

Les cellules rénales et les interactions cellulaires dans les épithéliums: du gène à la physiopathologie intégrative

22-23 juin 2000

Faculté de Médecine, Necker

Distribution de transporteurs d'électrolytes dans le néphron distal humain

MP Arpin-Bott¹, H Lager², D Löffing-Cuenir², J Löffing², M Knepper³, B Kaissling¹
¹UMR CNRS 7519, Université Louis Pasteur, F-67084 Strasbourg, France ²Institut d'Anatomie, Université de Zurich, Suisse ³National Heart, Lung and Blood Institute, Nashville, USA

Le néphron distal cortical s'étend de la macula densa au tube collecteur. Il est le site d'action de divers diurétiques et d'hormones contrôlant l'excrétion d'électrolytes. Les segmentations fonctionnelle et morphologique du néphron distal ont été étudiées chez le lapin, le rat et la souris. Le présent travail est consacré à la distribution de différents transporteurs le long du néphron distal humain, étudiée par immunofluorescence. Nous avons utilisé des prélèvements en partie saine de pièces de néphrectomies réalisées pour tumeurs de Grawitz. Les transporteurs étudiés sont: le cotransporteur Na-K-2Cl sensible au bumétamide (NKCC), le cotransporteur Na-Cl sensible aux diurétiques thiazidiques (NCC), le canal à sodium épithélial sensible à l'amiloride (ENaC), le canal à eau stimulé par la vasopressine (aquaporine 2, AQP2), l'échangeur Na-Ca (NCX) et l'aquaporine 3 (AQP3). Les anticorps ont été produits chez le lapin et leur spécificité pour les antigènes humains a été testée par Western blot.

L'ensemble du néphron distal a été marqué par un anticorps contre la calbindine.

Distribution de transporteurs apicaux: A l'anse large ascendante (TAL), positive pour le NKCC, fait suite une portion tubulaire positive seulement pour le NCC. Vient ensuite une portion positive pour le NCC et l'ENaC. Nous appellerons la première tubule distal contourné 1 (DCT1) et la deuxième DCT2. Le point où le NCC disparaît et où apparaît l'AQP2 sera considéré comme le début du tubule connecteur (CNT). Le CNT et le tube collecteur cortical sont positifs pour l'ENaC et l'AQP2.

Distribution de transporteurs basolatéraux: le marquage pour le NCX commence à un site plus proximal que le marquage pour l'ENaC. Le AQP3 se trouve dans les mêmes segments que l'AQP2.

Les cellules intercalaires, détectées par un anticorps contre l'ATPase à protons (H⁺-ATPase) sont trouvées dans les segments contenant l'ENaC.

Conclusion: Dans le rein humain la distribution de transporteurs apicaux et basolatéraux du tubule distal est similaire à celle trouvée chez le rat et la souris, et différente de celle du lapin.

ROLE DE LA VILLINE DANS LA DYNAMIQUE DES FILAMENTS D'ACTINE

Athman Rafika, Niewöhner Jens, Ferrary Evelyne*, El Marjou Fatima, Louvard Daniel, Robine Sylvie. UMR 144, Institut Curie, 26 rue d'Ulm, 75248 Paris; *INSERM U426, Faculté Xavier Bichat, 75018 Paris.

La villine est une protéine de liaison à l'actine, localisée dans les microvillosités de la bordure en brosse des entérocytes et des cellules du tubule proximal du rein. *In vitro*, la villine présente deux propriétés dépendantes de la concentration intracellulaire de calcium. Pour étudier *in vivo* le rôle de cette protéine, nous avons généré des souris invalidées (vil^{-/-}) dans lesquelles l'expression du gène de la villine est supprimée par recombinaison homologue. Les souris vil^{-/-} ne présentent pas de pathologie particulière. En revanche des études *in vivo* et *in vitro* montrent que la fragmentation des filaments d'actine en présence de Ca²⁺ est altérée en absence de villine. La perfusion luminale d'anses intestinales avec le Ca²⁺ ionophore A23187 et 10⁻⁷ M Ca²⁺, ou l'application basolatérale de 1 à 10 μM carbachol pendant 20 mn, via l'activation des récepteurs muscariniques, résultent en l'altération du marquage apical de l'actine tout au long des villosités, seulement chez les animaux vil^{+/+}. La disparition du marquage des filaments d'actine a aussi été observée dans des expériences physiologiques de diète/réalimentation. Enfin, l'administration par voie orale d'un agent lésionnel de l'épithélium colique, le dextran sodium sulfate, induit la formation de larges blessures de la muqueuse colique entraînant après 13 jours de traitement, une probabilité de mort deux fois plus grande chez les animaux vil^{-/-} (36 ± 9.6%) comparée aux animaux vil^{+/+} (70 ± 8.8%). Ces résultats suggèrent que *in vivo* la villine n'est pas nécessaire à la mise en faisceau des filaments d'actine F, alors qu'elle est sollicitée pour la réorganisation induite par divers signaux comme les infections, les blessures ou le stress. Nous avons développé 2 modèles de cellules en culture afin d'étudier le rôle de la villine dans la motilité cellulaire, la réparation et la morphogénèse, (1) des cultures primaires d'entérocytes à partir de souris vil^{-/-} et vil^{+/+}, (2) des cellules MDCK Tet Off exprimant la villine de manière inducible. Des études de motilité cellulaire réalisées en vidéomicroscopie montrent que dans les 2 modèles, l'expression de la villine augmente la motilité cellulaire. Des expériences de tubulogénèse, réalisées dans les cellules MDCK, montrent que les cellules exprimant la villine forment de longues structures tubulaires branchées, alors que les cellules n'exprimant pas la villine réalisent une tubulogénèse limitée. Ces résultats nous permettent de proposer une hypothèse selon laquelle la propriété de fragmentation de la villine pourrait jouer un rôle dans la réorganisation du cytosquelette d'actine. Ainsi la villine pourrait être impliquée dans la plasticité cellulaire.

RÉGULATION PAR LES GLUCOCORTICOSTÉROÏDES DE L'EXPRESSION DE BSC1, LE COTRANSPORTEUR $\text{Na}^+\text{-K}^+(\text{NH}_4^+)\text{-2Cl}^-$ DE LA BRANCHE LARGE ASCENDANTE

Amel Attmane-Elakeb¹, Valérie Sibella¹, Catherine Vernimmen¹, Steven C. Hebert², et Maurice Bichara¹

¹ INSERM U.426, I.F.R. Xavier Bichat, Paris, France ; et ² Division of Nephrology and Hypertension, Vanderbilt University, Nashville, USA

BSC1 assure l'absorption de NaCl et NH_4^+ par la branche large ascendante (TAL). Par ailleurs, les hormones glucocorticostéroïdes (HG) ont des récepteurs (GR) dans ce segment du néphron. Nous avons donc apprécié les effets des HG sur l'expression de BSC1 en termes d'ARNm (RT-PCR quantitative) et de protéine (Western blot) dans le segment médullaire de la TAL (MTAL). L'administration pendant 6 j de dexaméthasone (DEX) à des rats surrénalectomisés a augmenté l'abondance de la protéine ($\sim 91\%$; $P < 0.002$) et de l'ARNm ($\sim 43\%$; $P < 0.03$) de BSC1 dans la MTAL. L'application *in vitro* de DEX pendant 2 h a stimulé l'abondance de la protéine ($\sim 37\%$; $P < 0.02$) et de l'ARNm ($\sim 27\%$; $P < 0.04$) de BSC1 dans des MTALs de rat incubées dans un milieu hyperosmotique (~ 450 mOsm) contenant 0.7 nM d'arginine vasopressine (AVP), condition expérimentale reproduisant l'environnement naturel de la MTAL. La stimulation de l'expression de BSC1 par la DEX *in vitro* a aussi été observée dans un milieu isoosmotique contenant de l'AVP (protéine : $+112\%$, $P < 0.0004$; ARNm : $+188\%$, $P < 0.04$), mais pas dans des milieux dépourvus d'AVP. La d-aldostérone (100 nM) n'a eu aucun effet dans ces divers milieux. Nous concluons que l'activation du GR par les HG, à la suite d'interactions avec des facteurs dépendants de l'AMPc, stimule l'expression de BSC1, ce qui contribue aux effets des HG dans les processus de concentration et dilution de l'urine et de régulation rénale de l'équilibre acido-basique.

L'ALBUMINURIE DU DIABÈTE DE TYPE I EST RÉDUITE PAR L'ADMINISTRATION CHRONIQUE D'UN ANTAGONISTE DES RÉCEPTEURS V2 DE LA VASOPRESSINE, CHEZ LE RAT.

Pascale BARDOUX, Nadine BOUBY, Lise BANKIR. INSERM U.367, 17 rue du Fer à Moulin, 75005 Paris

La vasopressine (AVP) augmente fortement au cours du diabète (DM). D'autre part, le DM s'accompagne souvent d'une augmentation du débit de filtration glomérulaire (DFG) et de l'excrétion urinaire d'albumine (EUA). Nous avons précédemment montré 1°) que l'administration de dDAVP (agoniste sélectif des effets V2 antidiurétiques de l'AVP) quadruple l'EUA chez le rat normal, et 2°) que l'augmentation d'EUA associée au DM est nettement plus faible chez des rats génétiquement dépourvus d'AVP que chez des rats témoins. Ces résultats suggèrent que les effets V2 de l'AVP sont impliqués dans l'albuminurie du DM.

Le but de ce travail a été d'étudier l'influence d'une inhibition partielle des effets V2 de l'AVP sur la fonction rénale chez des rats diabétiques (Wistar mâles). A trois semaines de DM (induit par la streptozotocine, 65 mg/kg PC), un traitement chronique par un antagoniste spécifique des récepteurs V2, le SR121463 (anti-V2), a été appliqué à la moitié des rats (DM-T, n = 14). L'anti-V2 a été ajouté à la nourriture, à la dose nécessaire pour abaisser l'osmolalité urinaire (U_{osm}) de chaque rat à $\approx 300\text{-}400$ mosm/kg H_2O ($15\text{-}50$ mg \times kg⁻¹ \times j⁻¹). Les urines ont été recueillies (2 \times 24h) et un prélèvement de sang a été effectué toutes les 2 semaines (S), de S -1 (avant traitement) à S +9. Les rats non traités ont servi de contrôle (DM-C, n = 14). L' U_{osm} , l'EUA, et la clairance de la créatinine (CCréat, index du DFG) ont été déterminés. Les différences entre les 2 groupes (m \pm SEM) ont été comparées par ANOVA.

Résultats : L'anti-V2 a prévenu l'augmentation d'EUA entre S -1 ($2,27 \pm 0,20$ vs $2,22 \pm 0,15$ mg/j chez les DM-T et DM-C, respectivement) et S +9 ($1,82 \pm 0,11$ vs $4,46 \pm 1,12$ mg / j, $p < 0,001$) et a réduit l'hypertrophie rénale ($2,47 \pm 0,10$ vs $2,98 \pm 0,13$ g, $p < 0,01$), mais n'a pas eu d'effet sur CCréat. Parmi les DM-C, l'EUA n'a pas augmenté du tout entre S-1 et S +9 chez 6 rats tandis qu'elle a beaucoup augmenté chez 7 autres (de $2,31 \pm 0,24$ à $6,85 \pm 1,87$ mg/j). Par contre, elle n'a augmenté chez aucun des DM-T. Ces résultats suggèrent 1°) que les effets V2 de l'AVP sont bien impliqués dans l'albuminurie du DM, 2°) que, chez le rat comme chez l'homme, certains individus ont un risque plus grand que d'autres de développer une néphropathie diabétique.

La phosphorylation du canal chlorure CIC-2 de rat par la protéine kinase C inhibe sa fonction.

M. Bali, J. Lipecka, P. Fanen, A. Thomas, A. Edelman & J. Fritsch

Le canal chlorure ubiquitaire CIC-2 appartient à la famille des canaux chlorure voltage dépendant CIC dont le premier membre, CIC-0, a été cloné par Jentsch et al. (*Nature*, 1990, 348, 510) à partir de l'organe électrique de *Torpedo marmorata*.

Il est établi que le courant porté par CIC-2 est régulé négativement par la protéine kinase C (PKC). Toutefois, les mécanismes moléculaires de cette régulation restent à déterminer. Nous nous sommes demandés si la phosphorylation directe du canal pouvait rendre compte de l'inhibition consécutive à l'activation de la PKC par un ester de phorbol, le PMA (500 nM).

Les cellules HeLa, qui n'expriment pas le canal CIC-2, sont transfectées avec un plasmide contenant l'ADNc de CIC-2 de rat ainsi que pour la protéine fluorescente GFP qui permet le repérage des cellules transfectées. Le courant induit par des sauts de voltage hyperpolarisant la membrane à une valeur de -120 mV toutes les minutes pendant une durée de 20 secondes est mesuré par la technique de patch clamp en configuration cellule entière.

Les propriétés d'activation du courant dans les cellules transfectées diffèrent de celles mesurées dans les cellules intestinales T84 : • la cinétique d'activation est plus rapide d'un ordre de grandeur ; • la sensibilité au PMA est baissée et variable ; • une inactivation du courant pendant la durée du saut de voltage apparaît.

Ces propriétés pourraient être expliquées par une activité phosphatase plus élevée dans les cellules HeLa. Nous avons donc répétés ces expériences en présence d'acide okadaïque (200 nM), un inhibiteur des sérine/thréonine kinases. Dans ces conditions, le courant CIC-2 retrouve des propriétés semblables à celles mesurées dans les T84. Le PMA (500 nM) inhibe de 60% l'amplitude du courant. Parallèlement, des expériences de marquage au ³³P ont permis de montrer que la protéine CIC-2 est phosphorylée en l'absence de stimulation et que le niveau de phosphorylation est augmenté par traitement au PMA et à l'acide okadaïque.

IDENTIFICATION DES CANAUX CHLORURES DANS DES CULTURES PRIMAIRES DE NEPHRONS DE REIN DE SOURIS PRESENTANT UNE INACTIVATION GENIQUE POUR LA PROTEINE CFTR.

Hervé Barrière, Michel Tauc, Chantal Poujeol, Philippe Poujeol

Laboratoire de physiologie cellulaire et moléculaire CNRS UMR 6548
Faculté des sciences de NICE Parc Valrose, 06108 Nice cedex 2

Afin de déterminer l'implication de l'expression de la protéine CFTR dans le contrôle des mouvements de Cl^- dans l'épithélium rénal de souris, nous avons identifié les différentes conductances aux ions chlorures présentes dans des cultures primaires de néphrons provenant de souris sauvages (cfr +/+) et de souris dont le gène codant pour la CFTR a été inactivé (cfr -/-). La technique du patch clamp en configuration cellule entière a été appliquée sur des cultures âgées de 4 à 10 jours.

Sur des cultures issues des segments distaux et collecteurs de souris cfr +/+, l'addition de forskoline (10^5 M) induit l'apparition d'un courant dont la relation courant/voltage est linéaire qui est inhibé par l'iode et insensible au DIDS. Sur des cultures issues de rein de souris cfr -/-, l'addition de forskoline ne stimule aucun courant sur aucun des segments. Sur les différents segments mis en culture à partir de souris cfr -/- et cfr +/+ nous avons recherché d'autres conductances Cl^- . L'addition d'ionomycine induit un courant Cl^- rectifiant à la sortie et s'activant au cours de la stimulation. Cette conductance est similaire à la conductance activée par le calcium intracellulaire déjà décrite sur de nombreuses structures épithéliales. Une autre conductance Cl^- sensible à un choc osmotique a également été mise en évidence. Celle-ci possède une relation courant voltage rectifiante à la sortie et s'inactive au cours du temps de la stimulation. Cette conductance semble disparaître pour les souris cfr -/-. La transfection transitoire par un plasmide pIRES-CDS-CFTR sur ces cellules rétablit l'activité du canal CFTR et du canal Cl^- sensible au choc osmotique.

En conclusion, 1) la protéine CFTR s'exprime fonctionnellement dans le rein de souris au niveau des tubules distaux et collecteurs. 2) l'inactivation génique de la protéine induit une disparition de la conductance aux ions chlorures activée par la forskoline et celle sensible au choc osmotique.

EFFET DES RADICAUX LIBRES OXYGÉNÉS SUR LES VOIES ENDOGÈNES DE PERMEATION À L'ION AMMONIUM DANS L'OVOCYTE DE XÉNOPE.

Samia Benammou, Marc Cougnon, Philippe Hulin & Gabrielle Planelles. INSERM U 467. Faculté Necker-Enfants Malades, Paris V.

Nous avons préalablement mis en évidence que la membrane de l'ovocyte de *X. laevis* présente une forte perméabilité à l'ion ammonium, alors que sa perméabilité au NH_3 n'est pas décelable par notre approche expérimentale, basée sur l'électrophysiologie sélective (mesures simultanées des variations, Δ , du potentiel transmembranaire, V_m , et du pH intracellulaire, pHi , lors de l'exposition de la cellule à une solution contenant 20 mM de NH_4Cl , pH 7.4). L'effet des radicaux libres (RL) sur la perméation membranaire à l'ion NH_4 a été évaluée par une approche similaire, après incubation des ovocytes en présence de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2 , 500 μM) de xanthine/xanthine oxydase (X/XO , 50 $\mu\text{M}/50$ mU) de protéine β -amyloïde (β -A, 10 ou 20 μM), ou de *tert*-butyl hydroperoxyde (*t*BHP, 500 μM), ou après photoillumination des solutions de perfusion supplémentées en Rose Bengal (RB, 100 nM).

Les résultats suivants ont été obtenus:

- 1) V_m et pHi sont respectivement de -32.3 ± 3.3 mV et 7.37 ± 0.03 dans les ovocytes témoins ($n=12$). La perfusion de NH_4Cl induit un $\Delta V_m = 35.3 \pm 2.9$ mV et une acidification de $\text{pHi} = 0.43 \pm 0.05$ en 6 min; la variation initiale de pHi en fonction du temps (dpHi/dt) est de 0.08 ± 0.01 UpH/min.
- 2) La préincubation des ovocytes en présence de H_2O_2 ($n=3$) ou de 10 μM β -A ($n=4$) ne modifie pas les paramètres mesurés.
- 3) La préincubation en présence de 20 μM β -A ($n=4$) ou de X/XO ($n=4$) ne modifie pas V_m et pHi ; dans ces conditions expérimentales, la perfusion de NH_4Cl induit sur un ΔpHi et un dpHi/dt significativement augmentés.
- 4) Sous *t*BHP ($n=15$), $V_m = -10.1 \pm 2.6$ mV et $\text{pHi} = 7.16 \pm 0.02$; la perfusion de NH_4Cl induit un $\Delta V_m = 8.7 \pm 2.9$ mV et un $\Delta \text{pHi} = 0.8 \pm 0.1$; $\text{dpHi}/\text{dt} = 0.22 \pm 0.03$ UpH/min. Les effets du *t*BHP sont en partie prévenus par le déferoxamine ($n=3$).
- 5) Lors de l'illumination du RB ($n=10$), V_m se dépoliarise de -28.3 ± 3 à -14.5 ± 1.7 . La perfusion de NH_4Cl induit un $\Delta V_m = 10.9 \pm 1.1$ mV et un $\Delta \text{pHi} = 1.19 \pm 0.11$; $\text{dpHi}/\text{dt} = 0.27 \pm 0.03$ UpH/min. En présence d'histidine ($n=4$), les effets du RB sont moindres.

L'ensemble de ces résultats suggère l'activation par les RL de la conductance cationique non sélective perméable à l'ion ammonium. Les résultats obtenus par voltage imposé à 2 microélectrodes, en présence ou en absence de DPC (un inhibiteur de cette voie de perméation) sont en faveur de cette conclusion.

REGRESSION DE LA FIBROSE RENALE EN PRESENCE D'UN ANTAGONISTE DES RECEPTEURS DE L'ENDOTHELINE (ET) DANS LE MODELE D'HTA PAR CARENCE EN NO

Boffa JJ, Placier S, Dussaule JC, Tharaux PL, Chatziantoniou C
Unité INSERM 489 ; Hôpital Tenon 4 Rue de la Chine 75020 Paris

L'objectif de l'étude était de rechercher si un antagoniste des récepteurs de l'ET, le bosentan (20 mg/kg/j), était susceptible de faire régresser une fibrose rénale constituée. Le modèle choisi a été une souche de souris transgéniques exprimant la luciférase sous le contrôle du promoteur de la chaîne $\alpha 2$ du collagène de type I, rendues hypertendues par une carence en NO. Deux groupes de souris traitées respectivement 20 et 30 semaines par le L-NAME (20 mg/kg/j) ont été comparés à un groupe témoin et à un groupe traité successivement 20 semaines par L-NAME et 10 semaines par l'association L-NAME + bosentan. Le L-NAME a entraîné une élévation de la pression artérielle systolique qui a atteint son maximum en plateau (165 mmHg) après 10 semaines de traitement. L'HTA s'est accompagnée d'une synthèse rénale anormale de collagène I, reflétée par l'augmentation de l'activité luciférase d'un facteur 3,2 et 4 dans les artérioles préglomérulaires, respectivement à 20 et 30 semaines et d'un facteur 8 et 10 dans les glomérules aux mêmes dates. Histologiquement, les signes de sclérose glomérulaire étaient présents à 20 semaines (index de fibrose = 2,77 vs 0,2 chez les témoins) et très marqués à 30 semaines (index à 2,86). Le traitement par bosentan de la 20^{ème} à la 30^{ème} semaine n'a pas eu d'effet sur l'HTA mais a inhibé l'activation du promoteur du collagène I dans les vaisseaux et les glomérules rénaux (1,4X et 2,2X resp. par rapport aux témoins). L'index de sclérose glomérulaire a également régressé dans ce groupe par rapport au groupe sacrifié à 20 semaines (2,02 vs 2,77). En conclusion, dans le modèle d'HTA par carence en NO, la fibrose rénale s'explique au moins en partie par une activité accrue de l'ET rénale. Un antagoniste des récepteurs de ce peptide fait régresser la fibrose rénale constituée malgré son manque d'efficacité sur la pression hémodynamique systémique.

LA PARACELLINE-1 JOUE UN RÔLE MAJEUR DANS LA RÉABSORPTION DE CALCIUM ET DE MAGNESIUM DANS LA BRANCHE ASCENDANTE DE HENLE CHEZ L'HOMME.

Anne Blanchard^{1*}, Xavier Jeunemaître^{1**}, Philippe Coudol^{1**}, Michèle Dechaux², Marc Froissart^{1*}, Michel Paillard^{1*/2}, Pascal Houillier^{1*} Université Pierre et Marie Curie^{*}, INSERM U356^{*}, IFR58^{*}, Laboratoire de Génétique Moléculaire^{**}, CHU Broussais¹, Paris ; CHU Necker², Paris.

La paracelline1 est une protéine pour cellulaire récemment décrite, spécifiquement exprimée chez l'homme aux jonctions serrées paracellulaires de la branche ascendante large. Plusieurs mutations homozygotes du gène de la paracelline1 ont été récemment rapportées associées à un syndrome rare, l'hypomagnésémie hypercalciurique familiale (HHS). Cependant, aucune étude n'a permis d'établir la perte de fonction de la protéine associée à ces mutations. Nous décrivons les caractéristiques cliniques et biologiques de deux familles porteuses de deux nouvelles mutations (Gly162Ala, Ala139Val). Les réabsorptions de magnésium et de calcium dans la branche ascendante de Henle (TAL) ont été analysées lors de la perfusion de MgCl_2 et de furosémide chez les deux propositus non apparentés atteints du syndrome (HHS), un patient avec une hypomagnésémie d'origine extra rénale (ERH) et deux sujets témoins. Les deux patients atteints avaient un Tm du magnésium (Mg) abaissé par rapport aux autres sujets (HHS : 0.22 et 0.42 mmol/L DFG contre 0.56 pour CS et ERH). L'hypercalciurie présente dans le syndrome persistait après 48h de perfusion de Mg démontrant que la perte rénale de calcium (Ca) n'était pas secondaire à la déplétion en Mg. L'administration aiguë de furosémide induisait une réponse natriurétique et chlorurétique identique à celle observée chez les témoins (stimulation de 6 à 8 fois chez les sujets HHS et de 5 à 6 fois chez les témoins). Cependant, la réponse calciurique et magnésurique marquée chez les sujets contrôles était très faible ou absente chez les patients avec HHS (stimulation de l'excrétion urinaire de Ca et Mg de moins de 0.3 fois chez les sujets HHS contre 2 à 3 fois pour le Ca et de 6 à 9 fois pour le Mg chez les témoins).

EN CONCLUSION : Ces données montrent qu'une mutation de la paracelline 1 s'associe à un défaut de réabsorption de calcium et de magnésium sans anomalie de réabsorption de NaCl, localisée dans la branche ascendante large de Henle site d'expression de la protéine. Elles constituent la première démonstration de la perte de fonction de la protéine dans le HHS et de son rôle essentiel dans le transport rénal de Ca et Mg.

MECANISMES BASOLATERAUX D'EFFLUX D' HCO_3^- DANS LA BRANCHE LARGE ASCENDANTE MEDULLAIRE DE REIN DE RAT

S. Bourgeois, S. Massé, M. Paillard, P. Houillier
INSERM U356, IFR 58, Université P. et M. Curie, Hop. Broussais, Paris
La branche large ascendante médullaire (BLAm) réabsorbe 15 % du bicarbonate (HCO_3^-) filtré. Les transporteurs intervenant dans la sortie basolatérale de HCO_3^- sont encore mal connus sur cellules intactes. Nous avons entrepris leur identification en utilisant la mesure du pHi de BLAm de rat microperfusées in vitro.

Le retrait basolatéral de Cl^- dans un milieu $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ (pHe 7,40), entraîne une alcalinisation cellulaire compatible avec la présence d'un échange $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$. L'alcalinisation est inhibée dans un milieu exempt du tampon $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ et par 0,15 mM de DIDS basolatéral. En l'absence bilatérale de Na^+ et de Cl^- et en présence d'un "voltage-clamp", l'addition basolatérale de Cl^- provoque une acidification cellulaire. Ceci démontre la présence d'un échange $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ basolatéral, électroneutre, indépendant du Na^+ , fonctionnel en situation isoosmotique. Cependant, dans des milieux dépourvus de Cl^- , la diminution de la concentration basolatérale de HCO_3^- de 23 à 3 mM (et du pHe de 7,4 à 6,6) induit une diminution réversible du pHi , significativement inhibée par 0,15 mM de DIDS basolatéral. En revanche, aucun effet du DIDS n'est observé quand la même diminution du pH basolatéral est effectuée en l'absence de $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$, ce qui montre la présence d'un autre transport de HCO_3^- , indépendant du Cl^- et sensible au DIDS. Le retrait basolatéral du Na^+ induit une baisse du pHi , totalement insensible à la présence de DIDS, expliquée par une inhibition de l'activité basolatérale d'échange Na^+/H^+ . L'augmentation de la concentration basolatérale de K^+ (4 à 40 mM) induit une alcalinisation cellulaire réversible, inhibée à 55 % par 2 mM de baryum basolatéral, démontrant l'électrogénicité de cette seconde voie. Ce transport est inhibé à 53 % par le DPC, à 65 % par le NPPB et à 70 % par 0,15 mM de DIDS basolatéral et stimulé de 40 % par 0,1 mM de 8BrAMPC. En conclusion, il existe au moins 2 voies distinctes d'efflux basolatéral d' HCO_3^- dans les cellules de BLAm de rat, un échange $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ électroneutre et une voie de sortie électrogénique ayant des caractéristiques pharmacologiques proches de celles du CFTR. Par analogie avec d'autres épithélium, ce transport électrogénique pourrait directement contribuer à l'efflux de HCO_3^- , ou réguler l'activité de l'échange $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ en assurant un efflux de Cl^- .

CONTRÔLE DE LA TRANSCRIPTION DU GÈNE CFTR PAR LES FACTEURS GATA ET NF- κ B.

F. Brouillard, T. Leclerc, M. Baudouin-Legros, M. Bouthier, A. Edelman. INSERM U. 467, Faculté de Médecine Necker, 156 rue de Vaugirard, 75730 Paris Cedex 15.

Le produit du gène impliqué dans la mucoviscidose, le gène CFTR, est un canal chlore dont l'expression est limitée à certaines cellules épithéliales. Les manifestations inflammatoires associées à la mucoviscidose ont été récemment corrélées à l'activation constitutive d'un facteur de transcription contrôlant l'expression de gènes impliqués dans la réponse immunitaire et inflammatoire, NF- κ B. Deux observations permettent d'envisager que cette activation du système NF- κ B dans les cellules CF puisse conduire à une modulation de l'expression du gène CFTR : (i) le gène CFTR, contient dans sa partie 5' non transcrite une séquence de nucléotides susceptible de lier le facteur NF- κ B, (ii) les cytokines pro-inflammatoires activatrices du système NF- κ B (TNF α et IL1) modulent l'expression du gène CFTR.

Pour tester cette hypothèse, nous avons mené l'étude *in vitro* des interactions ADN-protéines (gel retard, interférence par méthylation) dans la région κ B du promoteur CFTR et complété cette étude par une analyse fonctionnelle de l'activité du promoteur (transfection de vecteurs associant le promoteur de CFTR au gène rapporteur luciférase).

Les résultats montrent que NF- κ B peut activer l'expression du gène CFTR. En effet, la surexpression des sous-unités p50 et p65 de NF- κ B dans les cellules d'origine épithéliale (T84 et Calu-3) induit une augmentation significative des ARNm CFTR détectés par Northern blot. L'analyse par gel retard des interactions ADN-protéines au niveau de la région (-1111/-1076) de CFTR révèle la présence d'un élément de réponse κ B. Ces résultats montrent aussi la présence d'un site de liaison pour un facteur de transcription de type GATA. L'étude des propriétés transcriptionnelles de cette région suggère que les éléments κ B et GATA pourraient être fonctionnels dans le contexte du promoteur CFTR.

Ces résultats expérimentaux permettent de compléter les données sur la régulation de l'expression du gène CFTR dans un contexte inflammatoire. Sachant que certains membres de la famille GATA (GATA-4, 5 et 6) sont impliqués dans la différenciation des cellules épithéliales, l'implication de ces facteurs dans le contrôle de l'expression du gène CFTR dans les épithéliums pourrait être envisagée.

LA X,K-ATPASE DE LA VESSIE DE *BUFO MARINUS* EFFECTUE UN TRANSPORT GLOBALEMENT ELECTRONEUTRE.

Muriel Burnay, Udo Hasler, Käthi Geering, Jean-Daniel Horisberger. Institut de Pharmacologie et de Toxicologie de l'Université de Lausanne, Bugnon 27, CH-1005 LAUSANNE.

La X,K-ATPase de vessie de *Bufo marinus* est une P-ATPase proche de la Na,K-ATPase et de la H,K-ATPase gastrique, et représente l'homologue amphibien de l'enzyme connue sous le nom de H,K-ATPase colique du rat ou de l'ATPAL1 de l'homme. Elle effectue le transport d'ions K⁺ vers l'intérieur de la cellule en échange du transport de proton, et, comme démontré plus récemment d'ions Na⁺, vers l'extérieur de la cellule. La stoechiométrie de cet échange n'est toutefois pas encore connue. Nous avons étudié les propriétés électrogènes de l'activité de la X,K-ATPase exprimée dans l'ovocyte de *Xenopus* par co-injection de la sous-unité α de la X,K-ATPase de la vessie de *Bufo* avec une sous-unité β clonée à partir du même tissu ($\beta_{bladder}$). Les Na,K-ATPases endogènes de l'ovocyte étaient inhibées par une faible concentration d'ouabaine (0.2 μ M). A un potentiel imposé de -50 mV, l'activation de la X,K-ATPase par l'adjonction de K⁺ (5 mM) résultait en l'apparition relativement lente d'un courant négatif (entrant) qui atteignait une amplitude de 5 à 20 nA après 1-2 minutes. Ce courant était complètement inhibé par l'ouabaine à 2 mM, en présence de 5 mM de K⁺. La courbe I/V du courant sensible à l'ouabaine montrait une légère rectification vers l'intérieur avec un potentiel d'inversion situé entre 0 et +10 mV. Lorsque les mêmes mesures étaient réalisées après passage dans une solution contenant 25 mM de HCO₃⁻ et une PCO₂ de 40 mmHg, le courant négatif activé par le K⁺ était fortement réduit. Avec des oocytes non-injectés, l'alcalinisation intracellulaire induite par l'exposition à une solution dépourvue de CO₂/HCO₃⁻ après une incubation de 4 h dans une solution contenant 25 mM de HCO₃⁻ et une PCO₂ de 40 mmHg activait un courant qualitativement semblable. Nous en concluons que l'activité de la X,K-ATPase n'est pas intrinsèquement électrogène, mais que l'alcalinisation intracellulaire entraînée par cette activité, est responsable de l'activation d'un courant entrant, dont la nature reste à déterminer.

ETUDE PAR SPECTROSCOPIE RMN DU CARBONE 13 DE LA NEPHROTOXICITE DE LA CEPHALORIDINE IN VITRO

S. Cadi-Sousi, G. Baverel, G. Martin

Centre d'Etudes métaboliques par SRM, INSERM U499, Hôpital E. Herriot, Lyon, France.

La céphaloridine est un antibiotique de la famille des β -lactamines, retiré du commerce, à cause de sa forte néphrotoxicité. Bien que la céphaloridine soit très souvent utilisée comme une substance néphrotoxique modèle, son mécanisme d'action toxique reste mal compris. Sur la base d'une diminution de la consommation d'oxygène, une toxicité mitochondriale a été invoquée.

Afin de tenter d'améliorer la connaissance de son action toxique, des tubules proximaux de lapin ont été incubés en présence de céphaloridine (5mM) et de succinate (5 mM) marqué au carbone 13 sur ses carbones internes. La céphaloridine provoque une libération accrue de LDH, témoignant de sa cytotoxicité. En outre, elle provoque une faible diminution de l'utilisation de succinate mais une augmentation importante de l'accumulation de malate et de fumarate. Ces effets sont accompagnés d'une forte inhibition de la synthèse de glucose et d'un accroissement du rapport lactate sur pyruvate suggérant une inhibition de la respiration mitochondriale. Les données enzymatiques, de RMN du carbone 13, combinées à une modélisation mathématique des voies du métabolisme du succinate permettent de quantifier de façon précise l'influence de la céphaloridine sur les flux au niveau des enzymes impliquées dans ce métabolisme.

L'ACTIVITE DE NHE3 ET SA REGULATION PAR L'ANGIOTENSINE II DEPENDENT DE L'INTEGRITE DU CYTOSQUELETTE D'ACTINE.

D. du Cheyron, C. Chalumeau, N. Defontaine, #O. Kellermann, M. Paillard, J. Poggioli. INSERM U356, IFR 58, Université Paris VI; # Laboratoire de Différenciation Cellulaire, Institut Pasteur, Paris, France.

L'échangeur NHE3, présent dans la membrane luminale et dans un compartiment sous-apical des cellules du tubule proximal, est régulé en partie par des phénomènes d'exo/endocytose. Dans ce travail, nous avons étudié le rôle fonctionnel du cytosquelette d'actine sur l'activité NHE3, dans les conditions normales ou après stimulation par l'angiotensine II (ANG II).

L'activité NHE3 a été mesurée par la vitesse initiale de capture de ²²Na sensible à 100 μ M EIPA sur une fraction enrichie en vésicules de membranes lumineuses isolées à partir d'une suspension de tubules corticaux de rein de rat (LMV). L'abondance de la protéine NHE3 a été étudiée en western blot. Une approche complémentaire a été réalisée sur une culture de cellules de cortex de rein de souris qui expriment NHE3 (MKCC). Dans ce cas, la protéine NHE3 a été étudiée par western blot après biotinylation des protéines de surface ou par immunofluorescence indirecte en microscopie confocale.

L'incubation d'une suspension de tubules avec la cytochalasine D (cytoD, 1H, 1 μ M), agent dépolymérisant des microfilaments d'actine, produit une stimulation de 42 % de l'activité NHE3 mesurée dans les LMV (4,55 \pm 0,13 vs 3,27 \pm 0,23 nmol/mg prot/10sec pour le témoin, P<0,001). L'affinité apparente de NHE3 pour les protons est inchangée (K_H: 6,44 \pm 0,03 vs 6,47 \pm 0,05 pour le témoin), mais l'abondance de la protéine NHE3 augmente dans les LMV (60 \pm 8 %, P<0,001) sans modification de la quantité totale de NHE3 présente dans l'homogénat. De même, l'incubation des cellules MKCC en présence de cytoD (45mn, 3 μ M) produit une augmentation de l'abondance de la protéine NHE3 dans les membranes apicales (20 \pm 1 %, P<0,001). En présence d'ANG II (45mn), l'expression membranaire apicale de NHE3 est augmentée (63 \pm 12 et 96 \pm 17 % pour 0,1 et 100nM respectivement P<0,001). Cet effet de l'ANG II est supprimé en présence de cytoD. Les résultats sont confirmés par l'analyse morphométrique en microscopie confocale.

En conclusion, les données sont compatibles avec un contrôle de l'activité NHE3, en conditions normales et sous l'effet de l'ANG II, via des phénomènes de trafic intracellulaire qui dépendent pour une part de l'intégrité du cytosquelette d'actine.

L'AMPC ACTIVITE LE CANAL A Na⁺ EPITHELIAL SENSIBLE A L'AMILORIDE, EXPRIME DANS L'OVOCYTE DE XENOPE.

Ahmed Chraïbi¹, M. Schnizler², W. Clauss² et Jean-Daniel Horisberger¹

¹Institut de Pharmacologie et de Toxicologie Université de Lausanne, Bugnon 27, 1005 Lausanne, Suisse. ²Institut für Tierphysiologie der Justus-Liebig-Universität Giessen, Wartweg 95, D-35392 Giessen, Allemagne.

Le canal à sodium épithélial "ENaC" est l'étape clé de la réabsorption du Na⁺ luminal dans le néphron distal, la partie distale du colon et dans les voies aériennes. Afin d'assurer la balance sodique et l'homéostasie du milieu extracellulaire, ce canal doit être régulé de façon bien précise. Plusieurs facteurs extra et intracellulaires sont impliqués dans cette régulation. Au niveau du rein, la vasopressine stimule l'activité et l'expression de ENaC, vraisemblablement via une protéine kinase A (PKA). Cependant, un tel effet n'a pas pu être observé en exprimant l'ARNc des trois sous unités $\alpha\beta\gamma$ du canal de rat dans l'oocyte de Xénope.

Des résultats récents de M. Schnizler et al. (in press) ont montré que l'AMPC activait de 5 à 8 fois le courant sodium sensible à l'amiloride quand la sous unité α ENaC de cobaye (α_c) était coexprimée avec les sous-unités β et γ du rat.

Pour évaluer la sensibilité de ces canaux à PKA, nous avons testé l'effet de l'épinéphrine sur des oocytes exprimant $\alpha_c\beta\gamma$ ENaC et le récepteur β_2 adrénergique humain. Les oocytes coexprimant ce récepteur avec le CFTR ont été utilisés comme témoins. En présence du récepteur β_2 adrénergique, la perfusion de 1 μ M d'épinéphrine augmente fortement la conductance aux chlorures dans les oocytes exprimant CFTR, par contre elle n'a aucun effet sur le courant sodium sensible à l'amiloride sur les oocytes exprimant ENaC. De même, la forskoline active le CFTR mais n'a pas d'effets mesurables sur ENaC. Cependant, un analogue de l'AMPC, le cpt-cAMP, active le courant de Na⁺ dans les oocytes exprimant $\alpha_c\beta\gamma$ ENaC, mais n'a pas d'effet sur le courant de chlorure.

Bien que CFTR et ENaC soient tous deux activés par la voie AMPC / PKA, nos résultats montrent qu'il existe différentes mécanismes d'activation. Ils suggèrent l'existence de différentes isoformes de PKA, d'une compartimentalisation des récepteurs et des effecteurs ou la présence d'une autre voie d'activation de ENaC par le cpt-AMPC.

EXPRESSION NON UNIFORME DE LA SOUS-UNITÉ GAMMA DE LA Na/K ATPASE DANS LE REIN

F. Cluzeaud¹, S.D.J Karlish² et N. Farman¹

¹Inserm U478, Faculté X. Bichat, Paris, France et ²Department of Biological Chemistry, Weizman Institute of Sciences, Rehovoth, Israel.

La Na/K ATPase est une enzyme ubiquitaire, formée de 2 sous-unités α et β . Son expression dans la membrane basolatérale des cellules tubulaires rénales lui confère un rôle important dans la réabsorption transépithéliale du sodium. Une troisième sous-unité, γ , dont la fonction est encore mal connue (modulation de l'affinité pour l'ATP, le Na⁺, le K⁺), est exprimée sélectivement dans le rein. Afin d'orienter la recherche de sa fonction, nous avons examiné, par immunofluorescence, son expression spécifique tubulaire et cellulaire, sur des coupes de rein de rat, en comparaison avec celles de marqueurs spécifiques de l'anse de Henle ou du tubule collecteur. La sous-unité γ est retrouvée essentiellement dans la partie médullaire de la branche large ascendante de l'anse de Henle (mTAL). Une expression faible est également présente dans le tubule proximal et le tubule collecteur cortical. Dans tous ces segments, l'immunomarquage est soit intra-cellulaire, soit à la membrane basolatérale.

Cette spécificité d'expression oriente vers un rôle de la sous-unité γ essentiellement centré sur les fonctions de la Na/K-ATPase de la mTAL.

ÉTUDE FONCTIONNELLE D'UNE PROTÉINE CFTR DOUBLE MUTANTE (R347H+D979A) ASSOCIÉE À UNE MUCOVISCIDOSE SÉVÈRE.

Clain J., Fritsch J., Lehmann J., Goossens M., Edelman A. & Fanen P.

INSERM U468, Hôpital Henri Mondor 94010 Créteil, France.

INSERM U467, Faculté de Médecine Necker 75015 Paris, France.

La mucoviscidose, plus fréquente des maladies autosomiques récessives dans la population caucasienne est due à des mutations dans le gène codant la protéine *Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator* (CFTR). Cette protéine joue un rôle clé dans les transports ioniques épithéliaux et sa fonction la mieux caractérisée est celle d'un canal Cl⁻ AMPC-dépendant. Il existe plus de 900 mutations décrites dans le gène CFTR, parmi lesquelles des génotypes complexes, notamment des double mutants où deux mutations sont localisées sur le même chromosome. Dans ce cas, il est difficile d'évaluer la contribution de chaque anomalie moléculaire au phénotype du patient. Nous étudions actuellement dans un système d'expression hétérologue la protéine CFTR contenant la double mutation R347H/D979A identifiée chez deux jumelles présentant une mucoviscidose sévère. La mutation R347H se trouve dans le TM6, une histidine remplaçant une arginine. La mutation D979A se trouve dans la 3^{ème} boucle cytoplasmique à proximité du TM8, une alanine remplaçant un aspartate. Les deux allèles simples mutants et l'allèle double mutant sont transfectés transitoirement dans des cellules HeLa. La biosynthèse et le degré de maturation de la protéine CFTR sont évalués par immunoprécipitation et *pulse chase*, et la conductance Cl⁻ AMPC-dépendante est étudiée par la technique du patch clamp en configuration *whole cell*.

Les résultats préliminaires montrent que les protéines mutantes D979A et R347H/D979A ont un défaut de maturation alors que la maturation de R347H est complète. La conductance Cl⁻ est fortement diminuée pour les simples mutants R347H (15 ± 6 pA/pF) et D979A (22 ± 18 pA/pF), et nulle pour le double R347H/D979A (2 ± 2 pA/pF) comparée à la protéine sauvage (136 ± 54 pA/pF). Ces résultats suggèrent que la combinaison de R347H et D979A produit un phénotype plus sévère que chaque simple mutant considéré isolément. Nous proposons une étude complémentaire pour déterminer si ce résultat est dû à un simple effet additionnel ou à une interaction directe ou indirecte entre les positions 347 et 979.

SYNTHÈSE DE GLUCOSE DANS LE TUBE PROXIMAL DE REIN HUMAIN

Agnès Conjard, Mireille Martin, Gabriel Baverel et Bernard Ferrier

Laboratoire de Physiopathologie métabolique et rénale

INSERM U499, Faculté de Médecine Laennec, 69372 Lyon cedex 08

Selon certains auteurs le rein humain serait un fournisseur important de glucose dans certains états nutritionnels comme le jeûne. La présence de la glucose-6-phosphatase a été mise en évidence dans tout le tube proximal humain avec une méthode immunohistochimique qui ne permet pas de quantifier cette activité dans les différents segments.

Le lactate et la glutamine, dont les concentrations circulantes sont de 1 et 0.7 mM, seraient pour certains auteurs deux substrats physiologiques de la néoglucogenèse in vivo. Nous avons cherché à savoir si les différentes parties S1, S2 et S3 du tubule proximal ont les mêmes aptitudes à synthétiser du glucose à partir de ces deux substrats. Nous avons pour cela recherché les conditions permettant une microdissection des différents segments après un traitement à la collagénase de tranches de rein humain. Les tranches sont obtenues à partir des zones saines de reins enlevés pour cause de tumeur. Nous avons montré qu'en présence de lactate à la concentration de 1 mM, la synthèse de glucose par chacune des structures S1, S2 et S3 est linéaire pendant au moins 60 minutes. De même la synthèse de glucose à partir de lactate et de glutamine est linéaire avec la longueur des segments S1, S2 et S3. Bien qu'une variabilité interindividuelle existe quant à la synthèse de glucose par chaque segment de néphron, nous pouvons dire que la production de glucose est plus importante dans S2 et S3 que dans le S1 (en moyenne 24, 42 et 54 pico/mm/h pour respectivement S1, S2 et S3). La production de glucose à partir de glutamine 0.75 mM est plus faible qu'à partir du lactate (en moyenne 16, 21 et 26 pico/mm/h pour respectivement S1, S2 et S3).

Ces résultats montrent que le lactate, et, dans une moindre mesure la glutamine, sont des substrats glucoformateurs tout le long du tubule proximal rénal humain. Ils montrent aussi que la synthèse de glucose à partir de ces deux substrats est hétérogène le long de ce segment de néphron humain.

CANAL Na DE TYPE ENaC DANS LA COCHLEE

V. Couloigner^{1,3}, M. Fay², S. Djelidi², N. Farman², B. Escoubet¹,
I. Runembert¹, O. Sterkers³, G. Friedlander¹, Evelyne Ferrary¹

¹INSERM U.426, Fac. X. Bichat, BP 416 Paris Cedex 18. ²INSERM U.478, Fac. X. Bichat, Paris. ³Service d'ORL, Hôpital Beaujon, AP-HP, Clichy.

Dans la cochlée, l'endolymphe est un liquide extracellulaire riche en K et pauvre en Na nécessaire à l'audition et l'équilibration. Le but de ce travail a été de localiser l'ENaC dans cette structure et d'en évaluer le rôle *in vivo*. Les ARN messagers (ARNm) et les protéines des sous-unités α , β et γ de l'ENaC ont été détectés dans le mur latéral de cochlée de rat par RT-PCR et par western blot. Les ARNm de la sous-unité α ont été localisés par hybridation *in situ* dans des structures épithéliales (strie vasculaire, proéminence spirale, limbus spiral) et non-épithéliales (ligament spiral, ganglion spiral). Les ARNm des sous-unités β et γ ne sont présents que dans certains de ces tissus. *In vivo*, le potentiel endocochléaire (EP) a été enregistré chez le cochon d'Inde dans des conditions normoxiques et hypoxiques, après perfusion endolympatique d'inhibiteurs de l'ENaC (amiloride, benzamil) dissous dans une solution riche en K (EL), ou riche en Na (PL). Les inhibiteurs de l'ENaC modifient l'évolution de l'EP lors de la perfusion de PL mais non lors de la perfusion d'EL. Lors d'une hypoxie aiguë expérimentale de 3 min, condition supposée augmenter la concentration endolympatique de Na, le benzamil (solution EL) ne modifie pas l'évolution de l'EP. En conclusion, les sous-unités α , β et γ de l'ENaC sont exprimées dans la cochlée. Une des fonctions de ce canal serait de maintenir une faible concentration de Na dans l'endolymphe.

Le chloroacétaldéhyde, un métabolite néphrotoxique de l'ifosfamide, est métabolisé par le tubule rénal proximal humain.

L. Dubourg, P. Cochat, G. Baverel, C. Michoudet
INSERM U499, Faculté de Médecine R.T.H. Laënnec,
69372 Lyon cedex 08.

L'ifosfamide, médicament anticancéreux alkylant, est responsable d'une toxicité tubulaire proximale. Le chloroacétaldéhyde, un des principaux métabolites de l'ifosfamide, a été incubé avec des tubules rénaux proximaux humains. A partir d'une concentration de 0,5 mM, il apparaît toxique pour ces tubules, provoquant une chute de la concentration cellulaire d'ATP et une importante libération de LDH. Le chloroacétaldéhyde provoque aussi une accumulation de pyruvate et une inhibition de l'utilisation du lactate, de la production de glucose et de l'oxydation du pyruvate formé. Ces effets peuvent être contrés par l'addition de substances contenant un groupement SH (mesna et amifostine). Les résultats montrent aussi que le chloroacétaldéhyde est rapidement métabolisé par les tubules. Des mesures de RMN du carbone 13 montrent que le chloroacétaldéhyde est transformé en chloroacétate qui est peu métabolisé et moins toxique que le chloroacétaldéhyde. Ainsi, le métabolisme du chloroacétaldéhyde par les cellules rénales proximales humaines apparaît comme un mécanisme de détoxication.

CHARACTERISTICS OF A NEW ALDOSTERONE-SENSITIVE RAT CORTICAL COLLECTING DUCT CELL LINE.

S. DJELIDI, M. FAY, F. CLUZEAUD, N. COURTOIS-COUDRY, N. FARMAN and M. BLOT-CHABAUD.
INSERM U478, FACULTÉ DE MÉDECINE X. BICHAT, BP 416, 75870 PARIS CEDEX 18.

The RCCD₁ rat cortical collecting duct (CCD) cell line has been recently characterized in our laboratory. It maintains high transepithelial resistance and specific sensitivities to different hormones in culture. However, this cell line has lost the expression of the mineralocorticoid receptor (MR). In order to get new insights into the mechanism of aldosterone action in the mammalian CCD, we have derived a new aldosterone-sensitive cell line from RCCD₁ cells, designed as RCCD₂. RCCD₂ cells have maintained most of the properties of the RCCD₁ cell line and, in addition, express the MR both at the mRNA and protein levels. ³H-aldosterone binding experiments revealed 30-50 fmol. of MR per mg. of protein. Short-circuit experiments showed a 2-4 increase in short-circuit current (I_{sc}) with aldosterone concentrations as weak as 10⁻⁹ M. This effect was significant 2 hours after aldosterone addition and was still present after 24 hours. This effect was accompanied with a large increase in the amount of mRNA encoding for the α subunit of the epithelial sodium channel and the α_1 subunit of the Na⁺/K⁺/ATPase. In addition, incubation of RCCD₂ cells for 24 hours with aldosterone resulted in the constitution of a latent pool of Na⁺/K⁺/ATPases which could be rapidly recruited by vasopressin, as already described in native CCD obtained by microdissection. On the whole, this new RCCD₂ cell line appears to constitute a good model to study the physiological effects of aldosterone in the CCD.

L'EFFET ANTIPROLIFÉRATIF DE LA BRADYKININE RESULTE D'UNE INTERACTION DE TYPE PROTEINE-PROTEINE ENTRE UNE SEQUENCE ITIM DU RECEPTEUR B2 ET LA PROTEINE PHOSPHATASE SHP2.

Johan Duchêne, Joost P. Schanstra, Christiane Pécher, Jean-Pierre Estève*, Christiane Susini*, Jean-Loup Bascands, Jean-Pierre Girolami
INSERM U388 et *U531, Institut Louis BUGNARD CHU RANGUEIL
31403 TOULOUSE cedex

Nous avons récemment démontré que l'activation du récepteur B2 de la bradykinine (B2R) est associée à une diminution de la phosphorylation sur des résidus tyrosine de la protéine IRS-1 induite par la stimulation du récepteur à l'IGF-1. Cet effet inhibiteur suggère l'intervention d'une tyrosine phosphatase et/ou l'inhibition d'une activité tyrosine kinase. L'existence d'une séquence ITIM (Immunoreceptor Tyrosine based Inhibition Motif) dans la séquence peptidique du récepteur B2 de rat, située autour de la tyrosine 307 laisse envisager une possibilité d'interaction de type protéine-protéine. Dans une première série expérimentale nous avons montré, en utilisant la technologie BIACORE, l'existence d'une interaction spécifique entre un peptide de 15 acides aminés correspondant à la séquence 300-314 du B2R et la protéine phosphatase SHP2. Cette interaction de haute affinité est spécifique de la protéine SHP2 et n'est pas observée avec la tyrosine phosphatase SHP1. L'existence de cette interaction a ensuite été vérifiée sur des lysats de cellules mésangiales de rat. L'analyse en Western Blot d'un immunoprécipité avec un anticorps anti-SHP2 montre la présence du récepteur B2 confirmant ainsi l'existence de l'interaction B2R-SHP2 sur les cellules mésangiales en culture. Nous avons ensuite établi des lignées cellulaires exprimant une forme mutée du récepteur (Y307F) et comparée l'effet de la BK sur la prolifération de cette lignée. La BK induit un effet antiprolifératif d'environ 35 % sur des lignées surexprimant le récepteur sauvage. Cet effet antiprolifératif n'est plus observé sur les cellules exprimant le récepteur muté Y307F.

Ces résultats permettent actuellement de conclure que la BK induit une inhibition de la prolifération cellulaire par un mécanisme qui fait intervenir une interaction directe avec la tyrosine phosphatase SHP2. Il reste maintenant à préciser le mécanisme intime de cette interaction afin de savoir si l'interaction avec SHP2 est associée à une activation de l'activité phosphatase et/ou au recrutement d'un autre partenaire.

L'ÉCHANGEUR Na/H (NHE3) DU TUBULE PROXIMAL EST RÉGULÉ PAR LES PERTURBATIONS CHRONIQUES DE L'ÉTAT ACIDE-BASE, MAIS PAS PAR LES VARIATIONS DES APPORTS SODÉS. D. Eladari, F. Leviel, F. Pezy, M. Paillard and R. Chambrey. INSERM 356. IFR58. Univ. Paris VI. 15-21, rue de l'École de Médecine. 75270 Paris Cedex 06.

L'échangeur Na/H apical, NHE3, joue un rôle majeur dans la réabsorption de NaHCO_3 et de NaCl par le tubule proximal (TP). Le rein répond à des variations chroniques des apports sodés en modifiant la natriurèse mais le rôle du TP dans cette adaptation n'est pas clair. Par ailleurs, il est bien documenté que l'acidose métabolique chronique augmente la réabsorption proximale de HCO_3^- en augmentant l'activité et l'expression de NHE3. En revanche, la réponse du TP à l'alcalose métabolique chronique est controversée. Le but de ce travail était donc d'étudier la régulation chronique de NHE3 dans le TP lors de l'alcalose métabolique induite par l'administration de NaHCO_3 et au cours de modifications des apports de NaCl. Les rats étaient gardés en cage métabolique pendant une période de 6 jours et soumis, soit à un régime carencé en NaCl, soit à une charge en NaCl ou NaHCO_3 . Les rats contrôles étaient soumis à une alimentation normale et avaient libre accès à l'eau. Des vésicules membranaires de bordure en brosse (BBMV) étaient isolées à partir des homogénats de cortex rénal. L'activité Na/H était définie par la capture intravésiculaire de ^{22}Na stimulée par un gradient sortant de H^+ et inhibée par une forte dose d'EIPA (500 μM). L'absence d'effet de 30 μM de HOE 642 démontrait que l'activité d'échange Na/H était représentée uniquement par NHE3 quelles que soient les conditions. Les variations des apports de NaCl ne modifiaient pas l'activité de NHE3 tandis que la charge chronique en NaHCO_3 inhibait la capture de ^{22}Na dans les BBMV de 23 %. L'abondance de la protéine NHE3 dans les BBMV, évaluée par immunoempreinte, n'était également pas modifiée par les variations des apports sodés. Cependant la charge en NaHCO_3 diminuait l'expression de NHE3 dans les BBMV de 58,5 % alors que le cotransport Na-glucose de type 1, une autre protéine de transport membranaire des BBMV, n'était pas affecté. NHE3 du TP s'adapte aux variations chroniques de l'état acide-base, mais pas aux variations des apports sodés. L'adaptation rénale aux apports sodés semble essentiellement impliquer les segments distaux du néphron.

L'HYPERTENSION SODIUM-DEPENDANTE EST AGGRAVÉE PAR LES EFFETS V2 DE LA VASOPRESSINE
Sandrine FERNANDES, Carole NICCO, Lise BANKIR, Nadine BOUBY
INSERM U 367, Paris, France

Nous avons montré précédemment que la vasopressine (AVP), via ses récepteurs V2, stimule la réabsorption de sodium dans le néphron distal en augmentant la transcription et l'activité du canal sodium épithélial dans le canal collecteur cortical. Cet effet, potentiellement antinatriurétique, pourrait favoriser le développement de l'hypertension artérielle sensible au sel. Afin de tester cette hypothèse, des rats mâles Sprague Dawley uninephrectomisés ont reçu un traitement DOCA-sel (DOCA-S) (10 mg DOCA/semaine, s.c. et 2% Na dans la nourriture) associé ou non à l'administration d'un agoniste V2 (dDAVP, 600 ng/j, i.p.) ou d'un antagoniste V2 (SR 121463B, 1 mg/j dans la nourriture) de l'AVP. Ces 3 groupes ont été comparés à un groupe de rats uninephrectomisés ne recevant aucun traitement (Contrôle). N=7-8 par groupe. Un mois après le début des traitements, l'osmolarité urinaire atteint 1680 ± 160 , 820 ± 100 , 430 ± 50 et 950 ± 110 mosm/kg H_2O dans les groupes Contrôle, DOCA-S, DOCA-S+anti-V2, DOCA-S+dDAVP, respectivement. La natrémie n'est pas significativement différente entre les groupes. Le traitement DOCA-S induit une nette augmentation de la pression artérielle (+44 mm Hg). Cet effet hypertenseur est aggravé par la dDAVP (+54 mm Hg) et atténué par l'anti-V2 (+38 mm Hg). Les rats traités par la dDAVP présentent un taux de mortalité élevé (50% contre 0% dans les autres groupes à la semaine 4) et une forte protéinurie (66 ± 16 mg/j contre 17 ± 6 et 16 ± 3 dans les deux autres groupes DOCA-S). Après 8 semaines de traitement, l'hypertrophie du ventricule gauche et l'augmentation de la masse rénale sont plus marquées dans le groupe DOCA-S+dDAVP que dans les groupes DOCA-S et DOCA-S+anti-V2 (ventricule: +50% contre +23% et +20%; rein: +74% contre +33% et +21%). Cette étude montre que les effets V2 de l'AVP contribuent de façon significative à la sévérité de l'hypertension sensible au sel et probablement à la dégradation de la fonction rénale résultant d'une trop forte pression systémique.

EXPRESSION DIFFÉRENTIELLE DE SÉRINE-PROTÉASES DANS LES CELLULES ÉPITHÉLIALES

M Fay,¹ G Vuagniaux², E Hummler², B. C. Rossier², N Farman¹

¹Inserm U478, Faculté X. Bichat, Paris, France et ²Institut de Pharmacologie et de Toxicologie, Université de Lausanne, Lausanne, Switzerland.

Le canal sodium épithélial sensible à l'amiloride (ENaC), exprimé à la membrane apicale des épithéliums à haute résistance électrique (comme le tubule collecteur, l'épithélium colique, les glandes salivaires) est l'étape limitante de la réabsorption transépithéliale du sodium. Une sérine-protéase récemment clonée chez l'amphibien, xCAP1 (channel activating protease1) est un activateur de ENaC agissant par la voie extra-cellulaire (apicale). Son homologue murin (mPR1) et deux autres protéases (mPR2 et mPR3) ont été identifiées. Leur expression, examinée par hybridation in situ, diffère selon les tissus épithéliaux. mPR1 et mPR2 sont fortement exprimées dans le tubule proximal, et peu dans le tubule collecteur; elles sont également retrouvées dans l'épithélium colique et bronchiolaire. L'expression de mPR3 est distincte: elle est restreinte au tubule collecteur rénal et à l'épithélium de surface du colon, et, à un niveau plus faible, aux canaux excréteurs des glandes salivaires et à l'épithélium bronchiolaire. Il apparaît donc que ENaC et mPR3 sont exprimés dans les mêmes cellules, suggérant qu'il s'agit là d'un régulateur physiologique de ENaC chez la souris.

INCUBATION IN TISSUE CULTURE MEDIA ALLOWS ISOLATED PROXIMAL TUBULE TO REGAIN *IN-VIVO*-LIKE RESPONSE OF BICARBONATE ABSORPTION TO NOREPINEPHRINE. Frömter E¹, Kuniimi M², Hara C², Müller-Berger S¹, Samarzija I³, Seki G². ¹Zentrum der. Physiol., Univ. Frankfurt/Main, Germany, ²Dept. of Nephrol. & Endocrinol., Univ. Tokyo, Japan, ³Fac. of Pharmacy & Biochem., Univ. Zagreb, Croatia.

Using a new stop-flow microperfusion technique (Müller-Berger et al, Pflügers Arch 439:208, 1999) which measures changes in luminal pH with the fluorescent dye BCECF, we have studied which substrates or incubation conditions might allow isolated rabbit proximal tubules to attain in-vivo-like rates of HCO_3^- -absorption (J_{HCO_3}) and maximal responses of J_{HCO_3} to norepinephrine (NE). While the tubular lumen was perfused with plasma-like HCO_3^- -Ringer solution, essentially three bath perfusates were tested: 1) plasma-like HCO_3^- -Ringer solution containing 5 mmol/l D-glucose (G-Ringer sol.), 2) the same solution containing in addition 10 mmol/l lactate and 5 mmol/l L-alanine, (LAG-Ringer sol.) and 3) two tissue culture media (DMEM and RPMI 1640). Compared to G-Ringer sol., application of LAG-Ringer sol. (even if present also in the lumen), or application of DMEM or RPMI 1640 in the bath either slightly increased or decreased J_{HCO_3} with borderline significance. However, RPMI 1640 plus 1 mmol/l pyruvate stimulated J_{HCO_3} by 55 %. While in G-Ringer sol. 10^{-5} mol/l NE had no effect, in presence of LAG-Ringer sol. it increased J_{HCO_3} by ≈ 40 %, and in presence of DMEM or RPMI 1640 it increased J_{HCO_3} by ≈ 100 %, i. e. to values similar to those observed in vivo. The stimulation by NE followed Michaelis-Menten kinetics with a K_m value of 0.25 $\mu\text{mol/l}$. It was probably mediated by α_1 -adrenergic receptors, because a similar stimulation was seen with the α_1 -agonist methoxamine, but no effect was seen with the α_2 -agonist clonidine (both at 10^{-5} mol/l). Additional cell pH measurements with BCECF-AM suggest that NE stimulated the basolateral $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ -cotransporter which then became susceptible to inhibition by cAMP. We conclude that tissue culture media allow isolated proximal tubules to maintain a better functional state than the commonly used solutions with unphysiologically high substrate concentrations (LAG-Ringer sol.).

VISUALISATION DES DOMAINES MEMBRANAIRES PAR MICROSCOPIE A FORCE ATOMIQUE (AFM). Christian Le Grimmelc*, Marie-Cécile Giocondi*, Eric Lesniewska** *Centre de Biochimie Structurale, INSERM U414, Montpellier et **Laboratoire de Physique, UA CNRS 5027, Université de Bourgogne, Dijon.

La caractérisation des microdomaines membranaires, assemblages supramoléculaires qui joueraient un rôle essentiel dans la régulation des fonctions membranaires, reste un objectif majeur en biologie cellulaire. Leur composition, taille, forme, mode de formation et de croissance, et leur stabilité restent mal connus. Des résultats récents indiquent que ces microdomaines sont enrichis en sphingolipides et cholestérol et suggèrent que des phénomènes de séparation de phase lipidique soient, au moins en partie, responsables de leur formation. Toutefois la topologie et la croissance des domaines restent à établir, même au niveau des systèmes membranaires modèles en séparation de phases.

Notre travail consiste à caractériser par AFM, à l'échelle mésoscopique, la structure et la topologie des microdomaines in situ, sur les cellules en culture et sur des bicouches lipidiques supportées. La première approche, sur cellules CV-1, a consisté à établir, in situ, la taille des domaines membranaires résistants au traitement à froid par le Triton X-100 (DRMs), un détergent couramment utilisé pour la purification de domaines membranaires. Les résultats obtenus montrent qu'avant isolement, les DRMs ont des dimensions d'un à deux ordres de grandeur supérieures à celles estimées pour les microdomaines des cellules vivantes, suggérant un réarrangement membranaire lors de l'extraction à froid. Ils indiquent également que les DRMs ont des interactions fortes avec le squelette membranaire.

L'examen, dans du PBS, de bicouches supportées en séparation de phase formées de mélanges 3/1 (mole/mole) de dioleoylphosphatidylcholine et de dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) et dimyristoylphosphatidylcholine/DPPC (1/1), montre également l'existence de microdomaines de taille importante, de l'ordre du μm^2 , qui croissent en fonction du temps selon une loi d'association exponentielle simple.

Ces toutes premières données sur la visualisation des domaines à l'échelle mésoscopique soulignent l'intérêt de l'AFM comme nouvel outil d'étude de la structure des membranes.

ETUDE DE LA STRUCTURE SECONDAIRE DU SEGMENT TRANSMEMBRANAIRE H5 DE LA SOUS-UNITÉ α DE LA Na,K-ATPASE PAR MUTAGENÈSE SYSTÉMATIQUE EN CYSTÉINES.

Saida Guennoun et Jean-Daniel Horisberger.

Institut de Pharmacologie et de Toxicologie de l'Université de Lausanne, Bugnon 27, CH-1005 Suisse.

La Na,K-ATPase fait partie des ATPases membranaires de type P. Elle est responsable du maintien du gradient sodique et potassique à travers la membrane de la plupart des cellules animales. Pour étudier la structure de la paroi du pore permettant la translocation cationique à travers la Na,K-ATPase, nous avons utilisé la méthode SCAM (Substituted-Cysteine-Accessibility Method). Chaque acide aminé, de la position K₇₇₄ à la position A₇₉₆ a été remplacé par une cystéine dont l'accessibilité a été testée par traitement avec un réactif thiolique spécifique, le 2-aminoéthyl methanethiosulfonate (MTSEA). Dans la Na,K-ATPase sous forme native, seul l'acide aminé A₇₉₆ en position la plus extracellulaire est accessible au MTSEA. Cependant, 6 autres acides aminés le long de ce segment H5 (Y₇₇₈, L₇₈₀, S₇₈₂, P₇₈₅, E₇₈₆ et L₇₉₁) deviennent facilement accessibles au réactif MTSEA après traitement de la Na,K-ATPase avec la palytoxine (toxine non peptidique qui transforme la pompe à Na en un canal cationique peu sélectif) : la conductance induite par la palytoxine est inhibée à plus de 50% par une exposition de 2 min à une concentration de 100 μM de MTSEA. Les positions K₇₇₄ et I₇₇₆ sont aussi accessibles mais montrent une inhibition moins marquée. Entre les positions K₇₇₄ et S₇₈₂ on observe donc une alternance d'acides aminés exposés et non-exposés. Ces résultats suggèrent un modèle de la structure secondaire du segment TM5 où le tiers interne adopte la configuration d'un feuillet β . Il a déjà été démontré que certains des acides aminés accessibles dans le canal induit par la palytoxine (Y₇₇₈, S₇₈₂, E₇₈₆) jouent un rôle important dans la liaison cationique. Cette observation montre que le segment transmembranaire H5 fait partie à la fois du site de liaison des cations et du pore induit par la palytoxine et donc de la structure qui permet la translocation cationique à travers la Na,K-ATPase.

EFFET FIBRINOLYTIQUE DES IgG AGREGÉES SUR LES CELLULES EPITHELIALES GLOMERULAIRES HUMAINES EN CULTURE.

J.Ph Haymann, F. Delarue, G. Nguyen, J.D Sraer. INSERM U 489 and Association Claude Bernard, Hôpital Tenon, Paris, France.

Les dépôts de complexes immuns (CIC) présents dans les glomérulonéphrites extra membraneuses sont supposés avoir un effet notamment sur la protéinurie. A notre connaissance, une action sur le système fibrinolytique n'a pas été étudiée alors que des produits de dégradation de la fibrine sont retrouvés dans les urines. Afin de tester cette hypothèse, nous avons étudié l'effet d'immunoglobulines G agrégées (AgIgG), utilisées comme modèle de complexes immuns, sur des cultures primaires de cellules épithéliales glomérulaires humaines (GEC) et sur des glomérules ex vivo. Nous avons montré précédemment que le récepteur Fc néonatal (FcRn) présent sur les GEC et les podocytes in vivo permet la fixation des AgIgG. Ce récepteur est impliqué dans la transcytose des IgG dans différents types cellulaires, mais sa fonction n'a pas été étudiée dans les GEC jusqu'à présent. Nous démontrons dans ce travail par ELISA, zymographie en gel de fibrine que les AgIgG augmentent l'urokinase dans le surnageant des GEC et des glomérules isolés et reste sans effet sur la synthèse de l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) ou de son inhibiteur (PAI1). L'augmentation d'urokinase dans les surnageants est détectable à partir de la 8^{ème} heure et est maximale à 24 heures (approximativement 300% en antigène et en activité) avec une effet dose. L'augmentation des ARNm de l'urokinase détectée dans les GEC est maximale à la 12^{ème} heure avec une augmentation de l'ordre de 50%. Cet effet semble spécifique du FcRn car aucun effet n'est observé pour les Fab'2 des IgG ou pour l'albumine. Ces résultats suggèrent que la présence de CIC dans les glomérulonéphrites extra membraneuses induirait localement une augmentation d'urokinase qui via la synthèse de plasmine pourrait agir à la fois sur la fibrinolyse en empêchant l'accumulation de fibrine dans la chambre urinaire et sur le remodelage de la matrice extra cellulaire.

LA GLYCOLYSE ANAÉROBIE POURRAIT JOUER UN RÔLE DANS LE MÉCANISME DE CONCENTRATION DE L'URINE

Stéphane Hervy, Laure Martin, et S. Randall Thomas
INSERM U.467, CHU Necker, 75015 Paris.

Depuis les années 50, on a prêté que des osmoles interstitielles pourraient théoriquement contribuer au mécanisme de concentration de l'urine, mais l'idée a été abandonnée par manque de candidats. Récemment, cette idée a été de nouveau évoquée dans des études théoriques par nous-mêmes et par d'autres (Thomas & Wexler, 1995, Am J Physiol 269:F159-F171; Jen & Stephenson, 1994, Bull Math Biol 56:491-514), mais il n'y avait toujours pas d'idée claire quant à une source pour ces osmoles interstitielles.

Nous proposons maintenant que du lactate venant de la glycolyse anaérobie (GA) dans la médullaire interne (MI) sert d'osmoles externes, contribuant ainsi à créer le gradient cortico-papillaire d'osmolarité, par l'argument suivant. Il est bien établi que, du fait de l'hypoxie de la MI, la GA fournit une part importante de l'énergie pour les cellules de la région. Or, la GA est aussi une source d'osmoles, puisque chaque glucose consommée donne deux lactates. De plus, ces sucres sont exclus du fluide tubulaire et exercent donc une force osmotique importante susceptible de soustraire de l'eau des anses descendantes et des canaux collecteurs, concentrant leur contenu. Par ce biais, la production glycolytique de lactate dans la MI pourrait amplifier le recyclage de NaCl et d'urée qui constituent le gradient osmotique.

Nous avons intégré glucose, lactate, et la GA dans une série de modèles mathématiques de la médullaire rénale pour voir, de façon quantitative, si ce principe suffit pour expliquer le gradient osmotique de la MI. Nous avons commencé par un modèle qui n'inclut que la circulation sanguine et l'interstitium, et nous avons progressé vers des modèles qui incluent aussi les néphrons et canaux collecteurs, avec de plus en plus de détails topologiques. Dans de tels modèles, on sait que le recyclage passif de NaCl et d'urée (principe de base de toute hypothèse jusqu'ici) ne suffit pas pour expliquer un gradient osmotique si on tient compte des perméabilités effectivement mesurées par microperfusion *in vitro*. Nous avons trouvé que l'inclusion de la GA dans la MI de ces modèles, avec conversion de 15 à 20% (valeur raisonnable) du glucose en lactate, prédit que l'osmolarité dans la MI (variable d'un modèle à un autre) augmenterait entre 150 et 700 mOsm (avec 1500-2000 mOsm à la pointe de la papille) alors que, sans l'activité glycolytique, les mêmes modèles montrent un gradient osmotique insignifiant dans la MI.

HETEROGENEITE D'EFFET DE L'INSUFFISANCE RENALE CHRONIQUE (IRC) SUR L'EXPRESSION DE DEUX TRANSPORTEURS DE DROGUES
D. Laouari, I. Blancké, R.C.H. Yang, G. Friedlander, INSERM U 426, Faculté X Bichat, Paris, France.

La fonction tubulaire rénale est altérée au cours de l'IRC. Certaines anomalies sont détectées au niveau de la bordure en brosse rénale, en particulier une réduction d'expression et d'activité de certains enzymes et transporteurs de la membrane apicale. Le tubule rénal proximal joue un rôle important dans l'excrétion des toxines endogènes et exogènes. En IRC de nombreuses toxines s'accumulent, en partie à cause de la baisse du DFG mais la contribution tubulaire n'est pas connue. Or, les cellules épithéliales possèdent de nombreux transporteurs membranaires dont certains ont une activité ATPasique permettant la sécrétion de substances du plasma vers l'urine. La P-glycoprotéine (P-gp) et la protéine MRP2 sont deux protéines ATP-dépendantes très impliquées dans l'excrétion des toxines, celles-ci à caractère neutre ou cationique pour Pgp et anionique pour MRP2. Les deux transporteurs sont présents dans la membrane apicale des cellules épithéliales dans le tube rénal et aussi dans le foie et l'intestin. Nous avons donc évalué les changements d'expression de Pgp et MRP2 au cours de l'IRC dans le rein ainsi que dans le foie. De plus, nous avons étudié les variations de glutathion tissulaire car ce dernier participe au transport de substrats de MRP2. Des rats mâles de 150g ont subi une ablation rénale de 80% (rats Nx) ou une laparotomie (rats S). Après 3 semaines (3s) ou 6 semaines (6s), ont été mesurés dans le rein et le foie des rats Nx et S: a) l'expression en protéine (Western blot) et en ARNm (protection contre les ribonucléases) de P-gp et MRP2, b) les contenus en glutathion total (G) et l'activité G-transférase (GT).

A 3s, le DFG des rats Nx était la moitié de celui des rats S et diminuait encore à 6s (0,19 vs 0,55 ml/mn/100g poids). A 3s dans le rein, l'expression de la P-gp, en protéine et ARNm, était comparable chez les rats Nx et S alors que l'expression de MRP2 était augmentée chez les rats Nx comparés aux rats S: +90 % en protéine et + 65 % en ARNm. A 3s dans le foie, les expressions de P-gp et MRP2 n'étaient pas affectées par l'IRC. A 6s dans le rein et le foie, l'expression de P-gp restait inchangée par l'IRC tandis que l'expression de MRP2 augmentait chez les rats Nx comparés aux rats S: +70% en protéine et + 200 % en ARNm dans le rein; +70% en protéine et 60% en ARNm dans le foie. Dans le rein des rats Nx, l'activité de la GT était maintenue normale et le contenu en G était supérieur de 30% à celui des rats S. Dans le foie, l'activité GT était réduite de 30% chez les rats Nx comparés aux rats S sans modification du contenu en G.

En conclusion, des deux transporteurs de drogues étudiés, MRP2 augmente spécifiquement en IRC, précocement dans le rein et plus tard dans le foie. Cet effet pourrait dépendre de facteurs systémiques, plus probablement des toxines urémiques. Dans le rein, l'élévation du contenu en G est en faveur d'une formation de toxines G-conjuguées et de leur excrétion tubulaire via MRP2. L'implication de G dans l'action de MRP2 hépatique semble plus improbable.

CARACTERISATION D'UN CANAL POTASSIQUE DE LA MEMBRANE BASOLATERALE DU TUBULE CONTOURNE DISTAL DE SOURIS.

Lourdé S, Paulais M, Teulon J. INSERM U426, IFR 02, Université Paris 7, Faculté de Médecine X Bichat, 16 rue Henri Huchard, 75870 Paris Cedex 18.

La réabsorption transcellulaire de NaCl par le tubule contourné distal (TCD) met essentiellement en jeu un cotransporteur Na-Cl et un canal ENaC apicaux, et une Na/K ATPase basolatérale. Des études électrophysiologiques ont montré la présence d'une conductance potassique basolatérale; la nature des canaux potassiques responsables de cette conductance est mal connue.

La technique du patch-clamp, appliquée à la membrane basolatérale de la portion initiale du TCD de souris, a révélé la présence d'un canal K⁺ à rectification entrante sur des fragments de membrane « attachés à la cellule ». En présence de 145 mM K⁺ dans la pipette de patch-clamp et de 140 mM Na⁺ / 5 mM K⁺ dans le bain, les conductances entrante et sortante du canal sont de 35 ± 1 pS et 8 ± 2 pS (n = 4), respectivement, les courants s'inversant à une différence de potentiel imposée de +62 ± 7.25 mV (n = 5), ce qui est compatible avec une sélectivité potassique. L'activité du canal potassique n'est pas dépendante de la différence de potentiel transmembranaire. Le canal est aussi observé sur des fragments de membrane excisés en présence de 145 mM de K⁺ des deux côtés de la membrane, et dont la face intracellulaire est exposée à une solution dépourvue de Mg²⁺. Dans ces conditions, le canal ne présente pas de rectification : la conductance est de 34 ± 3 pS (n = 5). On note une restauration de la rectification du canal par la présence de 1,2 mM de Mg²⁺ intracellulaire. Les conductances entrante et sortante sont alors de 27 ± 3 pS et 9 ± 2 pS respectivement (n = 6). Dans la même configuration, l'activité du canal est dépendante du pH interne, l'acidification diminuant la probabilité d'ouverture (elle est de 4 ± 2% à pH 6.8 contre 250 ± 42% à pH 8.4 par rapport à pH 7.4; n = 6). En établissant une différence de potentiel transmembranaire négative et en permettant un fonctionnement continu de la Na/K ATPase, cette conductance potassique est à même de moduler le transport transépithélial de NaCl par le TCD.

ABSENCE DE TUBULE DISTAL CONTOURNÉ 1 DANS LES SOURIS NCC(-/-)

J. Loffing, F. Aregger, P. Schultheiss¹, G. Shull¹, P. Meneton², B. Kaissling Institut d'Anatomie, Université de Zurich, Winterthurerstr. 190, CH-8057 Zurich; ¹Dept. of Molecular Genetics, Biochemistry and Microbiology, Univ. of Cincinnati, 45267 Cincinnati; ²INSERM U367, Rue du Fer à Moulin, F-75005 Paris

Le tubule distal contourné (DCT) réabsorbe le sodium (Na) dans sa première moitié (DCT1) par l'intermédiaire du cotransporteur à NaCl (NCC), dans sa seconde moitié (DCT2) par l'intermédiaire du NCC et du canal épithélial à Na (ENaC). Des changements chroniques de l'activité de transport dans le DCT se répercutent dans des changements de volume fractionnel du DCT par rapport au volume tubulaire cortical total. Nous avons étudié les effets d'une déficience génétique en NCC sur le développement structural du DCT. Nous avons analysé par morphométrie les volumes fractionnels du DCT1, du DCT2 et du tubule connecteur (CNT) dans les reins de souris femelle adultes NCC (+/+) et NCC (-/-). Les trois segments ont été identifiés par immunofluorescence: le DCT1 a une forte immunoréactivité pour la parvalbumine (PV+++), le DCT2 montre en plus du ENaC une forte immunoréactivité pour la calbindine (CB+++), le CNT exprime le ENaC et a une faible immunoréactivité pour la calbindine (CB+). Les volumes fractionnels sont:

	DCT1	DCT2	CNT
Identification (PV+++)		(CB+++ ENaC)	(CB+, ENaC)
NCC +/+	8.1 ± 0.5 %	3.8 ± 0.1 %	7.5 ± 0.3 %
NCC -/-	1.2 ± 0.1 % *	3.4 ± 0.3 %	13.1 ± 0.8 % *

(n = 4 souris/groupe; moyenne ± SEM; * p < 0.05 +/+ vs. -/-).

La microscopie électronique a révélé que les cellules (PV+++ des souris NCC(-/-) ne sont pas différenciées, manquant par exemple d'invasions basales, tandis que le DCT2 apparaît normal, et que CNT est hypertrophié en comparaison avec les souris NCC (+/+).

Ces résultats suggèrent que 1. l'absence de NCC et/ou de transport de Na empêche la croissance du DCT1; 2. le CNT peut s'hypertrophier pour compenser un manque de réabsorption de Na par le NCC.

(anti-NCC et anti-ENaC fournis par S. Hebert et B. Rossier, respectivement)

GLYCOLYSE ANAÉROBIE ET LE MÉCANISME DE CONCENTRATION DE L'URINE : EFFETS DE LONGUEUR DE LA PAPILLE, DU NOMBRE DE NEPHRONS PAPILLAIRES, ET DU TAUX DE GLYCOLYSE.
Laure Martin, Stéphane Hervy, et S. Randall Thomas
INSERM U.467, CHU Necker, 75015 Paris.

En raison de la forte activité de transport actif dans la médulla externe (ME) et des échanges en contre-courant entre les structures médullaires, la médulla interne (MI) est relativement hypoxique, et de ce fait la glycolyse anaérobie (GA) fournit une part importante de l'énergie pour les cellules de la région. Or, la GA est aussi une source permanente d'osmoles, puisque chaque glucose consommé est scindé en deux lactates. Nous avons montré (Thomas, 2000, *Am.J.Physiol. Renal* (in press)) que ce lactate pourrait s'accumuler dans la papille par recyclage dans les vasa recta, suggérant qu'il jouerait un rôle de moteur ("effet primaire") dans l'établissement du gradient osmotique cortico-papillaire de la MI. D'après notre analyse dans des modèles mathématiques de la médulla, sur la base de l'anatomie du rat (Hervy, Martin, & Thomas, autre communication à ce congrès), la contribution de ces osmoles interstitiels d'origine métabolique au gradient osmotique serait indirecte. Autrement dit, du fait de leur exclusion du fluide tubulaire des néphrons, ils auraient une forte tendance à soustraire de l'eau des anses descendantes et des canaux collecteurs, contribuant ainsi à une amplification des recyclages d'urée et de NaCl.

Ici, nous présentons nos premiers pas dans l'exploration de ce principe dans le cadre d'une étude de physiologie comparative, afin d'aborder une comparaison à travers différentes espèces de rongeurs, ayant des régimes alimentaires et des niches écologiques différents, et dont les reins se différencient non seulement par leurs tailles et nombre absolu de néphrons, mais aussi par les longueurs relatives des ME et MI (i.e., longueur papillaire), par la fraction de leurs néphrons qui s'étendent en profondeur, et même par leur activité métabolique par gramme de tissu (connu pour varier inversement avec la taille de l'animal).

Dans un modèle mathématique de la médulla qui comporte néphrons courts, néphrons longs, canaux collecteurs, et vasa recta, nous avons fait varier indépendamment la longueur de la papille, le taux de décroissance du nombre de néphrons en profondeur, et le taux spécifique de glycolyse. Les résultats de ces simulations confirment que l'augmentation du gradient osmotique due à la glycolyse serait accentuée dans des reins ayant une papille plus longue, une plus grande fraction des néphrons arrivant vers la pointe de la papille, ou un taux de glycolyse plus important. Ces effets sont additifs et reflètent la capacité de concentration accrue dans les rongeurs ayant de tels reins.

UN CANAL K⁺ A RECTIFICATION ENTRANTE SUR LA MEMBRANE BASOLATERALE DE LA TAL.

M. Paulais, S. Lourdel, J. Teulon. INSERM U426, IFR2, Université Paris 7, Faculté de Médecine X. Bichat, 16 rue H. Huchard, 75870 Paris Cedex 18.

La réabsorption transcellulaire de NaCl par la branche ascendante large (TAL) de l'anse de Henle met principalement en jeu un cotransporteur Na⁺-K⁺-2Cl⁻ apical, une conductance Cl⁻ et une Na⁺/K⁺ ATPase basolatérales. La présence de canaux K⁺ dans la membrane basolatérale est controversée.

La technique du patch-clamp appliquée à la membrane basolatérale de TAL corticale de souris montre l'activité d'un canal K⁺ sur ~ 20 % des fragments de membrane *in situ* (3-15 canaux / patch). En présence de 145 mM K⁺ dans la pipette, les conductances entrante (g_{in}) et sortante (g_{out}) sont de 44 ± 1 et 5 ± 0.2 pS, respectivement (n = 12). Ce canal présente une forte sélectivité potassique ($P_{Na^+}/P_{K^+} \sim 0.08$) et une activité (NPo) stimulée par la dépolarisation membranaire.

L'absence de Mg²⁺ sur la face interne de fragments de membrane excisés permet d'observer l'activité du canal K⁺ ($P_{Na^+}/P_{K^+} \sim 0.03$), présentant une faible rectification entrante : $g_{in} = 44 \pm 1$, $g_{out} = 34 \pm 1$ pS (n = 8). L'addition de Mg²⁺ interne rétablit la rectification à sa valeur observée *in situ*, et réduit fortement la NPo. La NPo est aussi dépendante du pH interne, l'acidification diminuant la probabilité d'ouverture du canal (pK ~7.6, $n_H \sim 2$). La polyamine spermine (SPM⁴⁺) appliquée sur la face interne du canal produit une inhibition dépendante de la concentration (IC₅₀ = 25 μM à V_m = -60 mV) et du potentiel imposé (IC₅₀ < 5 μM à V_m = +60 mV), sans affecter la conductance du canal.

Un canal K⁺ sur la membrane basolatérale de la cTAL de souris est à même de stabiliser la différence de potentiel de cette membrane et de participer au recyclage du K⁺ entré par l'action de la Na⁺/K⁺ ATPase.

MODULATION DU COTRANSPORT NA-GLUCOSE PAR LA VIMENTINE DANS DES CELLULES TUBULAIRES PROXIMALES EN CULTURE PRIMAIRE. I. Runembert¹, P. Federici², E. Colucci-Guyon³, P. Briand², G. Trugnan⁴, G. Friedlander¹, F. Terzi¹. INSERM U 426⁽¹⁾, 380⁽²⁾, 538⁽³⁾ et CNRS URA 361⁽⁴⁾, Paris.

La vimentine, filament intermédiaire de classe III, est exprimée dans les cellules mésenchymateuses mais pas dans les cellules épithéliales du rein adulte. Cependant, cette protéine est réexprimée dans les cellules épithéliales, *in vivo*, au cours d'atteintes rénales et, *in vitro*, en culture primaire, mais son rôle reste à déterminer. Nous avons établi des cultures primaires de cellules tubulaires proximales (CTP) issues de souris dont le gène de la vimentine a été invalidé par recombinaison homologue (*Vim*^{-/-}) et de souris sauvages (*Vim*^{+/+}). L'absence de vimentine n'affecte ni la morphologie, ni la prolifération et/ou la différenciation cellulaire ; en revanche, elle réduit sélectivement l'activité du cotransport Na-glucose. Contrairement au rein entier, les CTP expriment le cotransporteur SGLT1 mais pas SGLT2. L'analyse par northern blot montre que l'abondance des ARNm de SGLT1 est comparable dans les deux types cellulaires. Dans les bordures en brosse, l'analyse par western blot montre deux bandes correspondant aux formes monomérique et dimérique de la protéine SGLT1. L'abondance des monomères est comparable dans les deux types cellulaires tandis que celle des dimères est diminuée de 50% dans les CTP *Vim*^{-/-}. Nous avons montré que SGLT1 et la vimentine sont localisés dans des compartiments spécialisés de la membrane plasmique appelés DRM. L'abondance de SGLT1 est significativement diminuée dans les DRM *Vim*^{-/-}. Le traitement des cellules *Vim*^{+/+} par la méthyl-β-cyclodextrine, qui dissocie les DRM, diminue l'abondance de SGLT1 dans ce compartiment ainsi que celle des dimères dans les bordures en brosse. Ces changements sont associés à une diminution de l'activité du cotransport Na-glucose. Dans les cellules *Vim*^{-/-}, la supplémentation en cholestérol des membranes, qui stabilise les DRM, restaure complètement l'activité du cotransport Na-glucose.

En conclusion, l'absence de vimentine diminue l'activité du cotransport Na-glucose dans les cellules tubulaires rénales, ceci étant le reflet d'une diminution de la dimérisation de SGLT1 dans les DRM. Ces résultats suggèrent que la réexpression de vimentine dans les cellules épithéliales est nécessaire au maintien de l'état physique des DRM. Des études sont actuellement en cours pour évaluer l'impact de ces phénomènes dans la nécrose tubulaire rénale.

LOCALISATION SUBCELLULAIRE ET CARACTERISATION DES RECEPTEURS DE L'ANG II DANS LA BRANCHE ASCENDANTE LARGE MEDULLAIRE (mTAL) DE REIN DE RAT :

Poumarat J-S¹, Houillier P^{1,2}, Paillard M^{1,2}, Blanchard A^{1,2} Unité INSERM U356¹, IFR 58¹, 15 rue de l'école de médecine, 75006 Paris, Université Paris VI¹, Hôpital Broussais².

La présence de récepteurs AT₁ dans la mTAL a été établie, cependant la localisation subcellulaire de ces récepteurs est inconnue. La liaison de [¹²⁵I]-[Sar¹, Ile⁶]-ANG II (0.1 nM) a été étudiée sur des préparations de membranes plasmiques lumineuses (LMV) et basolatérales (BLMV) purifiées et isolées simultanément à partir d'une suspension tubulaire de mTAL. Les mesures enzymatiques montraient un enrichissement sélectif des BLMV en Na-K-ATPase (6.52 ± 1.2 vs 1.01 ± 0.36 , BLMV vs LMV) et des LMV en activité γGTP (2.49 ± 0.72 vs 12.67 ± 1.61 , BLMV vs LMV). Sur les deux types de membranes il existait une liaison spécifique de la [¹²⁵I]-[Sar¹, Ile⁶]-ANG II. Les récepteurs lumineux étaient plus nombreux, mais présentaient une affinité apparente plus faible (Bmax 4808 vs 902 fmol/mg prot, Kd 52.5 vs 7.9 nM, LMV vs BLMV). Les études de compétition montraient sur les deux types de membranes un profil d'affinité identique pour le losartan (IC 50 proche de $3 \cdot 10^{-8}$ M sur les LMV et BLMV) et pour les dérivés de l'ANG II (ANG III > ANG II (1-7) > ANG IV). Les mesures d'activités aminopeptidases A et N sur la suspension de mTAL et l'homogénat montrent une activité respectivement 20 fois plus faible ou identique à celle du cortex, et spécifiquement enrichies dans les LMV. L'inhibition de l'activité APA était incomplète dans les conditions de binding, pouvant expliquer par une dégradation partielle en dérivé ANG III, la moins bonne affinité apparente des récepteurs lumineux pour le traceur.

EN CONCLUSION : Ces résultats sont compatibles avec la présence de récepteurs AT₁ de l'ANG II aux pôles basolatéral et luminal des cellules de la mTAL, et d'une activité APA et APN exclusivement apicale. L'absence paradoxale d'effet de l'ANG II lumineuse sur la réabsorption de HCO₃⁻ contrastant avec la présence d'un effet basolatéral pourrait être expliquée par une dégradation par les aminopeptidases apicales de l'ANG II en ANG III moins active et en ANG IV ayant des effets opposés à l'ANG II. La présence de récepteurs AT₄ lumineux dans la mTAL est en cours d'étude.

LES SOURIS EXPRIMANT LE RECEPTEUR α2B-ADRENERGIQUE SOUS CONTROLE DU PROMOTEUR DE LA KAP DEVELOPPENT UNE ANOMALIE CONGENITALE DU TRACTUS URINAIRE.

Schaak S., Cussac D., Tavernier G., Denis C., Frances B. et Paris H. INSERM U388, Institut Louis Bugnard, CHU Rangueil, Toulouse.

Le récepteur α2B-adrénergique (α2B-AR) est exprimé dans le tubule proximal où il participe aux processus de réabsorption du Na⁺ en activant l'antiport NHE3. Une augmentation de l'expression de ce récepteur a été observée dans certaines souches de rats hypertendus et les souris invalidées (hétérozygotes α2B-AR^{+/-}) sont insensibles à un régime hypersodé. Des données récentes indiquent également que ce récepteur active les MAP kinases (Erk 1 et 2) et qu'il pourrait exercer un effet mitogène sur les cellules du tubule proximal.

Afin d'évaluer le rôle du récepteur *in vivo*, nous avons généré un modèle de souris transgéniques exprimant l'α2B-AR sous contrôle du promoteur du gène de la KAP (Kidney Androgen-regulated Protein). Ce promoteur est spécifique du tubule proximal et est régulé par la testostérone : son expression est constitutive chez les mâles, inductible chez les femelles. Deux lignées indépendantes d'animaux transgéniques ont été obtenues.

L'analyse du phénotype des deux lignées indique que les mâles présentent une anomalie congénitale unilatérale du tractus urinaire qui se manifeste par la présence de deux uretères. L'uretère ectopique génère un reflux vésico-urétéral qui provoque la destruction progressive du parenchyme rénal, aboutissant *in fine* à une hydronéphrose massive. Le rein contro-latéral est compensatoire et présente une hypertrophie et une oligonéphrose. Ce modèle de souris est le premier à reproduire ce type de CAKUT (Congenital Anomalies of Kidney and Urinary Tract). Son étude permettra d'analyser l'évolution de cette pathologie, en particulier aux stades précoces, d'étudier les mécanismes conduisant à la formation de deux bourgeons urétéraux et les conséquences de cette duplication sur le développement du rein.

Les femelles ne présentent aucune anomalie morphologique décelable. Leur traitement par la testostérone devrait induire la surexpression du transgène dans le tubule proximal et permettra de définir les conséquences d'une réceptivité α2B-adrénergique exacerbée sur la rétention de Na⁺ et la prolifération cellulaire.

ACTIVITE PHOSPHOLIPASIQUE A₂ (PLA₂) SENSIBLE AUX NUCLEOTIDES PURIQUES ET PYRIMIDIQUES DANS L'AMPOULE DU CANAL SEMI-CIRCULAIRE DE GRENOUILLE

M. TEIXEIRA, C. BERNARD, E. FERRARY et D. BUTLEN
INSERM U. 426, Faculté X. Bichat, 75870 Paris cedex 18

Les nucléotides puriques et pyrimidiques sont impliqués dans la régulation des canaux ioniques des cellules sensorielles et des cellules sécrétrices d'endolymphe dans l'oreille interne.

Une microméthode a été développée pour mesurer l'activité de la PLA₂ à partir de la libération de [³H] acide arachidonique par l'ampoule isolée du canal semi-circulaire de *Rana ridibunda*. A 26°C, l'UTP stimule la PLA₂ de façon dose-dépendante et saturable (constante apparente d'activation, 1.3 ± 0.4 μM; coefficient de Hill, 0.9 ± 0.1; facteur maximal de stimulation, 2.0 ± 0.1). Les analogues structuraux de l'UTP activent la PLA₂ avec l'ordre de stéréospécificité suivant: UTP ≥ UDP > ADPβS = ATPγS ≥ ATP = 2-MeS-ATP ≥ ADP = Ap₄A ≥ α, β-Me-ATP = CTP > Bz-ATP ≥ AMP = UMP >> uridine et adénosine. Les stimulations de la PLA₂ induites par l'UTP et le 2-MeS-ATP sont inhibées par les inhibiteurs de la phospholipase C (PLC) (U73122), de la protéine kinase C (PKC) (GFI09203X) et de la PLA₂ cytosolique (MAFP). L'activité enzymatique basale est stimulée par les esters de phorbol et les agents α-adrénergiques et est inhibée par les hormones élevant la concentration intracellulaire d'AMPc (vasotocine, isoprotérénol, PGE₂), l'AMPc et la forskoline. L'inhibiteur de la protéine kinase A (PKA) (H89) restaure les réponses observées en présence d'AMPc ou de forskoline.

Cette étude suggère que l'occupation par les nucléotides extracellulaires des récepteurs puriques P2Y₁ et pyrimidiques P2(Y) couplés à l'activation de la PLC engendre: 1) une stimulation de la PKC puis de la PLA₂ induisant une libération d'acide arachidonique, une synthèse et une sécrétion de prostaglandines, 2) une augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPc consécutive à la stimulation de l'adényl cyclase par les PGE₂ et 3) une activation de la PKA entraînant une inhibition de la PLA₂ cytosolique, régulant ainsi par rétrocontrôle négatif la synthèse des prostaglandines.

LA RHO-KINASE CONTRIBUE A L'ACTIVATION DE LA SYNTHÈSE DE COLLAGÈNE I PAR L'ANGIOTENSINE II ET L'ENDOTHELINE DANS LE CORTEX RÉNAL ET L'ARTÈRE

P.-L. Tharaux, S. Vandermeersch, C. Chatziantoniou, D. Henrion[‡] et J.-C. Dussault

INSERM U.489, Paris 75020, [‡]INSERM U.541, Paris 75010

L'angiotensine II (Ang II) et l'endothéline-1 (ET-1) sont impliquées dans le remodelage cardio-vasculaire au cours de l'hypertension artérielle et en particulier dans la néphroangiosclérose caractérisée par une accumulation de collagène I au sein des structures vasculaires rénales. L'hypothèse d'une influence de la vasoconstriction sur l'expression du gène du collagène I stimulée par l'Ang II ou l'ET-1 dans des aortes et des tranches de cortex rénal fraîchement isolées de souris a été testée à l'aide d'un inhibiteur pharmacologique de la Rho-kinase, le Y-27632. L'inhibition de la Rho-kinase (ROCK) par le Y-27632 a d'abord été vérifiée dans les aortes de souris. Cet agent a prévenu l'augmentation de la contraction isométrique induite par l'Ang II ou par l'ET-1 ainsi que le recrutement des faisceaux d'actine observé en microscopie confocale. Un modèle de souris transgénique exprimant le gène luciférase sous le contrôle du promoteur de la chaîne alpha 2 du collagène I (procola2(I)) a permis de mesurer les variations d'activité transcriptionnelle de ce gène. L'Ang II et l'ET-1 ont doublé l'activité luciférase en une heure dans le cortex et l'aorte. Ce phénomène a été prévenu lors de la coincubation des tissus avec la cytochalasine D, un inhibiteur de la polymérisation de l'actine. Parallèlement, l'inhibition pharmacologique de la ROCK a diminué de 60% l'activation de procola2(I) induite par les vasoconstricteurs dans les aortes et les cortex. Ces résultats ont été confirmés in vivo. En effet, l'injection intraveineuse du Y-27632 a prévenu l'augmentation de l'activité luciférase induite par les vasoconstricteurs dans le cortex et l'aorte. Dans une autre série d'expériences, l'abolition par le Y-27632 des fibres de stress d'actine formées dans les cultures de cellules musculaires lisses (CML) d'aortes et d'artérioles afférentes stimulées par l'Ang II ou l'ET-1 a constitué une observation indirecte de l'activité de la ROCK dans ces cellules. Enfin, l'expression d'une forme constitutivement active, d'une forme normale ou d'une forme dominante négative de la ROCK a influencé de façon dose-dépendante l'expression du gène procola2(I) dans les CML de souris.

En conclusion, l'activité de la ROCK induite par l'Ang II et l'ET-1 participe à l'effet fibrosant de ces vasoconstricteurs. Cette enzyme intervient dans la régulation du tonus vasculaire et de la synthèse du collagène I. Son rôle reste à évaluer lors des processus physiopathologiques chroniques.

REGULATION DE L'EXPRESSION DES PROTEINES CFTR ET P-gp PAR L'OUABAÏNE. D. Tondelier, F. Brouillard, M. Baudouin-Legros et A. Edelman. INSERM U.467, Faculté de Médecine Necker, 156 rue de Vaugirard, 75015 PARIS

La protéine CFTR (Cystic Fibrosis transmembrane conductance regulator), canal Cl⁻ activé par l'AMPc, et la P-glycoprotéine codée par le gène *MDR-1* (multidrug resistance) sont deux protéines de la famille des protéines ABC (ATP binding cassette) présentes dans certaines cellules épithéliales dont les expressions évoluent de façon symétrique sous certaines stimulations. Nous avons testé, dans des cellules d'origine pulmonaire humaine (Calu-3), l'effet d'un traitement prolongé par l'ouabaïne sur les contenus cellulaires en ARNm de CFTR et *MDR-1* (Northern blot) et en protéines CFTR et P-gp (Western blot, immunoprécipitation). Les fonctions des protéines ont été mesurées par vidéoimagerie de fluorescence utilisant respectivement le MEQ sensible aux concentrations anioniques et la calcéïne-AM normalement hydrolysée en calcéïne fluorescente mais directement expulsée de la cellule par P-gp.

Les cellules Calu-3 expriment fortement CFTR et très faiblement P-gp. Leur traitement de 24 heures par l'ouabaïne induit une forte expression du gène *MDR-1* tout en diminuant le contenu cellulaire en ARNm de *CFTR* de façon dose-dépendante entre 10⁻⁷ et 5x10⁻⁷ mol/l. Les variations d'ARNm induites par 2x10⁻⁷ mol/l d'ouabaïne sont significatives à partir de 12 heures et maximales au bout de 24 heures de traitement. L'effet de l'ouabaïne est reproduit par d'autres inhibiteurs de la Na/K ATPase, et semble être médié par une augmentation de la concentration cytosolique de calcium.

Les cellules traitées pendant 48 heures par de l'ouabaïne (entre 10⁻⁷ et 5x10⁻⁷ mol/l) possèdent une P-gp détectable par western blot et expulsent rapidement la calcéïne-AM avant sa désestérification. L'inhibition de P-gp restaure la capacité des cellules traitées par l'ouabaïne à accumuler la calcéïne hydrolysée. A l'inverse, la diminution de l'expression de CFTR induite par l'ouabaïne ne se traduit que par de faibles diminutions du contenu membranaire en protéine CFTR et de l'efflux de Cl⁻ activé par l'AMPc visualisée par la technique du MEQ.

Ce travail montre que l'administration chronique de ouabaïne peut moduler l'expression de transporteurs membranaires, et que l'induction de P-gp ne requiert pas une extinction totale de CFTR.

EXPRESSION ET LOCALISATION SUBCELLULAIRE DU CANAL CHLORURE CIC-5 DANS LE REIN ET L'INTESTIN

A. Vandewalle, F. Cluzeaud, K. C. Peng, M. Bens, W. Günther, A. Lüchow, T. J. Jentsch
INSERM U478, Faculté de Médecine Xavier Bichat, BP 416, 75870, Paris Cedex 18, France et ZMNH, Universität de Hambourg, Martinistrasse 85, D-20246 Hambourg, Allemagne

Le canal chlorure CIC-5 dont les mutations sont responsables de la maladie de Dent, une maladie héréditaire liée au chromosome X caractérisée par une protéinurie de bas poids moléculaire, une hypercalciurie et une lithiase rénale, est principalement exprimé dans le rein. Des études immunocytochimiques nous ont permis de montrer que le canal CIC-5 est localisé dans les cellules tubulaires proximales et intercalaires de rein de rat. La colocalisation de CIC-5 avec les H⁺-ATPases vacuolaires, rab-5a et la β2-microglobuline endocytée ont aussi montré que ce canal chlorure est exprimé dans les endosomes précoces, suggérant que CIC-5 participe au processus d'endocytose des protéines de bas poids moléculaire au niveau des cellules tubulaires proximales rénales (Günther et coll., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 8075-8080, 1998).

La question de savoir si CIC-5 pouvait être aussi exprimé dans les cellules intestinales douées de fortes capacités d'endocytose. Les résultats de RT-PCR ont montré que CIC-5 est exprimé dans le duodénum, le jejunum, l'iléon et le colon de rat adulte. Les expériences de Western blot ont permis de révéler la protéine CIC-5 de 83 kD dans tous ces tissus. Des expériences d'immunohistochimie ont aussi montré une localisation intracellulaire exclusive du canal CIC-5 dans une région située juste au dessus des noyaux des cellules intestinales et coliques, une colocalisation partielle de CIC-5 avec les récepteurs des immunoglobulines polymériques mais pas avec la sucrase isomaltase. Des expériences de fractionnement cellulaire de cellules jéjunales ont aussi montré que CIC-5 colocalise avec la H⁺-ATPase vacuolaire de 70 kD et les deux petites GTPases, rab4 et rab5A, associées aux endosomes précoces, mais pas avec rab6, normalement exprimée dans les membranes plasmiques. Ces résultats indiquent donc que le canal chlorure CIC-5 est présent non seulement dans les endosomes précoces des cellules tubulaires proximales rénales, mais aussi dans des vésicules de transport entérocytaires, suggérant donc que CIC-5 peut jouer un rôle dans les processus d'endocytose des cellules intestinales.

EXPRESSION FONCTIONNELLE DE DEUX NOUVELLES MUTATIONS DU RECEPTEUR SENSIBLE AU CALCIUM (RSCa) R. Vargas-Poussou, Ph. Hulin³, R Tyler⁴, P Houillier⁵, X Jeunemaître⁵, M Paillard⁵, M Déchaux², G Planelles³ et C Antignac¹. ¹INSERM U423, ³INSERM U467, ²Service de Physiologie, Hôpital Necker-Enfants Malades, Div. De Néphrologie, Université de Floride, Gainesville. Services de ⁵Physiologie et ⁶Génétique, Hôpital Broussais, Paris, France.

Des mutations inactivatrices et activatrices à l'état hétérozygote dans le gène du RSCa sont responsables respectivement du syndrome d'hypercalcémie-hypocalcémie familiale (HHF) et de l'hypocalcémie autosomique dominante (HAD). Nous avons décrit préalablement la détection d'une nouvelle mutation activatrice chez un patient avec HAD présentant également un tableau clinique de syndrome de Bartter. Cette association peut être expliquée par l'activation du RSCa dans la branche large ascendante de l'anse d'Henle, ce qui induit une réduction du transport transépithélial de NaCl, du recyclage apical de K et de la réabsorption des cations divalents. Nous décrivons ici l'expression fonctionnelle dans l'ovocyte de *Xenopus laevis* de cette mutation activatrice ainsi que l'expression d'une nouvelle mutation inactivatrice détectée chez un patient avec une HHF typique. Les deux mutations sont localisées dans le domaine extracellulaire du RSCa. Les ovocytes ont été injectés avec des ARN du RSCa sauvage, des ARN du RSCa portant les mutations L125P ou I40F, ou avec de l'eau. Trois ou quatre jours après, nous avons mesuré les courants chlore activés par le calcium intracellulaire en réponse au Gd^{3+} (agoniste du RSCa), par la technique de voltage clamp à deux électrodes. Les courants dans les ovocytes injectés avec le mutant L125P ne sont pas différents de ceux des ovocytes injectés avec l'ARN sauvage (101 ± 29 nA n=8 vs. 1001 ± 21 nA n=14). L'accumulation d' IP_3 en réponse au Ca^{2+} extracellulaire est en cours d'étude, pour établir si le mutant L125P et le récepteur sauvage peuvent être différenciés par cette mesure. Par contre, aucune réponse au Gd^{3+} n'a été observée dans les ovocytes injectés avec le mutant I40F (n=8) ou avec de l'eau (n=11), ce qui confirme que la mutation faux-sens I40F, qui remplace un acide aminé non polaire par un acide aminé du même groupe, est responsable d'une perte de fonction.

EFFETS DU JEUNE SUR LE METABOLISME DE LA GLUTAMINE DANS LE CORTEX RENAL DE RAT : ETUDE PAR SPECTROSCOPIE RMN DU CARBONE 13

B. Vercoutère, G. Baverel, G. Martin
Centre d'Etudes Métaboliques par SRM, INSERM U499, Hôpital E. Herriot, Lyon, France.

En fonction de l'état nutritionnel, le rein subit d'importantes adaptations métaboliques qui semblent se traduire chez l'homme par une synthèse accrue de glucose lors du jeûne. La glutamine est une source carbonée possible pour cette synthèse. Ceci nous a conduit à caractériser *in vitro* le métabolisme de la glutamine et sa régulation par le jeûne dans les tubules de cortex rénal de rat. Pour cela, nous avons quantifié le flux au niveau des principales enzymes participant à ce métabolisme.

Nous montrons que, lors du jeûne, le métabolisme s'oriente préférentiellement vers l'anabolisme et que les effets sont bien marqués :

- 1- l'augmentation du flux de glutamine vers le cycle de Krebs est suivie d'une stimulation de la néoglucogenèse
- 2- l'oxydation complète de la glutamine diminue
- 3- le rapport des flux pyruvate carboxylase sur pyruvate déshydrogénase augmente.

Cette approche expérimentale, combinant mesures enzymatiques et spectroscopie RMN du carbone 13 à une modélisation mathématique des voies métaboliques impliquées, montre qu'il est possible de quantifier, dans la cellule intacte, les flux enzymatiques et ainsi de préciser leur régulation au cours du métabolisme de la glutamine, un important substrat capté par le rein.

SYNTHESE DE DNA DANS LES SUBTYPES CELLULAIRES DU TUBULE CONNECTEUR: ABSENCE DE CELLULES-SOUCHE

P. Wehrli, B. Kaissling, J. Löffing
Institut d' Anatomie, Université de Zurich, Winterthurerstrasse 190; CH-8057 Zurich

Des études *in vitro* ont suggéré que les cellules intercalaires (IC) de type B sont les cellules-souche pour l'ensemble du système collecteur (*PNAS* 89: 5489-91, 1992). Nous avons examiné la synthèse de DNA dans le segment initial de ce système, le tubule connecteur (CNT). La charge tubulaire en sodium dans les segments distaux a été augmentée pendant trois jours par infusion par minipompes de bumétanide (40 mg/kg/j) additionné de bromodeoxyuridine (BrdU), un analogue de la thymidine. Les contrôles ont reçu seulement la BrdU. La synthèse de DNA a été évaluée par les immunoréactivités pour la BrdU et pour l'antigène nucléaire de prolifération cellulaire (PCNA). Les types cellulaires ont été identifiés par l'immunoréactivité pour la H-ATPase (dans toutes les IC) et pour l'échangeur d'anions AE1 (seulement dans les IC type A); les cellules CNT ne sont marquées ni par l'un, ni par l'autre. La fraction de noyaux marqués par la BrdU ou le PCNA (labeling index, LI) donne une estimation de l'activité de synthèse de DNA dans les différentes populations cellulaires. Les résultats sont donnés dans le tableau suivant (moyenne \pm SEM; n = 4 rats/groupe):

	GROUPE	cellules CNT	IC Type A	IC Type B
BrdU LI	Contrôle	27.7 \pm 1.0 %	9.7 \pm 0.6 %	4.6 \pm 0.4 %
	Bumétanide	36.0 \pm 2.1 %	4.4 \pm 0.2 %	16.0 \pm 0.7 %
PCNA LI	Contrôle	3.5 \pm 0.4 %	2.6 \pm 0.2 %	1.7 \pm 0.1 %
	Bumétanide	6.4 \pm 0.5 %	0.2 \pm 0.1 %	7.5 \pm 0.4 %

Ainsi, une synthèse de DNA est démontrable dans les trois types cellulaires. Le nombre de cellules CNT relatif à l'ensemble des cellules n'a pas été affecté par le traitement (contrôle 73.8 \pm 1.0 %, bumétanide 74.4 \pm 0.8 %), celui des IC Type A a décliné (de 11.9 \pm 0.6 % à 7.5 \pm 0.2 %), et celui des IC Type B a augmenté (de 14.4 \pm 0.4 % à 18.1 \pm 0.6 %). Ces résultats indiquent que les trois types cellulaires du CNT peuvent proliférer et ne sont donc pas issus d'une population de cellules-souche.

(anticorps anti-H-ATPase et anti-AE1 fournis par S. Gluck and S. Alper, respectivement)