspondance :

A. Bagnis, MD
Renal Unit, 8th floor
Massachusetts General Hospital East
149, 13th street
Charlestown, 02129, MA, USA



Références

1. Shih NY, Li J, Karpitskii V, Nguyen A, Dustin ML, Kanagawa O, Miner JH, Shaw AS. Congenital nephrotic syndrome in mice lacking CD2-associated protein. *Science* 1999; 286: 312-5.
2. Mundel P, Heid HW, Mundel TM, Kruger M, Reiser J, Kriz W. Synaptopodin: An actin-associated protein in telencephalic dendrites and renal podocytes. *J Cell Biol* 1997; 139: 193-204.
3. Kestila M, Lenkkeri U, Mannikko M, Lamerdin J, McCready P, Putaala H, Ruotsalainen V, Morita T, Nissinen M, Herva R, Kashtan CE, Peltonen L, Holmberg C, Olsen A, Tryggvason K. Positionally cloned gene for a novel glomerular protein-nephrin is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell* 1998; 1: 575-82.
4. Ruotsalainen V, Ljungberg P, Wartiovaara J, Lenkkeri U, Kestila M, Jalanko H, Holmberg C, Tryggvason K. Nephrin is specifically located at the slit diaphragm of glomerular podocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 7962-7.
5. Kirsch KH, Georgescu MM, Ishimaru S, Hanafusa H. CMS: An adapter molecule involved in cytoskeletal rearrangements. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, 96: 6211.

● Traitement de la polykystose hépato-rénale par un inhibiteur de la tyrosine-kinase¹

La polykystose hépato-rénale (PKR) est la plus fréquente des maladies génétiquement transmises conduisant potentiellement à l'insuffisance rénale terminale. Les gènes situés sur les chromosomes 4, 6 et 16 codent pour des protéines appelées polycystines qui, lorsqu'elles sont mutées, induisent l'apparition de kystes développés aux dépens des tubules rénaux. Le coût humain et économique de cette maladie est énorme et le traitement uniquement palliatif.

La nature néoplasique des kystes rénaux, (les cellules épithéliales des kystes se multipliant plus rapidement que des cellules normales), a fait proposer par certains auteurs un traitement anti-néoplasique pour cette affection. Expérimentalement, le

traitement de souris porteuses de la forme récessive de la maladie par le paclitaxel, un anticancéreux indiqué dans les carcinomes ovariens ralentit la progression des kystes² mais son faible index thérapeutique dans les modèles expérimentaux murins de la maladie³ et la toxicité des antinéoplasiques a fait abandonner cette voie. De plus, les cellules épithéliales des kystes ne sont pas vraiment des cellules malignes, tout au plus se comportent-elles comme des cellules adénomateuses bénignes, avec une croissance accélérée. Le rôle de facteurs de croissance comme l'epidermal growth factor (EGF) dans le taux de prolifération de ces cellules a fait envisager d'autres stratégies thérapeutiques expérimentales qui semblent plus raisonnables avec pour objectif de limiter l'expansion des cellules cibles en agissant sur les promoteurs de la croissance cellulaire. Différents auteurs ont établi ainsi le rôle de l'axe EGF/TGF α /EGF-receptor dans la promotion de l'hyperplasie épithéliale rénale:⁴ in vitro, l'EGF et le TGF induisent l'apparition de kystes rénaux;⁵ le liquide provenant des kystes de rats ou des souris porteurs de la PKR contient des peptides EGF-like susceptibles d'avoir un effet mitogénique⁶ et la quantité d'ARNm du TGF α y est augmentée;⁷ le nombre de récepteurs pour l'EGF situés sur la membrane apicale des cellules épithéliales kystiques semble être corrélié à la rapidité de progression des kystes chez l'animal et chez l'homme.⁸

In vitro, l'inhibiteur spécifique de l'activation tyrosine-dépendante du récepteur de l'EGF, a un effet très sensible sur la croissance des kystes rénaux chez la souris porteuse de la forme récessive de la maladie (C57 Balb/c-bpk/bpk).⁹ In vivo, la mutation d'un seul amino-acide du récepteur de l'EGF diminue significativement l'activité tyrosine-kinase de celui-ci et lorsqu'elle est induite chez des souris présentant également la forme récessive de la PKR aboutit à une diminution sensible de l'activité du récepteur. Chez les animaux homozygotes pour les deux gènes mutants, le développement des kystes est significativement ralenti et la fonction tubulaire notablement préservée. La situation anormale des récepteurs de l'EGF sur la surface urinaire des cellules épithéliales kystiques permet d'envisager une intervention sur l'activité de ces récepteurs par administration d'une drogue efficace seulement dans les urines au contact des récepteurs ciblés ou elle est concentrée. Une étape intéressante a été franchie avec les travaux de Sweeney et coll. qui ont testé cette hypothèse in vivo chez la souris. L'inhibition de l'activité tyrosine-kinase du récepteur a été réalisée grâce à un composé (EKI-795) qui se lie de façon covalente au site de liaison de l'ATP sur le récepteur. Il inhibe l'autophosphorylation et l'activation du récepteur de l'EGF. Les souris BPK homozygotes (souris balb/c présentant une mutation spontanée induisant un équivalent murin de la PKR) développent des kystes rénaux et décèdent d'insuffisance rénale terminale à J24 en moyenne en l'absence de traitement. Elles présentent également des manifestations extrarénales de la maladie avec (entre autres) des ectasies biliaires. Les souris hétérozygotes ont un phénotype normal. Dans cette étude, des animaux homozygotes, hétérozygotes et des souris témoins (tous les descendants de croisements entre hétérozygotes) ont été traités (injection intra-péritonéale) de J7 à J22 par des doses comprises entre 25 et 100 mg/kg tous les trois jours de EKI-785. L'analyse morphologique (évaluation d'un index reflétant l'activité kystique dans les tubules collecteurs) des reins des animaux homozygotes a montré que la fréquence des kystes diminue proportionnellement

avec l'augmentation de la dose administrée, aucune toxicité n'étant observée même avec la plus forte dose. Le traitement a par ailleurs eu un effet significatif sur les lésions morphologiques biliaires.

Le traitement des animaux témoins a induit une augmentation de 10% du poids corporel et de 8% du poids des reins des animaux mais le ratio poids rénal/poids corporel restait inchangé alors qu'il était significativement diminué (-20%) chez les souris présentant la maladie. Ceci démontre qu'il ne s'agit pas d'un simple effet sur la croissance mais bien d'une action spécifique sur la masse rénale. La dose de 90 mg/kg a ensuite été utilisée pour l'étude de la survie des souris qui ont été traitées jusqu'à J46 ou jusqu'à leur décès. La survie moyenne des souris homozygotes traitées par EKI-785 était de 46 ± 4 jours, significativement supérieure à celle des souris non traitées ($23,5 \pm 3$ jours) et leur index d'activité kystique était inférieur de 60% à celui des animaux non traités. Toutes les souris témoins ont survécu au-delà de J48. Le traitement a également induit un déplacement de la localisation prédominante des kystes chez les souris présentant la PKR : les souris homozygotes non traitées présentaient 90% de kystes dans le tubule collecteur au moment du décès alors que les souris traitées par EKI-785 avaient autant de lésions dans le tubule proximal que dans les tubules collecteurs. Chez quatre souris homozygotes, le traitement a été maintenu jusqu'à J46 puis interrompu. Après J46, la courbe d'évolution des lésions rénales a rejoint le profil de celle des animaux non traités et 18 jours après l'arrêt du traitement tous étaient décédés avec d'importantes lésions kystiques rénales.

Enfin, la fonction rénale (évaluée par le dosage de l'urée et de la créatininémie) ainsi que le pouvoir de concentration des urines des souris homozygotes traitées jusqu'à J46 était significativement meilleurs que celui des souris homologues non traitées et non significativement différents des souris témoins.

Cette étude montre, en conclusion, que le traitement de souris présentant la forme murine de la PKR à l'aide d'un inhibiteur du récepteur de l'EGF permet d'observer une diminution significative de la formation et de la croissance des kystes, le maintien de la fonction rénale, une diminution de l'incidence des lésions biliaires et un allongement significatif de la durée de vie des animaux.

Les mécanismes reliant la mutation du ou des gènes responsables de la PKR (chez l'homme ou l'animal) aux anomalies fonctionnelles du récepteur de l'EGF ne sont pas connus. Il s'agit néanmoins d'une caractéristique phénotypique commune aux modèles murins ou humains de la maladie bien que les gènes concernés ne soient pas identiques. La surexpression du récepteur de l'EGF dans les cellules épithéliales kystiques représente une cible intéressante pour une intervention thérapeutique d'autant que la concentration de EKI-785 efficace pour inhiber la prolifération épithéliale est quatre à douze fois inférieure dans ces cellules par rapport aux cellules normales in vitro.

Si l'on imagine traiter les enfants présentant des formes sévères de la maladie, il reste néanmoins essentiel de déterminer quels sont, chez l'homme, les modalités thérapeutiques idéales. En effet, on ne sait pas à quel moment (in utero ou après la naissance) l'activation tyrosine-kinase dépendante du récepteur de l'EGF devient un facteur déterminant dans l'apparition des kystes. De plus, au stade précoce du développement des tubules, la présence d'EGF urinaire pourrait être indispensable à la maturation des tubes collecteurs.

Adresse de correspondance :

C. Bagnis, MD
Renal Unit, 8th floor
Massachusetts General Hospital East
149, 13th street
Charlestown 02129, MA (USA)



Références

1. Sweeney WE, Chen Y, Nakanishi K, Frost P, Avner ED. Treatment of polycystic kidney disease with a novel tyrosine kinase inhibitor 1. *Kidney Int* 2000; 57: 33-40.
2. Woo DD, Miao SY, Pelayo JC, Woolf AS. Taxol inhibits progression of congenital polycystic kidney disease. *Nature* 1994; 368: 750-3.
3. Martinez FR, Cowley BD, Gattone VH II, Nagao S, Yamaguchi T, Kaneta S, Takahashi H, Grantham JJ. The effect of paclitaxel on the progression of polycystic kidney disease in rodents. *Am J Kidney Dis* 1999; 29: 435-44.
4. Richards WG, Sweeney WE, Yoder BD, Wilkinson JE, Woychik RP, Avner ED. Epidermal growth factor receptor activity mediates renal cyst formation in polycystic kidney disease. *J Clin Invest* 1998; 101: 935-9.
5. Neufeld TK, Douglass D, Grant M, Ye M, Silva F, Nadasdy T, Grantham JJ. In vitro formation and expansion of cysts derived from human renal cortex epithelial cells. *Kidney Int* 1992; 41: 1222-36.
6. Munemura C, Uemaso J, Kawasaki H. Epidermal growth factor and endothelin in cyst fluid from autosomal dominant polycystic disease cases. *Am J Kidney Dis* 1994; 24: 561-8.
7. Klingel R, Dippold W, Storkel S, Meyer ZVM, Buschenfelde KH, Kohler H. Expression of differentiation antigens and growth-related genes in normal kidney autosomal dominant polycystic kidney disease and renal cell carcinoma. *Am J Kid Dis* 1992; 19: 22-30.
8. Murcia NS, Sweney WE Jr, Avner ED. New insights into the molecular pathophysiology of polycystic kidney disease. *Kidney Int* 1999; 55: 1187-97.
9. Sweeney WE, Futey L, Frost P, Avner ED. In vitro modulation of cysts formation by a novel tyrosine kinase inhibitor. *Kidney Int* 1999; 56: 416-23.

● Rôle des éosinophiles dans les rejets aigus et chroniques d'allogreffes

Les lymphocytes CD4⁺ jouent un rôle crucial dans le rejet d'allogreffe. Premièrement, par leur production de cytokines, ils permettent la prolifération et la différenciation des lymphocytes CD8⁺ en cellules cytotoxiques qui sont souvent à l'origine du rejet aigu d'allogreffe¹. Deuxièmement, ils procurent les cytokines nécessaires aux lymphocytes B pour la production d'allo-anticorps. Les allo-anticorps sont impliqués dans les lésions de vasculopathie du transplant.² Troisièmement, les lymphocytes CD4⁺ peuvent se différencier eux-mêmes en cellules cytotoxiques à l'égard des tissus cibles qui expriment des allo-antigènes de classe II.¹ Cette activité cytotoxique est consécutive aux interactions, principalement, entre le ligand de Fas, présent sur les cellules T CD4⁺ activées et la molécule Fas, présente sur la

plupart des cellules de l'organisme. Alors que de nombreuses études ont évalué le rôle de la cytotoxicité des lymphocytes CD8+ ou CD4+ dans le rejet aigu d'allogreffe, peu d'études se sont intéressées à la participation d'autres cellules stimulées par les lymphocytes CD4+.

Lors de leur sensibilisation par un allo-antigène, les lymphocytes CD4+ se différencient soit en lymphocytes Th1 (T *helper* 1 pour T auxiliaire 1), qui produisent de l'IFN- γ et du TNF- α , soit en lymphocytes Th2 qui produisent de l'interleukine (IL)-4 et de l'IL-5. Les cellules Th1 peuvent recruter, au sein du greffon, des macrophages activés qui sont capables de léser le transplant par l'intermédiaire de la production d'enzymes protéolytiques ou de radicaux libres. Par ailleurs, les lymphocytes Th2 possèdent aussi la propriété d'induire un rejet de greffe de peau ou de cœur chez la souris.³⁻⁵ Dans ce cas, le rejet de greffe s'accompagne d'une infiltration du greffon par des éosinophiles. Des observations cliniques plus anciennes rapportent la présence d'IL-5 et d'éosinophiles activés dans des biopsies de rejets aigus ou chroniques de greffes hépatiques, rénales et cardiaques.⁶⁻¹¹ Souvent, l'épisode de rejet est précédé d'une hyperéosinophilie sanguine.¹²

La présence d'éosinophiles au sein des tissus requiert la production d'IL-5 par les lymphocytes CD4+.¹³ Cette cytokine est impliquée tant dans la croissance que la différenciation et le recrutement des éosinophiles au sein des tissus. L'activation des éosinophiles est responsable de lésions tissulaires par la libération de médiateurs cytotoxiques tels que la protéine cationique des éosinophiles (ECP) et d'autres protéines basiques, ainsi que des radicaux libres. Le rôle effecteur des éosinophiles a été bien mis en évidence par leur capacité à éradiquer des tumeurs chez la souris.¹⁴ Toutefois, le rôle causal des éosinophiles dans le processus de rejet d'allogreffe n'a pas été établi. Nous avons évalué le rôle des éosinophiles et de l'IL-5 dans des modèles de rejet aigu et chronique d'allogreffe.^{15,16}

Nous avons tout d'abord utilisé un modèle de greffe de peau dans une combinaison de souris qui ne diffèrent que pour les antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II. Dans cette combinaison, les souris C57Bl/6 rejettent de façon aiguë des greffons cutanés provenant de souris bm12. Les greffons rejetés contiennent un infiltrat riche en éosinophiles et sont le site d'une production abondante d'IL-4 et d'IL-5, démontrée par amplification génique. Les mêmes cytokines étaient retrouvées dans les surnageants de cultures lymphocytaires mixtes en présence des antigènes du donneur.

Afin d'évaluer le rôle de l'IL-5 dans ce type de rejet, nous avons d'abord greffé des souris C57Bl/6 génétiquement déficientes en IL-5. Dans ces conditions, nous avons observé un retard significatif du rejet, indiquant que l'IL-5 et les éosinophiles jouent un rôle effecteur dans ce processus. Les greffons rejetés ne contenaient pas d'éosinophile. Sachant que les souris déficientes en IL-5 conservent une activité cytotoxique normale, il est fort probable que les lymphocytes CD4+ cytotoxiques soient responsables du rejet tardif des greffons. Dès lors, nous avons étudié le rôle de l'IL-5 et des éosinophiles en utilisant des souris dont les lymphocytes CD4+ sont incapables de générer une activité cytotoxique en raison d'une déficience dans l'expression du ligand de Fas. Malgré cette déficience, plus de 80% des transplants sont rejetés de façon aiguë. Les greffons étaient massivement infiltrés par des éosinophiles. Le rejet aigu était prévenu par l'administration d'anticorps monoclonal bloquant l'IL-5. Cette observation nous a permis de conclure que l'IL-5 et les

éosinophiles représentent un mécanisme effecteur à lui seul capable d'induire un rejet aigu de greffe.

Nous avons observé précédemment, dans la même combinaison de souris, que des injections multiples d'anticorps monoclonal anti-CD3 permettaient d'éviter le rejet aigu. Toutefois, tous ces greffons présentaient des signes histologiques de rejet chronique du transplant caractérisés par : 1) un infiltrat inflammatoire riche en polynucléaires éosinophiles; 2) une fibrose du derme et 3) des lésions d'occlusion des vaisseaux du transplant, d'aspect semblable à celles observées lors de rejets chroniques de greffons humains. Dans un premier travail,¹⁷ nous avons montré que les anticorps n'étaient pas impliqués dans ce modèle de rejet chronique. En effet, des souris dépourvues d'immunoglobulines développaient un rejet chronique de greffe de peau bm12 semblable à celui qui a été observé chez des souris sauvages.

Dans un deuxième travail,¹⁶ par technique de PCR d'abord conventionnelle ensuite quantitative, nous avons montré que les greffons rejetés chroniquement étaient le siège d'une production soutenue d'ARN messager codant pour l'IL-4 et l'IL-5. Le même profil de cytokines était observé en culture mixte lymphocytaire en présence des antigènes du donneur. Ensuite, nous avons étudié *in vivo* le rôle de l'IL-4, de l'IL-5 et des éosinophiles dans la pathogénie du rejet chronique. L'administration d'anticorps monoclonal neutralisant l'IL-4 prévenait aussi bien l'infiltrat à éosinophiles et les lésions de fibrose du greffon que les lésions de vasculopathie. De façon intéressante, la neutralisation de l'IL-5 était sans effet sur le développement de la vasculopathie du transplant, mais s'accompagnait d'une disparition de l'infiltrat à éosinophiles et de la fibrose interstitielle.

Trois conclusions peuvent être tirées des données observées dans ce modèle de rejet chronique :

1. L'IL-5 et les éosinophiles sont les effecteurs des lésions de fibrose interstitielle. Nous avons montré que cette fibrose est associée à la production par les éosinophiles de TGF- β 1, une cytokine directement impliquée dans les processus de fibrose.^{18,19}
2. L'IL-4 est indispensable, au même titre que l'IL-5, au développement de la fibrose interstitielle et de l'infiltrat à éosinophiles. Plusieurs interprétations sont possibles. En effet, l'IL-4 est un facteur de croissance pour les lymphocytes CD4+ de type Th2, eux-mêmes producteurs d'IL-5.²⁰ En outre, l'IL-4 induit la production d'éotaxine par les cellules épithéliales, une CC-chimiokine indispensable au recrutement et à la survie des éosinophiles dans les tissus.^{21,22}
3. L'IL-4, indépendamment de l'IL-5 et des éosinophiles, est responsable des lésions de vasculopathie. Plusieurs hypothèses soutiennent le rôle pathogénique de l'IL-4 dans la genèse des lésions vasculaires. L'IL-4 induit l'expression de molécules d'adhérence telles que VCAM-1 à la surface des cellules endothéliales, ce qui permet l'adhésion leucocytaire.²³ L'adhérence des leucocytes activés initie la lésion vasculaire, permettant à différents facteurs de croissance d'atteindre la média du vaisseau, entraînant la prolifération des cellules musculaires lisses. Ce phénomène est important car l'administration d'anticorps dirigés contre les molécules d'adhérence prévient aussi la vasculopathie du transplant.²⁴ L'IL-4 est également un facteur de croissance agissant de façon directe sur les cellules musculaires lisses des vaisseaux.²⁵ Or,

la lésion d'endartérite proliférative se constitue précisément à partir d'une prolifération et d'une migration des cellules musculaires lisses depuis la média jusque dans l'intima des artères.²⁶

Quelles pourraient être les implications de ces résultats en transplantation rénale chez l'homme? Tout d'abord, il nous semble intéressant d'évaluer de façon plus systématique l'importance de la réponse Th2-IL-5-éosinophiles, tant dans les rejets aigus que dans les rejets chroniques. Au plan technique, il faut s'assurer que le prélèvement histologique soit fixé dans du formol et non dans un fixateur acide et utiliser une coloration à l'hématoxyline-éosine qui permet de visualiser les granules rouges caractéristiques des éosinophiles. Cette voie effectrice doit être recherchée particulièrement dans les greffons présentant une ou deux incompatibilités HLA-DR ainsi qu'un nombre restreint d'incompatibilités HLA-A ou HLA-B. En effet, les réponses des cellules CD8+ anti-CMH de classe I sont capables d'inhiber la génération de cellules Th2 alloréactives.³ Cibler une population de patients qui ont été sevrés d'un traitement aux corticoïdes pourrait être intéressant, car cet immunosuppresseur constitue un puissant inhibiteur des éosinophiles. En effet, les corticostéroïdes inhibent NF- κ B dont la sous-unité p50 est absolument requise pour la production d'IL-5 par les lymphocytes CD4+.²⁷

Remerciements

Les auteurs remercient vivement la Société de Néphrologie ainsi que la Société de Transplantation pour les bourses de recherche qui ont été octroyées au Dr Alain Le Moine.

Auteurs

Drs A. Le Moine, M. Surquin et D. Abramowicz

Adresse de correspondance:

Drs A. Le Moine, M. Surquin et M. Goldman
Service de néphrologie
Hôpital Erasme
808, route de Lennik
B-1070 Bruxelles
e mail: alemoine@ulb.ac.be



Références

- Rosenberg AS, Singer A. Cellular basis of skin allograft rejection: An in vivo model of immune-mediated tissue destruction. *Ann Rev Immunol* 1992;10: 333-58.
- Russell PS, Chase CM, Winn HJ, Colvin RB. Coronary atherosclerosis in transplanted mouse hearts. II. Importance of humoral immunity. *J Immunol* 1994;152: 5135-41.
- Chan SY, DeBruyne LA, Goodman RE, Eichwald EJ, Bishop DK. In vivo depletion of CD8+ T cells results in Th2 cytokine production and alternate mechanisms of allograft rejection. *Transplantation* 1995; 59: 1155-61.
- Matesic D, Valujskikh A, Pearlman E, Higgins AW, Gilliam AC, Heeger PS. Type 2 immune deviation has differential effects on alloreactive CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol* 1998; 161: 5236-44.
- VanBuskirk AM, Wakely ME, Orosz CG. Transfusion of polarized TH2-like cell populations into SCID mouse cardiac allograft recipients results in acute allograft rejection. *Transplantation* 1996; 62: 229-38.
- Foster PF, Bhattacharyya A, Sankary HN, Coleman J, Ashmann M, Williams JW. Eosinophil cationic protein's role in human hepatic allograft rejection. *Hepatology* 1991; 13: 1117-25.
- Martinez OM, Ascher NL, Ferrell L, Villanueva J, Lake J, Roberts JP, Krams SM. Evidence for a nonclassical pathway of graft rejection involving interleukin 5 and eosinophils. *Transplantation* 1993; 55: 909-18.
- Lang T, Krams SM, Berquist W, Cox KL, Esquivel CO, Martinez OM. Elevated biliary interleukin 5 as an indicator of liver allograft rejection. *Transpl Immunol* 1995; 3: 291-8.
- de Groen PC, Kephart GM, Gleich GJ, Ludwig J. The eosinophil as an effector cell of the immune response during hepatic allograft rejection. *Hepatology* 1994; 20: 654-62.
- Ten RM, Gleich GJ, Holley KE, Perkins JD, Torres VE. Eosinophil granule major basic protein in acute renal allograft rejection. *Transplantation* 1989; 47: 959-63.
- Nolan CR, Saenz KP, Thomas CA, Murphy KD. Role of the eosinophil in chronic vascular rejection of renal allografts. *Am J Kidney Dis* 1995; 26: 634-42.
- Foster PF, Sankary HN, Hart M, Ashmann M, Williams JW. Blood and graft eosinophilia as predictors of rejection in human liver transplantation. *Transplantation* 1989; 47: 72-4.
- Kopf M, Brombacher F, Hodgkin PD, Ramsay AJ, Milbourne EA, Dai WJ, Ovington KS, Behm CA, Kohler G, Young IG, et al. IL-5-deficient mice have a developmental defect in CD5+ B-1 cells and lack eosinophilia but have normal antibody and cytotoxic T cell responses. *Immunity* 1996; 4: 15-24.
- Hung K, Hayashi R, Lafond-Walker A, Lowenstein C, Pardoll D, Levitsky H. The central role for CD4+ T cells in the anti-tumor immune response. *J Exp Med* 1998; 198: 2357-68.
- Le Moine A, Surquin M, Demoor FX, Noel JC, Nahori MA, Pretolani M, Flamand V, Braun MY, Goldman M, Abramowicz D. IL-5 mediates eosinophilic rejection of MHC class II-disparate skin allografts in mice. *J Immunol* 1999; 163: 3778-84.
- Le Moine A, Flamand V, Demoor FX, Noel JC, Surquin M, Kiss R, Nahori MA, Pretolani M, Goldman M, Abramowicz D. Critical roles for IL-4, IL-5, and eosinophils in chronic skin allograft rejection. *J Clin Invest* 1999; 103: 1659-67.
- Le Moine A, Flamand V, Noel JC, Fayt I, Goldman M, Abramowicz D. Chronic rejection of major histocompatibility complex class II-disparate skin grafts after anti-CD3 therapy: A model of antibody-independent transplant vasculopathy. *Transplantation* 1998; 66: 1537-44.
- Minshall EM, Leung DY, Martin RJ, Song YL, Cameron L, Ernst P, Hamid Q. Eosinophil-associated TGF-beta1 mRNA expression and airways fibrosis in bronchial asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 17: 326-33.
- Elovic AE, Ohyama H, Sauty A, McBride J, Tsuji T, Nagai M, Weller PF, Wong DT. IL-4-dependent regulation of TGF-alpha and TGF-beta1 expression in human eosinophils. *J Immunol* 1998; 160: 6121-7.
- Kopf M, Le Gros G, Bachmann M, Lamers MC, Bluethmann H, Kohler G. Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses. *Nature* 1993; 362: 245-8.
- Mochizuki M, Bartels J, Mallet AI, Christophers E, Schroder JM. IL-4 induces eotaxin: A possible mechanism of selective eosinophil recruitment in helminth infection and atopy. *J Immunol* 1998; 160: 60-8.
- Sanz MJ, Ponath PD, Mackay CR, Newman W, Miyasaka M, Tamatani T, Flanagan BF, Lobb RR, Williams TJ, Nourshargh S, et al. Human eotaxin induces α 4 and β 2 integrin-dependent eosinophil accumulation in rat skin in vivo: Delayed generation of eotaxin in response to IL-4. *J Immunol* 1998; 160: 3569-76.

23. Ying S, Meng Q, Barata LT, Robinson DS, Durham SR, Kay AB. Associations between IL-13 and IL-4 (mRNA and protein), vascular cell adhesion molecule-1 expression, and the infiltration of eosinophils, macrophages, and T cells in allergen-induced late-phase cutaneous reactions in atopic subjects. *J Immunol* 1997; 158: 5050-7.
24. Russell PS, Chase CM, Colvin RB. Coronary atherosclerosis in transplanted mouse hearts. *Transplantation* 1995; 60: 724-9.
25. Natarajan R, Rosdahl J, Gonzales N, Bai W. Regulation of 12-lipoxygenase by cytokines in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 1997; 30: 873-9.
26. Orosz CG, Pelletier RP. Chronic remodeling pathology in grafts. *Curr Opin Immunol* 1997; 9: 676-80.
27. Yang L, Cohn L, Zhang D, Homer R, Ray A, Ray P. Essential role of nuclear factor kB in the induction of eosinophilia in allergic airway inflammation. *J Exp Med* 1998; 188: 1739-50.

● Clonage et expression fonctionnelle du cotransport Na-HCO₃, acteur majeur de la réabsorption rénale de bicarbonate

Le tube proximal assure la réabsorption de 90% du bicarbonate et de 60% du sodium filtrés par le glomérule. La réabsorption apicale de Na⁺ implique un cotransport Na-glucose et un échangeur Na/H. Sa réabsorption basolatérale est principalement due à la Na,K-ATPase. Le schéma de la réabsorption de bicarbonate est un peu plus complexe. Le bicarbonate filtré est titré par les protons que la cellule sécrète dans la lumière tubulaire par l'échangeur apical Na/H (mais aussi par une pompe à protons); la présence d'une anhydrase carbonique (type IV) dans la lumière catalyse la déshydratation du produit formé en eau et CO₂. La diffusion du CO₂ dans la cellule est suivie d'une réaction inverse, catalysée par une autre anhydrase carbonique (type II), qui aboutit à la formation intracellulaire d'ions bicarbonates. Ces ions HCO₃⁻, formés *de novo*, sont alors réabsorbés par un cotransport Na-HCO₃. Ce transport couple donc la réabsorption basolatérale de sodium et de bicarbonate. La démonstration de la présence de ce cotransport sur la membrane basolatérale du tube proximal de la salamandre *Ambystoma*¹ a révélé le mécanisme membranaire à l'origine de la réabsorption de bicarbonate. Le cotransport Na-HCO₃ a été par la suite mis en évidence dans le tube proximal du mammifère² ainsi que dans d'autres segments du néphron.³ On ne connaît pas d'inhibiteur spécifique du cotransport Na-HCO₃: comme de nombreux transporteurs anioniques, il est sensible aux dérivés stilbéniques.¹⁻³ L'inhibition du cotransport Na-HCO₃ par la triflocine, un diurétique qui n'a été que brièvement utilisé en clinique en raison de ses effets secondaires, a également été rapporté dans un travail de notre groupe qui soulignait la possibilité d'homologies de séquence entre le cotransport Na-HCO₃ et la bande 3 de l'érythrocyte, donc avec les échangeurs Cl/HCO₃.⁴

Initialement démontré dans le rein, le cotransport Na-HCO₃ s'est avéré avoir une large distribution tissulaire. Curieusement, selon le type cellulaire, le sens dans lequel les ions sodium et bicarbonate sont transportés n'est pas le même. De même, le nombre d'ions HCO₃⁻ transférés de part et d'autre de la membrane cellulaire par cycle de transport est également différent: selon le type cellulaire, il est de 2 HCO₃⁻, ou de 3 HCO₃⁻. Ainsi, dans les épithéliums réalisant une sécrétion acide (rein, estomac,

intestin), le cotransport Na-HCO₃ est à l'origine de la réabsorption basolatérale de base en couplant l'efflux d'un 1 Na⁺ pour 3 ions HCO₃⁻, de la cellule vers l'interstitium. Par contre, dans le pancréas, un organe qui sécrète un fluide alcalin (pH aux environs de 8), le cotransport Na-HCO₃ réalise la première étape de la sécrétion alcaline en réalisant l'influx basolatéral de 1 Na⁺ pour 2 HCO₃⁻, de l'interstitium vers la cellule. Le cotransport Na-HCO₃ est aussi présent dans la membrane de nombreuses cellules non épithéliales: il transfère alors 1 Na⁺ pour 2 HCO₃⁻ à l'intérieur de la cellule. Il participe ainsi à la régulation du pH intracellulaire des cellules myocardiques ou certaines fibres musculaires lisses, ou bien limite dans le système nerveux central les variations de pH extracellulaires consécutives à l'activité neuronale. Le cotransport Na-HCO₃ apparaît ainsi comme un système de transport fondamental pour la régulation du pH des compartiments extra- et intracellulaires.

Que le rapport de couplage (ou stoechiométrie) Na⁺: HCO₃⁻ soit de 1Na⁺ pour 3HCO₃⁻ ou de 1 Na⁺ pour 2HCO₃⁻, il est différent de 1. Ceci implique que le transfert transmembranaire de Na⁺ et de HCO₃⁻ s'accompagne d'un courant net ionique. Le cotransport Na-HCO₃ est donc électrogène. La conséquence de cette électrogénicité est que l'activité du cotransport Na-HCO₃ influence la valeur du potentiel de membrane (et en corollaire, l'activité de nombreux canaux ioniques), et réciproquement. Expérimentalement, le sens du transport net ionique réalisé par le cotransport Na-HCO₃ (efflux ou influx des deux substrats du transporteur, l'ion Na⁺ et l'ion HCO₃⁻) se détermine par des mesures de courant ionique ou par des mesures de variation du potentiel de membrane. Il a été proposé qu'un cotransport 1 Na-3HCO₃ serait responsable de l'efflux de Na⁺ et d'HCO₃⁻ dans certaines cellules, tandis qu'un autre cotransport 1 Na-2HCO₃, différent du premier, serait responsable de l'influx de Na⁺ et d'HCO₃⁻ dans d'autres cellules. Cependant, nous avons montré sur le tube proximal d'amphibien qu'il est possible d'inverser l'efflux physiologique de 1 Na⁺ pour 3 HCO₃⁻ en influx de 1 Na⁺ pour 2 HCO₃⁻.⁵ Ces résultats nous ont fait proposer que le cotransport Na-HCO₃ ait une stoechiométrie variable, une hypothèse qui aurait dû être validée ou mise en défaut par des études d'expression fonctionnelle après clonage.

Le clonage du transporteur a mis en échec de nombreuses équipes qui ont tenté de cloner le cotransport Na-HCO₃ à partir du rein de mammifère. C'est en fait à partir d'une librairie de rein de l'amphibien *Ambystoma* que le groupe de W.F. Boron a cloné par expression fonctionnelle l'ADNc du transporteur aNBC (*ambystomaNaBicarbonateCo-transport*).⁶ Le clonage par homologie du cotransport Na-HCO₃ chez d'autres espèces a rapidement suivi. Le clonage de NBC à partir de nombreux organes (coeur, pancreas, cornée, cristallin, prostate, etc.) et de différentes espèces ne montre que très peu de différences par rapport à l'analyse de aNBC. NBC est une protéine constituée de 1035 amino-acides aux extrémités C et N terminales intracytoplasmiques; elle présente dix domaines transmembranaires putatifs et un site consensus de phosphorylation par la protéine kinase A (PKA); cette observation rendrait compte, via une phosphorylation du cotransport Na-HCO₃ par la PKA, de l'effet activateur de l'angiotensine II et de l'endothéline A et l'effet inhibiteur de la PTH sur la réabsorption proximale de bicarbonate. La localisation du gène humain codant pour NBC est au niveau chromosomique 4q2.

Les propriétés de aNBC et rNBC (*ratkidneyNaBicarbonateCotransport*) ont été étudiées après expression fonctionnelle

dans l'ovocyte de Xénope. Ces études ont en particulier confirmé l'électrogénicité du cotransport $\text{Na}^+\text{HCO}_3^-$, sa sensibilité aux stilbènes et sa dépendance stricte à ses substrats (en particulier, le lithium ne peut se substituer au sodium). De façon plus inattendue, elles ont aussi révélé que ce transporteur conduit à un influx de 1 Na^+ pour 2 HCO_3^- dans l'ovocyte,⁷ alors qu'il est responsable de l'efflux de 1 Na^+ pour 3 HCO_3^- hors de la cellule tubulaire proximale rénale (tissu dont est originaire la protéine NBC exprimée dans l'ovocyte).

Une stœchiométrie variable d'un même transporteur semble être désormais une hypothèse plus probable que celle de l'existence de deux transporteurs distincts, et dont la stœchiométrie serait différente. Pour le prouver définitivement, il s'agit de trouver le déterminant (peut-être un facteur cytosolique) qui modifierait la stœchiométrie apparente du co-transport $\text{Na}^+\text{HCO}_3^-$. Cette recherche va sans doute être à l'origine de nombreux travaux. Plus qu'une étrangeté de la biologie, la découverte d'un facteur modifiant la stœchiométrie apparente de NBC pourrait être à l'origine de surprises concernant le fonctionnement d'autres transporteurs couplés. Par ailleurs, les homologues de NBC avec les protéines AE 1, 2 et 3 (anion exchangers) annoncent dès à présent la naissance de la super-famille des transporteurs de bicarbonate: le cotransport K^+HCO_3^- et l'échangeur $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ dépendant du sodium (qui sont, comme le cotransport $\text{Na}^+\text{HCO}_3^-$, présents dans le rein) pourraient appartenir à cette famille et être rapidement étudiés au plan moléculaire.

Adresse de correspondance:

Dr Gabrielle Planelles
INSERM U 467
Faculté de médecine Necker-Enfants Malades
156, rue de Vaugirard
F-75730 Paris Cedex 15



Références

1. Boron WF, Boulpaep EL. Intracellular pH regulation in the renal proximal tubule of the salamander. Basolateral HCO_3^- transport. *J Gen Physiol* 1981; 81: 53-94.
2. Yoshitomi K, Burckhardt B-Ch, Frömter E. Rheogenic sodium-bicarbonate co-transport in the peritubular cell membrane of rat renal proximal tubule. *Pflügers Arch* 1985; 405: 360-6.
3. Planelles G, Anagnostopoulos T. Basolateral electrogenic $\text{Na}^+\text{HCO}_3^-$ symport in the amphibian distal tubule. *Pflügers Arch* 1991; 417: 582-90.
4. Belachgar F, Hulin P, Anagnostopoulos T, Planelles G. Triflocin, a novel inhibitor for the $\text{Na}^+\text{HCO}_3^-$ symport in the proximal tubule. *Br J Pharmacol* 1994; 112: 465-70.
5. Planelles G, Thomas SR, Anagnostopoulos T. Change of apparent stoichiometry of proximal tubule $\text{Na}^+\text{HCO}_3^-$ co-transport upon experimental reversal of its orientation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 7406-10.
6. Romero MF, Hediger M, Boulpaep EL, Boron WF. Expression cloning and characterization of a renal electrogenic $\text{Na}^+\text{HCO}_3^-$ co-transporter. *Nature* 1997; 387: 409-13.
7. Sciortino CM, Romero MF. Cation and voltage dependence of rat kidney electrogenic $\text{Na}^+\text{HCO}_3^-$ co-transporter, rNBC, expressed in oocytes. *Am J Physiol* 1999; 277: F611-F23.

● Rôle fonctionnel de l'isoforme NKCC1 du cotransport $\text{Na}^+\text{K}^+\text{2Cl}^-$

Les cotransporteurs électroneutres $\text{Na}^+\text{K}^+\text{2Cl}^-$ servent au transport transmembranaire électroneutre d'une molécule de Na^+ et de K^+ et de deux molécules de Cl^- . Ces cotransporteurs sensibles aux « diurétiques de l'anse de Henle », comme le furosémide ou la bumétanide, ont été identifiés dans de nombreux types cellulaires, aussi bien d'origine épithéliale que non épithéliale.¹ Les cotransporteurs $\text{Na}^+\text{K}^+\text{2Cl}^-$ localisés dans la membrane apicale des épithélia de type réabsorptif comme les cellules tubulaires rénales, ou dans la membrane basale des épithélia de type sécrétoire comme les cellules intestinales cryptiques, jouent un rôle très important dans les transports transcellulaires de NaCl . Ils sont en général couplés avec des canaux chlorures (situés dans le domaine membranaire opposé à celui du cotransporteur $\text{Na}^+\text{K}^+\text{2Cl}^-$), dont le plus connu est la protéine CFTR. Ils semblent aussi jouer un rôle important dans la régulation des transports ioniques des cellules sécrétrices de K^+ , comme les cellules marginales de l'oreille interne ou les cellules des glandes salivaires. Ces cotransporteurs sont aussi impliqués dans la régulation du volume cellulaire et ont été proposés pour jouer un rôle dans la régulation des transports ioniques au cours de la prolifération.

Deux isoformes du cotransporteur $\text{Na}^+\text{K}^+\text{2Cl}^-$ ont été clonées:¹ l'isoforme NKCC1 (encore dénommée CCC1 ou BSC2) et l'isoforme NKCC2 (CC2 ou BSC1). Ces deux cotransporteurs sont homologues à 58% et sont tous deux sensibles au furosémide et à la bumétanide. Cependant, les profils d'expression de ces deux transporteurs sont très différents. NKCC1 a une expression assez ubiquitaire: il est présent dans le rein au niveau du glomérule et du tubule collecteur médullaire, ainsi que dans de nombreux épithélia de type sécrétoire et dans les lymphocytes et les globules rouges. A l'inverse, l'expression de NKCC2 est restreinte au rein, au niveau des cellules de l'anse ascendante de Henle et de la *macula densa*. Trois isoformes rénales de NKCC2 (isoformes A, B et F) ont été identifiées; la forme B est exclusivement exprimée dans la portion corticale de l'anse ascendante de Henle, l'isoforme A est plus fortement exprimée dans la portion externe de la médulla externe, tandis que la forme F est principalement exprimée dans la portion interne de la médulla externe.

La découverte de mutations dans le gène NKCC2 chez des patients porteurs du syndrome de Bartter a apporté une démonstration éclatante de l'importance fonctionnelle de ce cotransporteur au niveau du rein.² A notre connaissance, il n'a pas été rapporté de mutations de NKCC1 qui soient associées à des maladies génétiques.

Des travaux récents ont montré que des lignées de souris transgéniques invalidées pour le gène murin de NKCC1 (encore dénommé *Slc12a2*) sont sourdes et présentent des troubles de l'équilibre de type secousses/valse. Delpire et coll.³ ont démontré que l'inactivation du cotransporteur *Slc12a2* dans ces souris invalidées, normalement localisé au niveau de l'épithélium sécrétoire de l'oreille interne, est en fait responsable de dommages structurels de cet organe et vraisemblablement d'une diminution de la sécrétion de l'endolymphe. Pace et coll.⁴ ont aussi montré que les souris transgéniques mâles portant des mutations de *Slc12a2* (allèle nul ou délétion de 72 acides aminés du domaine cytoplasmique) présentent une absence de spermatozoïdes sur

des coupes histologiques épидидymaires et une réduction notable du nombre de spermatozoïdes dans leurs testicules. En relation avec ces anomalies histologiques, ces souris invalidées pour le gène *Slc12a2* ne sont pas fertiles. La forte expression du cotransporteur murin *Slc12a2* dans les cellules de Sertoli, responsables de la formation d'un liquide très riche en K^+ (comme dans le cas de l'endolymphe de l'oreille interne) suggèrent aussi de façon indirecte que ce cotransporteur joue un rôle essentiel, par le biais de la composition électrolytique du fluide sécrété, dans la différenciation des cellules germinales.

Ces données récentes obtenues sur de tels modèles de souris invalidées pour l'équivalent murin du gène *NKCC1* ouvrent maintenant de nouvelles perspectives d'études *in vivo* sur la fonction de ce cotransporteur et son implication dans le contrôle du volume cellulaire et de la sécrétion ionique.

Adresse de correspondance :

Dr Alain Vandewalle
INSERM U478
Faculté de médecine Xavier Bichat
BP 416
F-75870 Paris Cedex 18



Références

1. Russel JM. Sodium-potassium-chloride cotransport. *Physiol Rev* 2000; 80: 211-76.
2. 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* 1996; 13: 183-8.
3. Delpire E, Lu J, England R, Dull C, Thorne T. Deafness and imbalance associated with inactivation of the secretory Na-K-2Cl co-transporter. *Nat Genet* 1999; 22: 192-5.
4. Pace AJ, Lee E, Athirakul K, Coffman TM, O'Brien DA, Koller BH. Failure of spermatogenesis in mouse lines deficient in the $Na^+K^+2Cl^-$ cotransporter. *J Clin Invest* 2000; 105: 441-50.

Page 202 blanche