

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

Colloque dédié à Takis Anagnostopoulos, in memoriam

Paris, Faculté de médecine Necker, 20-21 juin 2002

■ Sommaire

Transport transmembranaire et transépithélial	35	Nouvelles approches et apport des modèles animaux à la physiologie et à la physiopathologie	53
Homéostasie acido-basique	41	Apoptose – Prolifération – Remodelage	59
Régulation de l'expression du gène et transduction du signal	47	Stress et rein	65

Transport transmembranaire et transépithélial

WHAT MAKES THE NA,K-PUMP ELECTROGENIC?

J.-D. Horisberger, M. Burnay and K. Geering
Institut de Pharmacologie et de Toxicologie, Université de Lausanne
Rue du Bugnon 27, 1005 Lausanne Suisse

The Na,K-pump activity is electrogenic because it exchanges 3 Na / 2 K for each consumed ATP. In contrast, the gastric and the non-gastric H,K-ATPases perform electroneutral cation exchange. In the case of the gastric H,K-ATPase, a 2H / 2K exchange is the most probable while the stoichiometry is not known for the non gastric (or colonic) H,K-ATPase but its activity was recently shown to be electroneutral. A striking difference is obvious in the sequence of the 5th transmembrane (TM) segment of these three families: a serine (S₇₈₂ in the *Bufo marinus* α 1 sequence), which is conserved in all known Na,K-ATPases, is replaced by a lysine in all H,K-ATPases (K₇₅₁ in the mammalian gastric H,K-ATPases and K₉₀₀ in the *Bufo* bladder H,K-ATPase).

We have studied mutants of the α subunit of the *Bufo* bladder H,K-ATPase (α HKbl) in which this residue, K₉₀₀, was mutated to a positively charged (R), neutral (S or A) or negatively charged (E) residue. *Xenopus* oocytes expressing wild type *Bufo* α 1 Na,K-ATPase, α HKbl, or mutants of α HKbl were studied by rubidium uptake and current measurements. K₉₀₀A and K₉₀₀E α HKbl mutants showed a K stimulated electrogenic activity, with a K^{1/2} similar to that of the Na,K-ATPase. In contrast, when the positive charge was conserved (K₉₀₀R) no K induced outward current could be measured, even though rubidium transport was present. Similar mutants of the Na,K-ATPase in which S₇₈₂ was replaced by A, E, K or R were also studied. Although several of these mutants of the Na,K-ATPase had a low level of functional expression, the presence of non electrogenic transport could be demonstrated for the mutant with a positively charged residue (S₇₈₂R), while the S₇₈₂A mutant had electrogenic activity qualitatively similar to the wild type enzyme. Thus, the presence a single positively charged residue in the 5th TM segment determines the electrogenicity of the cation pump activity. We propose the hypothesis that K₉₀₀ in the H,K-ATPases provides a fixed positive charge that is the equivalent of the third Na ion transported by the Na,K-ATPase.

PROPRIÉTÉS D'UN CANAL CHLORURE DE LA MEMBRANE BASO-LATÉRALE DU TUBE CONTOURNÉ DISTAL DU REIN DE SOURIS

Stéphane Lourdel, Marc Paulais, Pedro Marvao et Jacques Teulon
CNRS FRE 2468, centre de recherches biomédicales des Cordeliers
15, rue de l'Ecole de Médecine, 75270 Paris cedex 06.

Le tube contourné distal (TCD) absorbe du NaCl par l'intermédiaire d'un co-transport Na⁺-Cl⁻ situé sur la membrane apicale, et de deux systèmes de transport ionique, pompe Na⁺ et conductance Cl⁻, situés sur la membrane basolatérale. Nous avons utilisé le patch-clamp en canal individuel pour étudier les canaux Cl⁻ endogènes (non identifiés à ce jour) qui sous-tendent la conductance macroscopique au Cl⁻ sur la membrane basolatérale de fragments de TCD, microdisséqués à partir de reins de souris après un traitement à la collagénase. La solution de bain contient (en mM): 145 NaCl, 7,8 KCl, 1,2 MgCl₂, 1 CaCl₂, 10 HEPES, 10 glucose. La solution de pipette est identique mais ne contient pas de KCl. Les tubes distaux ont été patchés à leur début.

Dans la configuration attachée, un canal de conductance $9,4 \pm 0,3$ pS ($n = 23$) est détecté. Le potentiel d'inversion de la courbe i/v dans les conditions précisées ci-dessus est proche de zéro ($2,0 \pm 2,2$ mV). Le remplacement de 100 mM de NaCl par du gluconate de sodium déplace le potentiel d'inversion de 10 mV vers la droite tandis que la substitution de N-méthyl D glucamine au sodium n'a pas d'effet. Il s'agit donc d'un canal Cl⁻. Le canal n'est pas stimulé par l'AMP cyclique: le pourcentage de patches contenant des canaux Cl⁻ et le nombre de canaux Cl⁻ par patch ne sont en effet pas modifiés par une préincubation des tubules en présence de forskoline (10^{-5} M). En revanche, l'activité du canal est sensible au calcium extracellulaire et au pH extracellulaire. La NP_0 est de $7,6 \pm 1,6$ ($n = 13$) lorsque la solution de pipette (ajustée à un pH de 7,4) contient 1 mM de calcium et devient $33,2 \pm 5,6$ ($n = 10$) en présence de 5 mM de calcium (pH 7,4). La NP_0 est de $44,7 \pm 8,8$ ($n = 10$) lorsque le pH est de 8,0 (en présence de 1 mM calcium).

Dans la configuration détachée, nous avons, en particulier, déterminé la sélectivité ionique: les perméabilités du Na⁺, Br⁻ et NO₃⁻ comparées à celles du Cl⁻ sont respectivement de $0,08 \pm 0,01$ ($n = 9$), $0,61 \pm 0,12$ ($n = 4$) et $0,58 \pm 0,13$ ($n = 4$).

Les propriétés du canal sont compatibles avec ce que l'on sait des CIC-K et plus précisément avec la sélectivité anionique du CIC-K2.

EPITHELIAL SODIUM CHANNEL ACTIVITY IN DETERGENT-RESISTANT MEMBRANE MICRODOMAINS

Vadim G. Shlyonsky, Frédérique Mies, Nancy Leclercq and Sarah Sariban-Sohrabay
Université Libre de Bruxelles, Laboratory of Physiology and Physiopathology
Campus Erasme, CP 604, 808, route de Lennik, 1070 Bruxelles, Belgium

Epithelial tissues that maintain salt and water homeostasis contain sodium selective channels in their apical cell membranes. Channel activity is modulated by various factors, but the contribution of apical membrane lipid content and biophysical state of the membrane lipids to this activity has not been studied.

To examine this, Triton-X extracts of whole cells and of apical membrane-enriched preparations from cultured A6 renal epithelial cells were floated on sucrose density gradients. The distribution of Na⁺ channel protein along the gradients was probed by immunostaining of western blots. The protein was most abundant in the high-density fractions of the gradients, which contain the detergent-soluble material and decreased in the lighter, detergent-resistant fractions. No channel protein was observed in the very light fractions at the top of the gradients. All fractions were tested for Na⁺ channel activity, recorded after the incorporation of the channel protein into planar lipid bilayers. Amiloride-sensitive Na⁺ channel activity was only present in a single fraction (16% sucrose) that corresponded to a low density detergent-resistant membrane fraction of the sucrose gradient.

In accord with other studies, it is likely that high and low density fractions represent membrane domains with different lipid content. These results are the first indication that native epithelial sodium channels probably require close association with specific lipids in order to function. This may represent channel compartmentalization in discrete domains within the plane of the apical membrane that may contribute to regulation of channel activity.

ÉTUDE DE L'AUTO-INHIBITION DU CANAL A Na⁺ ÉPITHÉLIAL: EFFETS DE LA TEMPÉRATURE ET DES PROTÉASES

Ahmed Chraïbi et Jean-Daniel Horisberger
Institut de Pharmacologie et de Toxicologie, Université de Lausanne
Rue du Bugnon 27, 1005 Lausanne Suisse

Le canal à Na⁺ épithélial «ENaC» constitue l'étape clé de la réabsorption du Na⁺ luminal dans le néphron distal, la partie distale du colon et dans les voies aériennes supérieures et distales. La régulation de ce canal est assurée par le contrôle de sa probabilité d'ouverture, sa synthèse protéique et/ou sa densité à la membrane apicale. Plusieurs facteurs intra- et extracellulaires sont impliqués dans cette régulation. L'auto-inhibition (self inhibition) ou régulation d'ENaC par le sodium extracellulaire a été décrite dans plusieurs tissus épithéliaux à jonctions serrées, mais le mécanisme moléculaire de cette régulation reste mal connu. Nous avons étudié la cinétique de l'auto-inhibition de ENaC en exprimant les trois sous-unités α , β et γ du canal d'origine humaine (hENaC) dans l'ovocyte de Xénope. L'augmentation du sodium extracellulaire de 1 à 100 mM ou le retrait de l'amiloride résulte en un pic rapide de courant entrant suivi d'une inhibition rapide (avec une constante de temps de l'ordre de quelques secondes) puis d'une stabilisation à un état d'équilibre. Ce phénomène d'auto-inhibition est dépendant de la température ($Q_{10} \approx 8$), sa cinétique et son amplitude sont augmentées à haute température et il est pratiquement aboli à une température inférieure à 12 °C. Il ne dépend ni de l'amplitude du courant entrant ni du sodium intracellulaire. Cette régulation peut être abolie après activation du canal par la trypsine ou par un autre agent activant le canal à sodium (p-CMB).

Nos résultats montrent que l'auto-inhibition est une propriété intrinsèque du canal formé par les trois sous-unités α , β et γ , et que l'activation par les protéases est due, en partie au moins, à la suppression de l'auto-inhibition de ce canal par le sodium extracellulaire. Ils suggèrent également qu'à basse concentration de sodium extracellulaire, le canal à Na⁺ épithélial présente une haute probabilité d'ouverture.

REGULATION OF ROMK MRNA AND PROTEIN EXPRESSION IN THE MEDULLARY THICK ASCENDING LIMB (MTAL)

Morgan Gallazzini, Maurice Bichara
INSERM U.426, Faculté de Médecine Xavier Bichat
75018 Paris, France

Luminal secretion of potassium is necessary for NaCl absorption by the MTAL and thus plays an important role in the process of urinary concentration and dilution. Indeed, the protein abundance of ROMK, the major apical K channel of the MTAL, is regulated *in vivo* by changes in dietary water intake and by administration of 1-desamino-[8D-arginine]vasopressin (DDAVP) for 7 days (Ecelbarger et al. *J. Am. Soc. Nephrol.* 12: 10, 2001). Glucocorticoids are also known as being necessary to maximal urinary concentration and dilution and regulate Na-K-Cl cotransporter expression in the MTAL (Attmane-Elakeb et al. *J. Biol. Chem.* 255: 33548, 2000). To gain insights into the cellular mechanisms of these regulations, rat MTAL fragments were incubated *in vitro* in Ham-Dulbecco/Eagle media (Attmane-Elakeb et al. *Kidney Int.* 53: 439, 1998), under various experimental conditions. ROMK mRNA and protein were quantified by specific competitive RT-PCR and immunoblotting analysis of MTAL total membrane, respectively. DDAVP (10^{-9} M) or 0.5 mM 8-bromo-cAMP had no significant effect on ROMK mRNA or protein abundance in both isoosmotic and hyperosmotic media. By contrast, hyperosmolality, caused by adding 50 mM NaCl plus 50 mM urea to the isoosmotic medium, increased ROMK mRNA abundance by ~77% ($P < 0.04$) and ROMK protein abundance by ~30% ($P < 0.05$). These results suggest that vasopressin *in vivo* regulates ROMK expression indirectly through changes in the medullary osmolality. On the other hand, dexamethasone (10 nM), added to the isoosmotic medium as a glucocorticoid hormone, increased ROMK mRNA abundance by ~131% ($P < 0.05$). Moreover, *in vivo* administration of dexamethasone for 6 days increased both ROMK mRNA by ~67% ($P < 0.002$) and ROMK protein by ~61% ($P < 0.004$) in the MTAL. These results establish osmolality and glucocorticoid hormones, not cAMP, as potent direct regulators of ROMK mRNA and protein expression in the MTAL.

REGULATION OF AQUAPORIN-2 EXPRESSION BY ALDOSTERONE IN VASOPRESSIN-RESPONSIVE COLLECTING DUCT PRINCIPAL CELLS

Udo Hasler¹, David Mordasini¹, Matthieu Bianchi¹, Alain Vandewalle², Eric Féraïlle¹ and Pierre-Yves Martin¹

¹Fondation pour Recherches Médicales, 64 Avenue de la Roseaie, 1211 Geneva, Switzerland. ²INSERM, U478, Faculté de Médecine Xavier Bichat, Institut Fédératif de Recherche 02, BP416, F-75870 Paris Cedex 18, France

Aquaporin 2 (AQP2) expression in renal collecting duct principal cells is largely mediated by the antidiuretic hormone [8-arginine]vasopressin (AVP) but increasing evidence suggests that aldosterone may also play an important role in controlled AQP2 expression. We have recently shown (Hasler et al., 2002) that physiological doses of AVP added to the basolateral side of immortalized mouse cortical collecting duct principal cells (mpkCCD_{C14}) grown on filters induces cAMP-dependent expression of AQP2 mRNA and protein. AQP2 was furthermore found to be quickly degraded in cells from which AVP was removed from the cell medium and both the lysosome and proteasome were found to participate in this process. In the present study, we investigated the effect of aldosterone on AQP2 expression in mpkCCD_{C14} cells. Western blot analysis performed on mpkCCD_{C14} cell lysates revealed reduced AQP2 expression levels in cells treated with both aldosterone and AVP with respect to cells treated with AVP alone. Reduced AQP2 expression levels inferred by aldosterone persisted at least 24 hours and were especially apparent 3 hours after aldosterone administration. Contrary to this effect observed in the presence of AVP, aldosterone was found to counter the decrease in AQP2 expression when added to the cell medium following AVP removal. This effect was not abolished by proteasomal or lysosomal inhibitors suggesting that AQP2 protein degradation is not altered by aldosterone. The mechanisms by which aldosterone acts on AQP2 expression will be discussed.

LA CALCYCLINE EST UNE PROTÉINE INDUITE PRÉCOCÈMENT PAR LA VASOPRESSINE DANS LE TUBULE COLLECTEUR RÉNAL : RÔLE DANS LA RÉGULATION À LONG TERME DU TRANSPORT IONIQUE

N. Courtois-Coutry, C. Le Moëllic, S. Boulkroun, M. Fay, F. Cluzeaud, B. Escoubet*, N. Farman et M. Blot-Chabaud
INSERM U478 et INSERM U426*, Institut Fédératif de Recherche 02
Faculté de Médecine Xavier Bichat, BP 416, 75018 Paris

Les effets à long terme de la vasopressine (AVP) dans le rein impliquent la transcription de différents gènes qui sont encore peu connus. Des expériences d'hybridation soustractive réalisées sur une lignée cellulaire dérivée de tubule collecteur cortical de rat, la lignée RCCD₁, ont permis d'identifier la calcycline comme un gène induit précocement par l'AVP (1 heure). La calcycline est une protéine qui lie le calcium, et qui est impliquée dans la transduction des signaux intracellulaires.

Nous avons pu montrer que dans le rein l'ARNm de la calcycline est localisé dans le glomérule, tout le long du tubule collecteur et dans l'épithélium bordant la papille. Dans les lignées cellulaires RCCD₁ et m-IMCD₃ (cellules dérivées du tubule collecteur papillaire), la calcycline est localisée dans le cytoplasme. Un traitement avec 10^{-8} M d'AVP entraîne une augmentation progressive de l'expression de l'ARNm codant pour la calcycline dans les cellules RCCD₁ (x 1,7 au bout de 4h de traitement) et dans les m-IMCD₃ (x 2 au bout de 7,5h). De même, le niveau d'expression de la protéine est augmenté. *In vivo*, lorsque des rats Brattleboro, génétiquement déficients en AVP, sont traités de façon chronique (4 jours) avec cette hormone, une augmentation parallèle de l'expression d'ARNm codant pour la calcycline et pour l'AQP₂ est observée. Enfin, l'introduction d'un anticorps anti-calcycline dans les cellules RCCD₁, par perméabilisation des membranes plasmiques, empêche l'augmentation du courant de court-circuit induite à long terme (7 h 30) par l'AVP alors que l'augmentation rapide du courant (15 min) induite par l'hormone n'est pas modifiée.

L'ensemble de ces résultats suggère que la calcycline est un gène induit précocement par l'AVP dans le tubule collecteur et qu'elle joue un rôle important dans le transport ionique transépithélial lors de la phase tardive de réponse à l'hormone.

EFFET DE L'ANGIOTENSINE II SUR LE TRANSPORT DE NaCl DANS LA BRANCHE ASCENDANTE LARGE MÉDULLAIRE

N. Lerolle, S. Bourgeois, F. Levie, M. Paillard et P. Houillier
Inserm U 356, IFR58
15, rue de l'Ecole de Médecine 75270 Paris Cedex 6

Introduction : Le transport de NaCl dans la branche ascendante large médullaire (BALM) contribue à la régulation du bilan de NaCl et à la constitution du gradient osmotique cortico-papillaire. L'effet de l'angiotensine II (All) sur le transport de NaCl, bien décrit dans le tube proximal et distal, est inconnu dans la BALM alors que des récepteurs de type AT₁ ont été décrits au pôle apical et basolatéral des cellules de ce segment (Poumarat et al., *Kidney Int*, sous presse).

Matériels et méthode : Des BALM issus de reins de rats Sprague-Dawley ont été microdisséqués et microperfusés *in vitro*, à 37°C. Les tubules étaient baignés dans un liquide contenant Na⁺ 140 mM, Cl⁻ 121 mM, HCO₃⁻ 23 mM, pH 7,40 et perfusés avec la même solution. Chaque expérience comportait une période témoin, une période test puis une nouvelle période témoin. Le chlore a été mesuré par microcoulométrie dans le perfusé et dans le fluide issu du tubule permettant de mesurer le transport transépithélial de chlore utilisé comme indice du transport transcellulaire de NaCl. Le potentiel trans épithélial était mesuré.

Résultats : Le transport de chlore n'était pas modifié par des concentrations d'All de 10^{-11} M et 10^{-10} M au pôle basolatéral ou luminal. En revanche, l'All à 10^{-8} M au pôle basolatéral ou luminal provoquait une diminution réversible du flux de chlore (All basolatéral : J_{Cl} $32,2 \pm 15,4$ vs $62,3 \pm 19,5$ pmol/min/mm, All apical : J_{Cl} $52,3 \pm 27,9$ vs $69,6 \pm 8,4$ pmol/min/mm) et du potentiel trans-épithélial (All basolatéral : $4,2 \pm 1,4$ vs $7,5 \pm 3,3$ mV, All apical : $11,8 \pm 2,0$ vs $14 \pm 2,6$ mV). En raison de la présence au pôle apical d'aminopeptidases et de sites de liaison AT_{IV}, l'effet de l'All 10^{-8} M luminal a été étudié en présence de Divalynal 10^{-8} M (inhibiteur des récepteurs AT_{IV} de l'Angiotensine IV) : l'effet inhibiteur de l'All n'était pas modifié.

Conclusion : L'All à la concentration de 10^{-8} M au pôle apical ou basolatéral inhibe le transport de NaCl dans la BALM chez le rat. L'effet de l'All luminal est indépendant des récepteurs AT_{IV}. Du fait de la synthèse intra-rénale d'All, les concentrations physiologiques de cette hormone dans le fluide tubulaire et l'interstitium sont de l'ordre des concentrations inhibitrices mises en évidence dans ces expériences suggérant que l'All exerce *in vivo* un effet inhibiteur, en condition basale, sur la réabsorption de NaCl et la constitution du gradient osmotique corticopapillaire.

MISE EN ÉVIDENCE D'UN TRANSPORTEUR VÉSICULAIRE DE MONOAMINES DANS LE REIN

Agnès Maurel, Nathalie Pizzinat et Angelo Parini
INSERM U. 388, Toulouse

Le tubule proximal présente un intérêt majeur dans la compréhension des systèmes monoaminergiques périphériques car il regroupe les propriétés: 1) de synthétiser certaines monoamines (dopamine et sérotonine); 2) de réguler leurs niveaux intracellulaires (via les monoamine oxydases notamment) et; 3) d'être leur cible privilégiée (présence de récepteurs D1 et 5-HT1). Néanmoins, le mode de transport de la dopamine et/ou de la sérotonine depuis leur site de synthèse intracellulaire jusqu'à leur lieu d'action extracellulaire reste à ce jour inconnu. Or, dans le système nerveux central, les neurotransmetteurs néosynthétisés sont concentrés et stockés dans des vésicules de sécrétion en vue de leur libération. Le principe de ce stockage vésiculaire repose sur l'existence du Transporteur Vésiculaire de Monoamines (VMAT) dont nous avons recherché la présence dans le tubule proximal de rat.

A l'aide d'anticorps dirigés respectivement contre l'une et l'autre forme de VMAT, nous montrons par immunocytochimie et immunofluorescence la présence du VMAT1 mais pas du VMAT2 dans les cellules tubulaires proximales en culture. De plus, par RT-PCR nous mettons en évidence l'expression d'une séquence 3' homologue à la forme de VMAT1 exprimée dans les surrénales. Néanmoins, les résultats de clonage par 5'RACE suggèrent que la forme de VMAT1 présente dans le rein serait différente de celle décrite dans les surrénales. Actuellement, l'identification et la caractérisation de l'ADNc du VMAT1 rénal chez le rat sont en cours. Par ailleurs, d'un point de vue fonctionnel, les expériences d'uptake montrent que le VMAT1 rénal serait plus sélectif de la dopamine que de la sérotonine dans des conditions basales.

La caractérisation d'un tel transporteur dans le rein constitue un enjeu important pour la compréhension des systèmes dopaminergique et/ou sérotoninergique rénaux ainsi que des pathologies qui leur sont associées.

INVALIDATION DU TRANSPORTEUR D'URÉE UT-B CHEZ LA SOURIS: PREMIÈRE ANALYSE PHÉNOTYPIQUE

Baoxue Yang, Lise Bankir et Alan S. Verkman
UCSF, Dept. of Medecine, San Francisco, USA et INSERM, Unité 367, Paris

Le transporteur d'urée facilité UT-B est exprimé dans les globules rouges (GR) et les vasa recta artériels de la médulla rénale ainsi que dans le cerveau, les testicules et la vessie. Dans le rein, UT-B participe au recyclage intrarénal d'urée entre vasa recta ascendants (fenestrés) et descendants (possédant UT-B) qui permet l'accumulation d'urée dans la médulla et contribue à la production d'une urine hyperosmotique au plasma. Des souris « knock out » pour le gène codant pour UT-B ont été obtenues par délétion des exons 3 à 6. Des croisements entre souris hétérozygotes (HZ) ont produit 75 souris comprenant 18 sauvages (wildtype = WT), 40 HZ et 17 KO. L'absence d'UT-B ne perturbe donc pas le sex ratio ni la viabilité des souris. Par ailleurs, la croissance et le phénotype général des souris KO paraissent normaux.

La perméabilité à l'urée des GR des souris UT-B KO est 45 fois plus faible que celle des souris WT (perméabilité évaluée d'après les changements de volume des GR en suspension, mesurés par diffraction après application brusque d'un gradient de concentration d'urée). La perméabilité des GR à l'eau est normale. Dans des conditions basales avec eau de boisson ad libitum, le débit urinaire de 24 h des souris KO est environ 40% plus élevé ($p < 0,01$) et l'osmolalité urinaire 30% plus faible que chez les WT (1375 ± 33 vs 1873 ± 32 mosm/kg H₂O, $p < 0,001$). Après 24 heures de privation d'eau, l'osmolalité urinaire augmente chez les souris KO, mais moins que chez les WT (2370 ± 50 vs 3610 ± 110 mosm/kg H₂O, $p < 0,001$). Chez les souris KO, la concentration plasmatique d'urée est plus élevée (+ 22%), et la concentration urinaire d'urée plus faible (- 32%) que chez les souris WT. Il en résulte un rapport « Urée urinaire / Urée plasmatique » ($U_{urée}/P_{urée}$) deux fois plus bas chez les KO que chez les WT (68 ± 9 vs 124 ± 11 , $p < 0,001$) alors que le rapport des osmolalités urinaire et plasmatique n'est diminué que d'un tiers ($4,0 \pm 0,2$ vs $6,1 \pm 0,4$, $p < 0,001$).

Il existe donc un défaut de concentration dans le rein des souris dépourvues du transporteur d'urée UT-B touchant sélectivement l'urée plus que les autres osmoles. Ceci est certainement dû à l'incapacité à recycler l'urée par échange par contre-courant entre vasa recta ascendants et descendants. L'urée non recyclée vers la médulla interne reste dans la lumière des vasa recta ascendants et retourne donc dans le sang périphérique, expliquant l'augmentation du taux plasmatique d'urée.

Ces souris UT-B KO ont donc permis de savoir quelle est la contribution du recyclage vasculaire d'urée au mécanisme de concentration de l'urine. Elles seront également utiles pour étudier le rôle de UT-B dans les autres organes où UT-B est présent, mais où son rôle n'est pas encore connu.

CIC-2 CHLORIDE CHANNEL LOCALIZATION IN HUMAN EPITHELIA. IMPLICATIONS FOR CYSTIC FIBROSIS

Joanna Lipecka, Alexandre Hinzpeter, Moëz Bali, Pascale Fanen¹, Aleksander Edelman and Janine Fritsch
INSERM Unité 467, Faculté de Médecine Necker, Paris, France
¹INSERM Unité 468, Hôpital Henri Mondor, Créteil, France

The secretion of chloride is critical for fluid and electrolyte transport across epithelia. The essential part of Cl⁻ secretion is driven by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). There are, however other, non-CFTR apical membrane Cl⁻ channels that do participate in epithelial Cl⁻ secretion.

The ubiquitous CIC-2 Cl⁻ channel, belonging to a family of a voltage-gated Cl⁻ channels, is thought to contribute to epithelial Cl⁻ secretion, and was proposed to provide an alternative pathway for Cl⁻ transport in Cystic Fibrosis (CF), but the distribution of the CIC-2 protein in human epithelia was not investigated. The issue of whether CIC-2 is expressed in apical membranes of epithelial cells assumes important clinical relevance because it may be expressed in cells that also express CFTR.

We have studied the distribution of CIC-2 in human and rat intestine and airways by immunoblotting and confocal microscopy.

The expression pattern of CIC-2 in the rat and human airways was similar, but differed significantly in the rat and human intestine. We found significant expression of CIC-2 at the apex of ciliated cells in both rat and human airways.

The distribution of CIC-2 in human tissues was compared with CFTR protein expression. Colocalization experiments were performed in normal respiratory and intestinal tissue specimens and in the lung samples obtained from patients.

Our results showed that CIC-2 expression pattern in the human lung and intestine differs from that of CFTR protein. However, we have observed that in a CF patient, CIC-2 is expressed at the apical membranes of ciliated cells. Thus, although studies concerning CIC-2 localization in normal and CF-affected epithelia should be extended, the idea of pharmacological activation of this channel in CF remains promising.

RÔLE DE LA PROTÉINE CFTR DANS LA MODULATION DES CONDUCTANCES POTASSIQUES DANS LES CULTURES PRIMAIRES DE NÉPHRONS DE SOURIS CFTR^{+/+} et CFTR^{-/-}

R. Belfodil, H. Barrière, M. Tauc, C. Poujeol et P. Poujeol
Laboratoire de physiologie cellulaire et moléculaire
UMR-CNRS 6548 Université de Nice Sophia Antipolis, Parc Valrose 06108 Nice cedex 2

Le but de cette étude est de caractériser l'effet de l'invalidation du gène CFTR sur les conductances K⁺ présentes dans l'épithélium rénal de souris.

Des cultures primaires provenant de tubules proximaux (PCT), distaux (DCT) et collecteurs (CCT) ont été obtenues par microdissection individuelle de néphrons issus de souris sauvages et de souris déficientes pour le gène CFTR. La technique du patch clamp en configuration cellule entière a été appliquée sur des cultures âgées de 6 jours. Les résultats ont montré la présence d'un courant K⁺ activé par la forskoline dans les DCT et les CCT issus de souris CFTR^{+/+}. Ce courant est inhibé par le 293B (dérivé des chromanols) connu pour être un inhibiteur des canaux K⁺ de type KCNQ. Pour les PCT, aucun courant sensible à l'AMPc n'a été enregistré. Les mêmes expériences effectuées sur les trois types cellulaires issus de souris CFTR^{-/-} n'ont pas permis de mettre en évidence ces conductances K⁺.

Dans une deuxième série d'expériences nous nous sommes intéressés aux canaux K⁺ impliqués dans la régulation du volume cellulaire. Des courants K⁺ activés par un choc hypotonique ont été mesurés sur les trois types cellulaires issus de souris CFTR^{+/+}. Dans les DCT et CCT ce courant est inhibé par le TEA, la CHTX, l'apamine, la quinidine mais pas par le 293B. Nous avons trouvé que ces canaux sont sensibles au Ca²⁺ extracellulaire et activés par des nucléotides de type adénosine. Par ailleurs, un courant de même signature a été mesuré dans les PCT mais présente une pharmacologie différente. De plus ce courant montre une sensibilité apparente aux variations du pH extracellulaire suggérant son appartenance à la famille des canaux TASK (Twik-related Acid Sensitive K⁺ Channel). Un choc hypotonique sur les DCT et les CCT issus de souris CFTR^{-/-} conduit à une altération du courant K⁺ contrairement aux PCT. Cette étude a permis de montrer que l'épithélium rénal représente un bon modèle pour l'étude des fonctions de régulation de la protéine CFTR vis à vis de fonctions cellulaires telles que la régulation du volume cellulaire.

MISE EN ÉVIDENCE D'UNE PERTE RÉNALE DE NaCl DANS LE SYNDROME DE DENT

Briet M.^{1,2}, Nicolet-Barousse L.^{1,2}, Poussou R.², Houillier P.^{1,2}, Paillard M.^{1,2}, Blanchard A.^{1,2}
INSERM U356¹, IFR 58
15, Rue de l'École de Médecine, 75006 Paris, Université Paris VI¹, HEGP² AP/HP

Introduction : Le syndrome de Dent est une pathologie rare à transmission récessive liée à l'X, secondaire à une mutation inactivatrice du canal chlore CIC5. Il associe une hypercalciurie compliquée de lithiase/néphrocalcinose à une protéinurie de bas poids moléculaire (PBPM). L'évolution se fait vers l'insuffisance rénale chronique. Une intolérance hémodynamique aux diurétiques thiazidiques rapportée chez un patient peut suggérer l'existence d'une perte rénale primitive de sodium. **But de l'étude :** Rechercher une perte rénale de NaCl dans le syndrome. **Méthodes :** patients : 5 adultes présentaient un phénotype de syndrome de Dent (DS) associant une hypercalciurie (Ca/Créat : 0,45 mmol/mmol), une insuffisance rénale modérée (créat P : 121 ± 18 µM), une PBPM (protéinurie 3,3 ± 0,4 g/J, β 2 microglobulinurie > 30 fois la normale). Des prélèvements plasmatiques et urinaires ont été effectués en position couché (C) puis après une heure d'orthostatisme (D) et comparés aux normes (CS). **Résultats :**

	K mM	pH	CO2t mM	rénine C/D mU/l	Aldo (C/D) pmol/l	NaU mmol/24h	KU mmol/24h
moy	3,15	7,42	30	445/735	706/3537	182	108
sem	0,5	0,01	5	582/938	306/3524	76	28
CS	4,0 ± 0,5	7,40 ± 0,2	25 ± 2	12/32 ± 7/ ± 18	240/600 ± 160/± 400	131 8	66 5

L'exploration révèle un état d'hyperaldostérionisme secondaire avec natriurèse conservée et une hypokaliémie avec kaliurèse inappropriée. **Discussion :** Cette étude chez quatre adultes atteints de syndrome de Dent objective pour la première fois dans le syndrome de Dent la présence d'une perte rénale de NaCl. Celle-ci pourrait être expliquée par des anomalies du trafic intracellulaire de NHE3 dans le tubule proximal et/ou de ROMK dans la branche large, segments qui expriment CIC-5. Une stimulation adaptative de NCC dans le tubule distal pourrait alors expliquer l'hypermotilité apparente des patients aux diurétiques thiazidiques.

LITHIASES RÉNALES ET OSTÉOPOROSE ASSOCIÉS À UNE HYPOPHOSPHATÉMIE DUE À DES MUTATIONS DU COTRANSPORTEUR NA-PHOSPHATE DE TYPE 2A CHEZ L'HOMME

D Prié, V Huart, N. Bakouh, G Planelles, C Silve, B Grandchamp et G Friedlander
Inserm U426, Explorations Fonctionnelles, Hôpital Bichat, Paris, France. Inserm U467, Faculté Necker, Paris, France. Biochimie B, Hôpital Bichat, Paris, France

Des études épidémiologiques suggèrent l'influence de facteurs génétiques dans la survenue de lithiase rénale calcique ou de déminéralisation osseuse. Les recherches de variants au sein de gènes pouvant prédisposer à ces anomalies sont restées généralement négatives. Ces deux maladies sont, vraisemblablement, génétiquement hétérogènes, un même phénotype clinique pouvant résulter d'anomalies biologiques variées. On observe chez certains patients l'association d'une hypophosphatémie due à une fuite rénale de phosphate (Pi) et de lithiases rénales ou d'une déminéralisation osseuse, ce qui suggère que des facteurs génétiques entraînant une diminution de la réabsorption rénale de Pi pourraient favoriser la survenue de ces pathologies. Dans le rein, le Pi est réabsorbé dans le tubule proximal par le cotransporteur Na-phosphate de type 2a (NPT2a). Nous avons cherché si des mutations du gène du NPT2a pouvaient expliquer la survenue de certaines fuites rénales de Pi associées à des lithiases ou à une déminéralisation osseuse. Nous avons séquencé la région codante du gène NPT2a de 20 patients hypophosphatémiques. Nous avons trouvé 2 mutations non-synonymes à l'état hétérozygote : une chez un homme présentant des lithiases rénales l'autre chez une femme souffrant d'une ostéoporose sévère (densité osseuse lombaire : 0,639g/cm², Z-score -4,3 ; fémorale : 0,679 g/cm² Z-score -2,7). Ces patients présentaient une hypercalciurie et une élévation du calcitriol plasmatique. Ces mutations n'ont pas été retrouvées dans 200 allèles de sujets contrôles. Nous avons analysé la fonction des protéines en injectant l'ARN sauvage ou muté de NPT2a dans des oocytes de Xénopes. Ces expériences montrent une diminution du transport de Pi dépendant du Na et des courants induits par le Pi dans les oocytes exprimant les protéines mutées. Ces résultats fournissent pour la première fois la preuve que des mutations du gène de NPT2a sont responsables d'hypophosphatémie et de fuite rénale de Pi chez l'homme. Ils indiquent également qu'un défaut de réabsorption rénale de Pi peut être un des composants multigéniques impliqués dans la pathogénie des lithiases rénales calciques et de la déminéralisation osseuse.

Homéostasie acido-basique

MÉCANISME DE L'ADAPTATION AU JEÛNE DU MÉTABOLISME RÉNAL DE LA GLUTAMINE CHEZ LA SOURIS

A. Conjard, V. Brun, M. Martin, G. Baverel, B. Ferrier
INSERM U499
Rue G. Paradin, 69372 LYON Cedex 08

Il a été récemment montré *in vivo* que la glutamine est captée par le rein de souris. Etant donné l'importance physiologique et physiopathologique du métabolisme rénal de la glutamine et le développement des souris génétiquement modifiées comme animal d'expérience, nous avons mené une étude pour caractériser le métabolisme de la glutamine dans le rein de souris. Des suspensions de tubules proximaux, isolés de rein de souris nourries ou à jeun pendant 48 h, ont été incubées en présence de glutamine à concentration physiologique. La consommation de la glutamine et la production des ions ammonium par ces tubules sont identiques dans les 2 situations nutritionnelles. En accord avec ce résultat, les activités des enzymes de l'ammoniogenèse, glutaminase et glutamate deshydrogénase, mesurées dans le cortex de ces souris, sont inchangées par le jeûne. Par contre, le niveau de l'ARN messager de la glutamate deshydrogénase est multiplié par 3 dans le cortex des souris à jeun. La production de glucose à partir de la glutamine est stimulée par le jeûne et la proportion de la glutamine consommée dont le squelette carboné est complètement oxydé, devient quasiment nulle après 48 h de jeûne.

En accord avec la stimulation de la néoglucogenèse rénale à partir de la glutamine au cours du jeûne, les activités et le niveau des ARN messagers de la glucose 6-phosphatase mais surtout de la phosphoenolpyruvate carboxykinase sont augmentés dans le cortex rénal des souris à jeun. Il n'y a pas de modification de l'activité fructose 1.6-bisphosphatase, ni de l'ARN messager correspondant.

Sur la base de ces résultats *in vitro*, l'augmentation de l'excrétion urinaire d'ions ammoniums que nous avons mesurée *in vivo* chez les souris à jeun correspond probablement à une stimulation du transport de ces ions vers l'urine aux dépens de leur sécrétion dans la veine rénale, plutôt qu'à une stimulation de l'ammoniogenèse rénale.

REGULATION OF mRNA AND PROTEIN EXPRESSION OF THE $\text{NA}^+ \text{-K}^+ (\text{NH}_4^+) \text{-2Cl}^-$ COTRANSPORTER (BSC1) OF THE MEDULLARY THICK ASCENDING LIMB (MTAL)

Zoubida Karim, Amel Attmane-Elakeb, Valérie Sibella and Maurice Bichara
INSERM U.426, Faculté de Médecine Xavier Bichat
15, rue Henri Huchard, 75018 Paris, France

We have previously demonstrated that BSC1 mRNA and protein expression is regulated by chronic metabolic acidosis and *in vitro* acid incubation (Attmane-Elakeb et al. *J. Biol. Chem.* 273: 33681, 1998) and by interactions between glucocorticoid- and cAMP-dependent pathways (Attmane-Elakeb et al. *J. Biol. Chem.* 275: 33548, 2000). The aim of the present study was to assess the cellular mechanisms of these regulations. MTAL fragments were harvested from adrenalectomized rats to avoid any interference with effects of endogenous glucocorticoids, and were incubated in Ham-Dulbecco/Eagle media for 6 to 15 h. BSC1 mRNA and protein were quantified by competitive RT-PCR and immunoblotting analysis of MTAL total membrane, respectively. Acid incubation (pH 7.10) increased BSC1 mRNA abundance by ~40% as compared to control (pH 7.35) after 6 h of incubation ($P < 0.03$). However, nuclear BSC1 mRNA content was not different in control ($5.1 \pm 2.0 \text{ amol} / 10^6 \text{ nuclei}$) and acid-treated MTALs (6.2 ± 2.9). When 5,6-dichlorobenzimidazole riboside, a specific inhibitor of RNA polymerase II, was added to the media to block transcription, the half-life of BSC1 mRNA was ~7 h in control (pH 7.35) but was increased to ~17 h in acid medium ($P < .001$). These observations indicate that an acid pH increases the stability of BSC1 mRNA in MTAL probably by acting on the AU-rich 3'-untranslated region of BSC1 mRNA. DDAVP (1 nM) or 0.5 mM 8-bromo-cAMP did not affect BSC1 mRNA but enhanced BSC1 protein abundance from 100 ± 8 arbitrary units in control to 150 ± 22 ($P < 0.03$) and to 198 ± 27 ($P < 0.003$), respectively, whereas the abundance of b-actin protein was not affected. These observations indicate that stimulation of cAMP-dependent pathways alone regulate BSC1 expression at translational and/or post-translational levels. *In vitro* measurements of transcription rates (run off experiments) of BSC1 are in progress to assess the hypothesis that glucocorticoids act at the transcriptional level. These results establish that BSC1 mRNA and protein expression is regulated by various levels by acid pH, cAMP, and glucocorticoids.

LOCALISATION DE RhBG ET RhCG, DEUX NOUVEAUX TRANSPORTEURS PUTATIFS DE $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$, DANS LE REIN DE RAT

F. Quentin¹, D. Eladari¹, L. Cheval², C. Lopez³, Y. Colin³, J.-P. Cartron³, M. Paillard^{1,4}, A. Doucet² et R. Chambrey¹
¹INSERM U356, IFR 58, Paris, ²CNRS FRE2468, IFR58, Paris, ³INSERM U76, INTS, Paris, ⁴HEGP-APHP, Paris

Deux membres non érythroïdes de la famille des protéines Rh (Rhésus), RhBG et RhCG, exprimés dans le rein, ont été clonés. Ils partagent des homologies de séquences avec des transporteurs spécifiques de $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ (Mep/Amt) caractérisés chez les organismes primitifs et les plantes et, pourraient médier le transport tubulaire de $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ dans le rein de mammifères où, à ce jour, aucun transporteur spécifique de $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ n'a été décrit. En accord avec cette hypothèse, RhCG a été localisé, dans une précédente étude, au pôle apical des tubules connecteurs et des cellules intercalaires des canaux collecteurs (Eladari et al., *JASN* 12:3A, 2001), des segments tubulaires impliqués dans l'excrétion nette d'acide sous forme de NH_4^+ . Le but de cette étude était de déterminer la localisation intrarénale de RhBG chez le rat. Des expériences d'immunoempreintes montrent que l'anticorps polyclonal dirigé contre les acides aminés 444-458 de la protéine RhBG humaine (dont la spécificité a été confirmée à l'aide de la protéine RhBG recombinante) reconnaît une bande spécifique d'environ 53 kDa dans le cortex, la médullaire externe et la médullaire interne. Des expériences d'immunopéroxydase sur des coupes de rein de rat montrent un marquage RhBG au pôle basolatéral de segments tubulaires distaux localisés dans le labyrinthe cortical, les rayons médullaires, la médullaire externe et la partie supérieure de la médullaire interne. Des expériences de RT-PCR sur des tubules microdisséqués de rat montrent que les ARNm codant pour RhBG sont principalement exprimés dans le tubule contourné distal, le tubule connecteur, et le canal collecteur cortical et médullaire. Des expériences de double marquage avec la sous-unité β_1 de la H^+ -ATPase spécifiquement exprimée dans les cellules intercalaires ont montré que RhBG est exclusivement détectée dans les tubules présentant des cellules intercalaires. RhBG est exprimée dans toutes les cellules des tubules connecteurs, positives ou négatives pour la H^+ -ATPase. Dans les canaux collecteurs corticaux et médullaires, les cellules intercalaires présentent un fort marquage RhBG. Finalement, des études de double marquage avec RhCG montrent que les protéines RhBG et RhCG sont localisées respectivement aux pôles basolatéraux et apicaux des mêmes cellules tubulaires rénales de rat. Ces protéines pourraient permettre le transport transcellulaire de NH_3 , qui couplé au transport actif de protons permet une sécrétion nette de NH_4^+ dans le canal collecteur.

VERS LA FONCTION DE RHAG ET DE RHCG?

B. Chérif-Zahar, N. Bakouh, F. Benjelloun, P. Hulin, A. Edelman et G. Planelles
InsERM U 467, Faculté Necker, Paris

Les glycoprotéines RhAG et RhCG sont membres de la famille des protéines Rhésus (Rh). RhAG est spécifiquement exprimée dans les érythrocytes et permet l'expression des antigènes de groupe sanguin Rh, portés par les protéines RhD et RhCE, à la surface des hématies. En effet, chez l'homme, l'absence de RhAG conduit au phénotype Rhnull et entraîne des anomalies morphologiques et fonctionnelles du globule rouge. La glycoprotéine RhCG est exprimée majoritairement dans le rein, on ne connaît pas les conséquences de sa délétion.

Une analyse structurale et évolutive des protéines Rh a permis de rapprocher la famille Rh à celle des transporteurs d'ammonium Amt/Mep. Les expériences de complémentation d'une souche de levure déficiente en transport d'ammonium ont permis de montrer que les glycoprotéines RhAG et RhCG ont la capacité d'importer et d'exporter l'ammonium. Néanmoins la fonction de ces glycoprotéines chez les mammifères n'est pas totalement établie.

Afin de déterminer si les glycoprotéines Rh conduisent à un transport de NH_4^+ ou de NH_3 , nous avons étudié l'effet de solutions supplémentées en NH_4Cl sur 1) le pH intracellulaire, pH (vidéo-imagerie couplée au BCECF) de cellules HeLa exprimant RhAG et 2) le courant nécessaire pour maintenir le potentiel de membrane à -50 mV (voltage-clamp à 2 microélectrodes) dans des ovocytes de Xénope exprimant RhCG, ainsi que les variations de pH_i (microélectrodes sélectives)

Résultats:

1) L'exposition des cellules HeLa à une solution contenant 10 mM de NH_4Cl induit une alcalinisation cytoplasmique immédiate dans les cellules exprimant RhAG comme dans les cellules témoins. Par rapport aux cellules contrôles, les cellules HeLa exprimant RhAG présentent une re-acidification plus forte au cours de la perfusion de NH_4Cl , ainsi qu'une charge acide plus importante à son retrait.

2) L'exposition des ovocytes à des concentrations de $\text{NH}_4\text{Cl} \leq 1$ mM induit dans les ovocytes exprimant RhCG un courant entrant d'amplitude croissante ainsi qu'une acidification de pH_i, indétectables dans des ovocytes contrôles.

Conclusion:

L'ensemble de nos résultats est compatible avec un transport de NH_4^+ par RhAG et par RhCG.

ÉTUDE FONCTIONNELLE DE LA GLYCOPROTÉINE RHAG EXPRI-MÉE DANS LES CELLULES HELA PAR MESURE DE PH INTRACEL-LULAIRE : RÔLE DANS LE TRANSPORT D'AMMONIUM

Fatine Benjelloun, Gabrielle Planelles, Philippe Hulin, Aleksander Edelman, Baya Chérif-Zahar
INSERM U.467 Faculté de Médecine Necker – Enfants Malades, Université Paris V
156 rue de Vaugirard 75015 Paris

Chez l'homme, la protéine RhAG est associée au complexe Rhésus des érythrocytes. L'homologie de séquence établie entre RhAG et les transporteurs d'ammonium de la famille Mep/Amt pourrait se doubler d'une homologie fonctionnelle, puisque RhAG complète la déficience en transport d'ammonium chez la levure dépourvue de ces transporteurs d'ammonium endogènes. Le but de notre travail est de rechercher si RhAG a une fonction de transporteur d'ammonium dans des cellules de mammifère. Méthodes: Des mesures de pH intracellulaire (pHi) sont réalisées par la technique de vidéoimagerie couplée à la fluorescence (BCECF) sur des cellules HeLa exprimant après transfection transitoire la SuperGlo Bleu Fluorescence Protein, sgBFP (cellules contrôles, n = 30) ou la protéine de fusion sgBFP-RhAG (n = 26). Les tests statistiques sont réalisés par le test t de Student non païré, et considérés significatifs (*) pour une valeur de p < 0,05. Résultats: Le pHi initial des cellules exprimant sgBFP-RhAG n'est pas significativement différent de celui des cellules contrôles (7,45 ± 0,05 vs 7,51 ± 0,01). L'exposition des cellules à une solution contenant 10 mM de NH₄Cl, pH 7,4, pendant 2 min induit une alcalinisation cytosolique immédiate, dans les cellules sgBFP-RhAG (ΔpHi = 0,45 ± 0,02 UpH) comme dans les cellules contrôles (ΔpHi = 0,43 ± 0,07 UpH), p = 0,5; cette alcalinisation est le reflet de l'influx de NH₃ vers le cytoplasme et de sa protonation partielle en NH. Cependant, au cours de l'exposition au NH₄Cl, les cellules sgBFP-RhAG se réacidifient de façon significativement plus forte que les cellules contrôles (ΔpHi = 0,29 ± 0,02* vs 0,12 ± 0,01 UpH); cette réacidification reflète l'influx de NH, suivi de sa dissociation partielle en NH₃ et H⁺. De plus, au retrait de la solution de NH₄Cl, les cellules sgBFP-RhAG ont une charge acide plus importante que les cellules contrôles (ΔpHi = 0,48 ± 0,02* vs 0,24 ± 0,01). Conclusion: L'ensemble de ces résultats suggère que l'expression de RhAG dans les cellules HeLa augmente leur perméabilité membranaire au NH. Des expériences sont en cours pour définir si RhAG est un transporteur de NH ou une protéine activant les transporteurs endogènes de NH dans les cellules HeLa.

ÉTUDE DE NH₃/NH₄⁺ DANS L'OVOCYTE DE XENOPUS LAEVIS EXPRIMANT LA GLYCOPROTÉINE RhCG

Naziha Bakouh, Baya Chérif-Zahar, Philippe Hulin, Aleksander Edelman et Gabrielle Planelles
INSERM U. 467 Faculté de Médecine Necker-Enfants Malades, Université Paris V
156, rue de Vaugirard, 75015 Paris

RhCG, une protéine exprimée dans des tissus non érythroïdes, présente de fortes homologies de séquence avec les membres de la superfamille des transporteurs d'ammonium dont fait partie Mep, le transporteur d'ammonium de la levure. Au plan fonctionnel, elle restaure la croissance de levures ΔMep, posant la question d'un transport d'ammonium par RhCG dans les cellules d'organismes supérieurs. Le but de mon travail est de rechercher si RhCG, après expression fonctionnelle dans l'ovocyte de Xénope, est un transporteur d'ammonium. Méthodes: A J0, des ovocytes (stade V-VI) défolliculés sont injectés par 5 ou 25 ng/50 nl d'ARNs codant pour RhCG, ou par 50 nl d'eau (ovocytes contrôles). Les tests fonctionnels sont réalisés à J3 et J4, par des approches électrophysiologiques. D'une part, le courant induit par de faibles concentrations extracellulaires en NH₄Cl (pH 7,5) est mesuré au cours d'expériences de voltage-imposé à 2 microélectrodes. D'autre part, les variations de pH intracellulaire (pHi) et de potentiel de membrane (V_m) induites par 10 mM de (NH₄)₂SO₄ extracellulaire (pH 9,25) sont mesurées par microélectrodes sélectives au pH. Les résultats sont considérés significatifs (*) pour une valeur de p < 0,05 (test t de Student non-païré, par rapport aux valeurs contrôles). Résultats: En imposant à la membrane un V_m = -50 mV, les courants induits par 10⁻⁴, 0,25, 0,5 et 1 mM de NH₄Cl sont 1) dans les ovocytes contrôles (n = 10): 0 nA, 0 nA, -0,4 ± 0,4 nA et -3,8 ± 1,8 nA; 2) dans les ovocytes injectés avec 5 ng d'ARNs codant pour RhCG (n = 5): 0 nA, -1,0 ± 0,8 nA, -6,4* ± 1,5 nA et -19,8* ± 2,2 nA; 3) dans les ovocytes injectés avec 25 ng d'ARNs codant pour RhCG (n = 5): 0 nA, -5,2* ± 0,5 nA, -9,4* ± 1,3 nA et -25,8* ± 2,1 nA. Par contre, les expériences d'électrophysiologie sélective n'ont pas mis en évidence de différence significative dans les variations de V_m ou pHi entre les ovocytes contrôles et les ovocytes exprimant RhCG (n = 14). En conclusion, l'expression fonctionnelle de RhCG dans des ovocytes exposés à du NH₄Cl induit des courants entrants, compatibles avec un influx de NH₄⁺, ce qui n'exclut pas un transport couplé électrogène. Le protocole choisi pour les mesures de pHi n'a pas permis de mieux cibler le transport réalisé par RhCG, possiblement en raison de la forte concentration extracellulaire de (NH₄)₂SO₄ et de la forte perméabilité de l'ovocyte au NH₄⁺.

VARIATION DU TRANSCRIPTOME DE L'OMCD DE SOURIS AU COURS DE L'ACIDOSE MÉTABOLIQUE CHRONIQUE

L. Morla, J.C. Aude, J. M. Elalouf, A. Doucet, L. Cheval
CNRS, FRE 2468, CEASaclay
91191 Gif sur Yvette

Les cellules intercalaires du canal collecteur sont le principal site rénal de régulation de la balance acido-basique. Au cours de l'acidose métabolique chronique (AMC), la sécrétion d'acide et la réabsorption de bicarbonate par le canal collecteur augmentent. Cette adaptation se traduit au niveau cellulaire par un changement du profil d'expression de protéines impliquées dans le transport de proton, de bicarbonate et d'ammonium, par un remodelage structural des cellules et par une trans-différenciation des cellules intercalaires. L'objectif de cette étude a été de caractériser les gènes impliqués dans cette réponse pléiotropique à l'AMC dans le canal collecteur de la médulla externe (OMCD) de souris, grâce à l'utilisation de la méthode SADE (Serial analysis of gene expression Adapted for Downsized Extracts). Une AMC a été induite en alimentant les souris avec un régime gélosé contenant du NH₄Cl (0,8 moles / souris/j). Les animaux ont été étudiés après 3 jours de traitement, quand le pH et la concentration en bicarbonate plasmatiques avaient atteint leur minimum (pH ± SEM: 7,04 ± 0,05 vs. 7,32 ± 0,02, n = 4, p < 0,001, HCO₃⁻ (mM ± SEM): 13,3 ± 2,5 vs. 25,5 ± 2,3 n = 4 p < 0,001).

Une librairie SADE a été réalisée à partir des ARNm extraits de 850 OMCD provenant de 6 souris en AMC. 19146 étiquettes correspondant à 8847 entités différentes ont été séquencées. Les données ont été comparées à celle obtenues au préalable chez des souris normales (19698 étiquettes séquencées correspondant à 10521 entités différentes). L'analyse comparative par un test de Monte Carlo révèle que 262 transcrits sont différentiellement exprimés (p < 0,05): 160 transcrits sont sur-exprimés et 102 réprimés. Parmi les gènes induits se trouvent ceux codant pour des protéines associées au transport de protons (anhydrases carboniques 2 et 15, sous unité 16 kd de la H-ATPase) et à l'hyperaldostérionisme (Sgk, sous unités α et β de ENaC, sous unités α et β de la Na,K-ATPase). Plusieurs étiquettes correspondent à des cDNA non caractérisés fonctionnellement (n = 25), à des EST (n = 12) ou n'ont aucune correspondance dans GenBank (n = 18). Les deux transporteurs putatifs de l'ammonium récemment décrits (RhCG et RhbG) sont présents, et l'expression de RhCG est réduite.

CONTRÔLE DE L'EXPRESSION DU GÈNE CFTR PAR LES IONS HCO₃⁻ DANS LES CELLULES CALU-3

Aïda Ghoul, Maryvonne Baudouin-Legros, Gabrielle Planelles et Aleksander Edelman
INSERM U.467, Faculté de Médecine Necker
156 rue de Vaugirard, 75015 Paris

Un certain nombre de travaux récents montre que la protéine CFTR, canal chlorure activé par la protéine kinase A et faiblement perméable aux ions bicarbonates, est néanmoins impliquée dans le contrôle du transport transépithélial des ions HCO₃⁻ dans les tissus digestifs et pulmonaires. Nous avons recherché une modulation de l'expression du gène CFTR liée aux variations des transports transmembranaires de bicarbonates.

L'étude a été conduite sur une lignée de cellules humaines d'origine pulmonaire, les cellules Calu-3 qui expriment fortement le gène CFTR, et possèdent un échangeur anionique Cl⁻/HCO₃⁻ et un transporteur électrogénique Na⁺/HCO₃⁻. Les cellules ayant été incubées en présence de concentrations extracellulaires variables du tampon HCO₃⁻/CO₂ avec de l'acétazolamide (inhibiteur des anhydrases carboniques) ou différents inhibiteurs des transporteurs, leurs contenus en transcrits et en protéine CFTR ont été analysés respectivement par Northern blots (au bout de 24 heures) et Western blots (au bout de 48 heures). L'activité canal Cl⁻/AMPc dépendant de CFTR a été mesurée, par micro-vidéo-imagerie de fluorescence, sur les cellules traitées.

La concentration extracellulaire de HCO₃⁻ module les expressions génique et protéique de CFTR, optimales entre 25 et 45 mM HCO₃⁻ (5% CO₂). Les effets de l'acétazolamide et des inhibiteurs testés (DPC, NPPB, DNDS) sont eux-mêmes dépendants de ces concentrations. Ces données suggèrent l'existence d'un contrôle de l'expression du gène CFTR par les bicarbonates.

RÉGULATION DE L'ACTIVITÉ NHE2 ET NHE4 PAR LA VASOPRESSINE (AVP). ÉTUDE SUR UNE CULTURE DE CELLULES RÉNALES D'ORIGINE MURINE ET DE PHÉNOTYPE DISTAL

Damien du Cheyron, Françoise Grelac, Nadia Defontaine, Bérangère Deligny, Michel Paillard et Josiane Poggioni
INSERM: IFR 58, U356; Univ. Paris VI
15-21 rue de l'école de médecine, 75270 Paris Cedex 06

La régulation de l'activité de NHE2 et NHE4, isoformes de l'échangeur Na/H respectivement apicale et basolatérale du tubule rénal est très mal connue. Le but de ce travail est une étude du contrôle de l'activité NHE2 et NHE4 par l'AVP en application aiguë ou chronique.

Nous avons développé un modèle de cellules en culture, MKCC-2, clonées à partir d'une population cellulaire de cortex rénal de souris transgénique pour l'antigène T de SV40 et présentant des caractéristiques de cellules distales. Un marquage apical est observé en immunofluorescence indirecte avec un anticorps anti-protéine de Tamm-Horsfall. Les ARNm des récepteurs V2 de l'AVP ont été mis en évidence par RT-PCR, ceux des récepteurs V1a n'ont pas été trouvés. Les récepteurs V2 sont couplés fonctionnellement à une adényl cyclase via Gs. Les ARNm des échangeurs Na/H NHE1, NHE2 et NHE4 ont été détectés par RT-PCR. Des protéines de 82 et 100 kDa correspondant à NHE2 et NHE4 ont été trouvées par immuno-empreinte. La protéine NHE2 est localisée du côté apical par immunofluorescence indirecte après analyse en microscopie confocale. Les activités NHE2 et NHE4, déterminées selon leur profil pharmacologique différent vis-à-vis du HOECHST 642, ont été mesurées par la vitesse initiale de capture de ^{22}Na activée par un gradient sortant de H^+ .

L'application aiguë (23min) de l'agoniste V2 dDAVP (10^{-9}M) ne modifie pas l'activité NHE2 mais entraîne une importante inhibition de l'activité NHE4 ($0,43 \pm 0,09$ vs $1,27 \pm 0,36$ nmol/mg/3min, $P < 0,05$). L'incubation chronique (24 h) en présence de dDAVP ne modifie pas l'activité NHE4 mais produit une augmentation de l'activité NHE2 ($6,46 \pm 0,58$ vs $5,37 \pm 0,40$ nmol/mg/3min, $P < 0,02$). L'effet est reproduit lors d'une incubation chronique en présence de forskoline (10^{-7}M), qui stimule l'adényl cyclase sans passer par les récepteurs ($7,98 \pm 0,30$ vs $6,76 \pm 0,29$ nmol/mg/3min pour le témoin, $P < 0,01$).

Les cellules MKCC-2 semblent un modèle adapté pour l'étude des mécanismes cellulaires mis en jeu lors de l'activation des récepteurs V2 de la vasopressine pour le contrôle de l'activité NHE2 et NHE4.

ACTIVATION PKA-INDÉPENDANTE DE LA H,K-ATPASE DU CCD DE RAT PAR L'AMP CYCLIQUE; RÔLE DE LA PROTÉINE EPAC I

M. Imbert-Teboul, N. Laroche-Joubert, S. Marsy, S. Michelet et A. Doucet
URA CNRS 1859, CEA Saclay, DBJC
Bât 520, 91191, Gif sur Yvette

Le but de ce travail a été de déterminer la nature des voies de signalisation mises en jeu lors de l'activation de la H,K-ATPase du CCD de rat par la calcitonine (Ct) et l'isoprotérénol (Iso), en particulier le rôle de la voie adénylylcyclase/AMPc et celui de la voie phospholipase C/ $\text{IP}_3/\text{Ca}^{2+}$.

L'activité H,K-ATPase a été mesurée, avec ou sans hormone, sur des CCD microdisséqués, préincubés ou non avec des inhibiteurs spécifiques ou des anticorps dirigés contre des protéines de signalisation intracellulaire. Dans ce dernier cas, une perméabilisation transitoire à la streptolysine-O a permis à l'anticorps de pénétrer dans la cellule.

Les résultats montrent que 1) la Ct et l'Iso augmentent la concentration intracellulaire de calcium mais n'activent pas la phospholipase C; 2) les pics de calcium sont bloqués par des inhibiteurs spécifiques de la PKA; 3) la stimulation de la H,K-ATPase par la Ct et l'Iso est reproduite par des analogues de l'AMP cyclique et est abolie par l'inhibition de l'adénylyl cyclase; 4) l'inhibition de la protéine kinase A supprime l'effet de l'Iso sur la H,K-ATPase mais pas celui de la Ct; 5) la Ct stimule la phosphorylation de ERK par une voie indépendante de la PKA et l'inhibition de la phosphorylation de ERK abolit l'effet de l'hormone sur la H,K-ATPase; 6) des anticorps dirigés contre le facteur d'échange des guanine-nucléotides Epac I, la petite protéine G Rap-1 et la kinase B-Raf bloquent la stimulation de la H,K-ATPase par la Ct. En revanche, des anticorps dirigés contre des protéines apparentées – la petite protéine G Ras et la kinase Raf-1 – n'ont pas d'effet.

En conclusion, la calcitonine stimule la H,K-ATPase du CCD de rat par un mécanisme dépendant de l'AMP cyclique mais indépendant de la PKA. La stimulation implique une cascade cAMP/Epac I/Rap-1/B-Raf/ERK.

Régulation de l'expression du gène et transduction du signal

EXPRESSION DES ARNm ET EFFETS TONIQUES DU NOUVEAU COUPLE RÉCEPTEUR/LIGAND PTH2/TIP39 DANS LE LIT VASCULAIRE RÉNAL

A. Eichinger, N. Taesch, T. Massfelder, S. Fritsch, M. Barthelmebs et J.-J. Helwig
Pharmacologie & Physiologie Rénovasculaires (E0015 INSERM-ULP)
Strasbourg

Le RPTH₁ est exprimé dans de nombreux tissus. Le RPTH₂ cloné récemment est exprimé dans le cerveau, et à un degré moindre dans les vaisseaux. Alors que le RPTH₁ lie également PTH et PTHrP, le RPTH₂ ne lie que la PTH. La quasi-absence de PTH dans le cerveau a conduit à la purification d'un autre peptide considéré comme étant le vrai ligand endogène du RPTH₂, le peptide tubéroinfundibulaire de 39 acides aminés (TIP39). Le remplacement des résidus 5 et 23 de la PTHrP(1-36) par ceux de la PTH (peptide hybride), transforme la PTHrP en un ligand à la fois du RPTH₂ et du RPTH₁. Nous rapportons ici l'expression des transcrits du TIP39 et du RPTH₂ dans l'arbre artériel intrarénal isolé et dans l'aorte, ainsi que dans les cellules musculaires lisses cultivées à partir de ces vaisseaux. Dans le rein isolé perfusé de rat (RIP), les réponses dilatatrices aux peptides connus pour se lier aux deux récepteurs, ne sont pas augmentées par rapport à celles induites par la PTHrP. Ainsi, un récepteur non-PTH₁ ne semble pas a priori impliqué dans les réponses à ces peptides. En revanche, le TIP39 manifeste une vasoactivité complexe, contractant le RIP à 10 nM et le dilatant à 1, 100 et 1000 nM. La substitution du résidu 4 du peptide hybride par la *p*-ben-zoyl-Phe ([Bpa⁴]peptide hybride), initialement décrit comme un antagoniste sélectif du RPTH₂, manifeste entre nos mains de puissants effets dilatateurs. Surtout, peptide hybride, [Bpa⁴]peptide hybride et TIP39 à 1 µM, ainsi que la PTH (1-34) à 30 nM, sont capables d'induire de nouvelles et fortes vaso-dilatations dans les RIP dont la réponse dilatatrice à la PTHrP est complètement désensibilisée par exposition massive au peptide. En conclusion, les ARNm du TIP39 et du RPTH₂ sont exprimés dans les vaisseaux, y compris les artères rénales et le TIP39 apparaît comme un nouveau facteur vasoactif. S'ils ne démontrent pas l'implication du RPTH₂, ces résultats révèlent en revanche, que le TIP39, ainsi que les peptides dérivés de la PTH connus pour se lier au RPTH₂, sont capables de dilater les artères rénales via un récepteur qui n'est pas le RPTH₁. Le TIP39, en coordination avec la PTHrP, pourrait donc être impliqué dans l'homéostasie de l'hémodynamique rénale.

EXPRESSION TISSU-SPÉCIFIQUE ET REGULÉE D'UN FRAGMENT DE 12,1 KB DU PROMOTEUR HUMAIN DE LA RÉNINE CHEZ LA SOURIS TRANSGÉNIQUE : MISE EN ÉVIDENCE DE L'EXPRESSION DU GÈNE DE LA RÉNINE DANS LES GROSSES ARTÈRES

S. Fuchs, S. Germain, J. Philippe, P. Corvol et F. Pinet*
INSERM U36, Collège de France, 11 place M. Berthelot, 75005 Paris, France
*INSERM U508, Institut Pasteur, 1 rue Calmette, 59019 Lille cedex, France

La rénine catalyse l'étape limitante du système rénine-angiotensine (SAR) dont l'effecteur principal est l'angiotensine II. Le SAR joue un rôle central dans le contrôle de la pression artérielle et l'homéostasie hydrosodée. La rénine est majoritairement sécrétée par les cellules juxtaglomérulaires du rein. Nous avons criblé par transgénèse transitoire l'expression de la β -galactosidase exprimée sous la dépendance de fragments de tailles variables du promoteur de la rénine humaine chez les fondateurs au 15^e jour de développement. Un fragment de 12,1 kb du promoteur de la rénine humaine permet une expression majoritairement rénale. Au stade adulte, le même type d'expression de β -galactosidase a été retrouvée au niveau rénal et plus faiblement au niveau des surrénales et du cerveau. Cette expression de la β -galactosidase est superposable, tant par sa localisation que par son intensité, à l'expression de la rénine endogène murine. Au niveau du rein, la β -galactosidase est coexprimée avec la rénine dans les cellules juxtaglomérulaires des artérioles afférentes. Les animaux ont été soumis à deux conditions physiopathologiques où la rénine est surexprimée : un modèle de déplétion sodée et le modèle d'hypertension renovasculaire (Goldblatt). Dans ces deux conditions, une induction comparable de l'expression de la β -galactosidase et de la rénine est observée. Cette stimulation s'accompagne d'un recrutement continu des cellules musculaires lisses des artérioles afférentes et d'une expression de la β -galactosidase et de la rénine dans les artères de plus gros calibres. Dans ces artères (interlobulaires, rénales, aortes et fémorales) le recrutement des cellules productrices de rénine se fait de façon discontinue avec une alternance de cellules musculaires lisses, organisées en anneaux, exprimant la rénine, séparées par des portions de vaisseaux n'exprimant pas la rénine. Cette lignée de souris transgénique constitue donc un très bon modèle pour étudier la régulation temporo-spatiale et physiologique de la rénine par mesure de l'expression de la β -galactosidase.

LE RÉCEPTEUR DE LA RÉNINE: RÔLE DANS L'ACTIVATION DE ERK1/2 ET DANS LA GÉNÉRATION D'ANGIOTENSINE II À LA SURFACE CELLULAIRE

Céline Burcklé, Françoise Delarue, Jean-Daniel Sraer et Geneviève Nguyen
Inserm U489, Hôpital Tenon
4 rue de la Chine, 75020, Paris

Nous avons montré l'existence d'un récepteur de la rénine sur cellules mésangiales et nous avons cloné son ADNc. L'ADNC code pour une protéine de 350 aa comportant un domaine trans-membranaire, des résidus sérine et tyrosine, ainsi que le motif YXXIXY pouvant fixer une SH2-kinase, dans le domaine cytoplasmique. La fixation de la rénine induit une phosphorylation de résidus sérine et tyrosine, et l'activation des MAP kinases MEK1/2 et ERK1/2. Cette activation est totalement inhibée par des inhibiteurs des tyrosine-kinases (génistéine et PD98059, spécifique de MEK1/2) mais elle n'est pas modifiée par PP2 (inhibiteur de SH2-kinase), confirmant que la phosphorylation d'une tyrosine n'est pas impliquée dans l'activation de MEK1/2-ERK1/2. La comparaison des cinétiques d'activation de l'angiotensinogène (Aog) par la rénine en phase soluble ou bien liée au récepteur montre que la rénine fixée est caractérisée par une diminution du K_m et une augmentation de l'activité catalytique ($K_m = 0,15 \mu M$ et $1,0 \mu M$, et $kcat/K_m = 10,3 \mu M^{-1}s^{-1}$ et $2,3 \mu M^{-1}s^{-1}$ pour la rénine fixée et soluble, respectivement), indiquant que le clivage de l'Aog en angiotensine I (Ang I) est 4 à 5 fois plus efficace lorsque la rénine est fixée, et qu'elle pourrait être importante en physiologie, puisque dans les tissus, la concentration d'angiotensinogène est plus faible que dans le plasma. Par Northern blot, l'ARNm du récepteur est retrouvé en abondance dans le cerveau, le cœur et le placenta, et à un moindre degré dans le rein, le foie et le pancréas. L'immunomarquage de coupes de rein et de cœur humain avec l'anticorps anti-récepteur met en évidence un marquage glomérulaire et du sous-endothélium des artères rénales et coronaires, spécifiquement au niveau des cellules mésangiales et musculaires lisses vasculaires. En conclusion, nos résultats suggèrent que ce récepteur possède au moins deux fonctions : celle de transmettre un signal cellulaire impliquant la voie des MAP kinases ERK1/2 ; une fonction de cofacteur en augmentant l'efficacité de clivage de l'Aog, et donc en facilitant la génération d'Ang I à la surface cellulaire. La découverte du récepteur de la rénine ouvre de nouvelles perspectives pour une meilleure compréhension des phénomènes pathologiques associés à l'activation du système rénine-angiotensine.

CARACTÉRISATION DE NDRG2 (N-myc Downstream Regulated Gene2), UN NOUVEAU GÈNE RAPIDEMENT INDUIT PAR L'ALDOSTÉRONNE DANS LE REIN DE RAT

S. Boulkroun, M. Fay, M-C Zennaro, B. Escoubet*, F. Jaisser, M.Blot-Chaubaud, N. Farman et N. Courtois-Coutry
INSERM U478 et U426*, Faculté X. Bichat, Paris, France

Dans le tubule collecteur, l'aldostérone régule finement la réabsorption du sodium par un contrôle coordonné de l'activité et du nombre de transporteurs ioniques (canal sodique ENaC, Na/K ATPase). Cependant les protéines induites par l'hormone de façon primaire et précoce ne sont pas encore caractérisées. Par hybridation soustractive à partir de tubules collecteurs rénaux de rats traités ou non 45 minutes par une dose physiologique d'aldostérone, nous avons isolé une EST (Expressed Sequence Tag). L'identification de sa séquence complète a permis de cloner chez le rat 4 variants d'épissage de l'homologue murin et humain de NDRG2 (N-myc Downstream Regulated Gene 2). Ce gène appartient à une nouvelle famille récemment décrite, qui comporte 4 membres (NDRG1-NDRG4), et qui semble impliquée dans les phénomènes de réponse au stress des cellules ainsi que dans la différenciation cellulaire. L'ARNm codant pour NDRG2 (détecté par RNase protection) est exprimé dans des tissus sensibles à l'aldostérone classiques (rein, colon distal...), mais également dans d'autres tissus comme le cœur, le muscle squelettique et l'aorte. Dans le rein, son expression est restreinte aux tubules collecteurs (hybridation *in situ*). *In vivo*, l'injection d'une dose physiologique d'hormone induit une augmentation rapide (45 minutes) du taux d'ARNm codant pour NDRG2 dans le rein et le colon (environ 70%), mais n'a aucun effet dans le cœur. Nous avons également étudié les variations d'expression de NDRG2 *in vitro* en utilisant un modèle cellulaire de tubules collecteurs de rats : les cellules RCCD2. Dans ces cellules, l'aldostérone induit une augmentation de 250% de l'expression des ARNm codant pour NDRG2 (détecté par PCR quantitative) dès 15 minutes alors que le glucocorticoïde dexaméthasone est inefficace, suggérant que l'effet de l'aldostérone est transmis via le récepteur minéralocorticoïde. L'ensemble de ces résultats suggère que NDRG2 est un effecteur potentiel des effets précoces de l'aldostérone. Son rôle fonctionnel reste à définir.

EFFETS DU MÉTABOLISME DES HORMONES GLUCOCORTICOÏDES PAR LA 11- β HYDROSTÉROÏDE DÉSHYDROGÉNASE HUMAINE DE TYPE 2 ET MODULATION DE L'ACTIVITÉ TRANSCRIPTIONNELLE DU RÉCEPTEUR MINÉRALOCORTICOÏDE HUMAIN

B. Bocchi, F. Cluzeaud, M. Fay, J. Fagart, M.E. Rafestin-Oblin et N. Farman
INSERM U478, IFR02, Université Paris 7, Faculté de Médecine X. Bichat
BP 416, 75870 Paris Cedex 18, France

L'aldostérone régule la réabsorption de sodium en se fixant au récepteur minéralocorticoïde (RM), un facteur transcriptionnel ligand-dépendant appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires. Le RM a la même affinité pour l'aldostérone et les hormones glucocorticoïdes (cortisol chez l'homme et corticostérone chez les rongeurs) qui sont présentes dans le plasma à des concentrations 100 fois à 1000 fois plus élevées que l'aldostérone. L'occupation permanente du RM par les glucocorticoïdes est prévenue par une enzyme: la 11- β hydrostéroïde déshydrogénase de type 2 (11-HSD2) qui métabolise les hormones glucocorticoïdes en des dérivés 11-déshydrogénés (cortisone, 11-déhydrocorticostérone (11-DHC)) ayant peu d'affinité pour le RM, comme le récepteur glucocorticoïde (RG). Ainsi la co-expression de la 11-HSD2 et du RM dans les cellules cibles de l'aldostérone assure la sélectivité minéralocorticoïde.

Nous avons voulu évaluer l'effet de l'expression de la 11-HSD2 sur l'activité transcriptionnelle du RM. Une lignée cellulaire dérivée du tubule collecteur (RCCD1) transfectée de façon stable avec la 11-HSD2 humaine a été établie (clone C18); elle exprime l'enzyme à un niveau comparable à celle du tubule collecteur. Nous avons testé les effets agonistes et antagonistes de la 11-DHC sur l'activité transcriptionnelle du RM exprimé de façon transitoire dans les cellules C18, en présence d'un gène rapporteur (la luciférase) placé sous le contrôle du promoteur MMTV.

Dans les C18, l'activité transactivatrice du RM en réponse à la corticostérone est faible, en raison du métabolisme en 11-DHC. La 11-DHC, elle-même, s'avère avoir une faible activité agoniste détectée à 10^{-7} M et est capable d'inhiber partiellement l'activité induite par l'aldostérone à cette dose. La 11-DHC se comporte donc comme un agoniste partiel. L'analyse du positionnement de la corticostérone et de la 11-DHC dans un modèle tridimensionnel du domaine de liaison à l'hormone du RM permet de comprendre les raisons de cette activité agoniste partielle, en comparaison avec l'aldostérone.

STABILISATION DES TRANSCRITS DE CFTR AU COURS DE STIMULATIONS EXTRACELLULAIRES

Amandine Jaulmes, Maryvonne Baudouin-Legros et Aleksander Edelman
INSERM U.467, Faculté de médecine Necker, 75015 Paris

Une bonne stabilité des ARNm de CFTR exprimés à partir d'un gène transfecté est nécessaire à la réussite d'une thérapie génique de la mucoviscidose. Nous avons étudié la stabilité des transcrits de CFTR dans des cellules stimulées par l'ouabaine et l'interleukine 1 β (IL-1 β) susceptibles d'activer des voies transductionnelles impliquées dans le contrôle de la stabilité des ARNm (Voies des MAP kinases).

L'étude a été réalisée sur une lignée de cellules pulmonaires humaines (Calu-3) qui expriment le gène CFTR, puis sur des cellules HeLa transfectées de façon stable avec l'ADNc de CFTR complété ou non d'une partie de la séquence 3' non-traduite du gène. La stabilité des ARNm de CFTR a été analysée par Northern blot après stimulation des cellules en présence d'actinomycine D, bloqueur de la transcription. La dégradation des transcrits de CFTR a été étudiée par incubation *in vitro* d'ARN extraits des cellules Calu-3 et HeLa transfectées non traitées avec des extraits cytosoliques de cellules traitées par l'ouabaine ou l'IL-1.

L'ouabaine (de $2 \cdot 10^{-8}$ à $5 \cdot 10^{-7}$ M) stabilise, de façon dose-dépendante, les transcrits de CFTR dans les deux types de cellules. Les expériences *in vitro* montrent que les transcrits de CFTR sont spécifiquement moins dégradés par des extraits de protéines cytosoliques solubles (100 000 g) obtenus à partir de cellules traitées par l'ouabaine que par des extraits de cellules contrôles. L'activation des MAP kinases p38 et p42/44 est impliquée dans l'induction de cette protection. L'IL-1 β (250 pg/ml) reproduit l'effet de l'ouabaine sur les cellules Calu-3, mais ne semble protéger que les transcrits CFTR possédant la séquence 3' non-traduite.

RÉGULATION DU COTRANSPORTEUR RÉNAL NKCC2 PAR JNK ET PAR LA PROTÉINE KINASE A (PKA) CHEZ LE RAT DAHL « SENSIBLE AU SEL »

J.M Lou-Bonafonte, M Alvarez-Guerra et R.P. Garay
IM3-INSERM U400

Le rat Dahl « sensible au sel » (DS) possède une hyperactivité du cotransporteur NKCC2 de l'anse de Henlé (branche ascendante: TAL), ce qui conduit à une réabsorption rénale accrue de NaCl (réf. 1). Par ailleurs, NKCC2 est régulé par la vasopressine (AVP), via l'AMP cyclique (AMPc) et la protéine kinase A (PKA) et par JNK. Nous avons donc étudié le rôle de JNK et de la voie AVP-cAMP-PKA dans l'hyperactivité du NKCC2 au niveau du TAL du rat DS.

Des tubules médullaires de TAL (mTAL) sont isolés du rat DS et de son témoin normotendu DR (résistant au sel). L'expression de pJNK est mesurée par Western Blot. L'activité PKA est mesurée par un kit PKA (Sigma TECT, Promega). L'AMPc est mesuré par méthode immunoenzymatique (Kit Cayman). L'activité NKCC2 est mesurée par l'entrée de Rb sensible à la bumétanide.

L'activité PKA est augmentée chez le rat DS ($0,18 \pm 0,06$ vs. $0,075 \pm 0,03$ pmol d'ATP/min/ μ g prot; DS vs. DR, n = 4, p = 0,02). L'expression de pJNK1, mais non celle de pJNK2 est augmentée chez le rat DS. L'AMPc est légèrement augmenté chez le rat DS, mais les différences ne sont pas significatives. L'AVP (0,7 nM) stimule moins NKCC2 chez le rat DS (+13,5%, n = 6) que chez le rat DR (+90%, n = 6, p < 0,02).

En conclusion, le rat DS possède une augmentation d'expression de JNK et d'activité PKA et au niveau du TAL, en dépit d'une moindre stimulation de NKCC2 par l'AVP. L'hyperactivité PKA et/ou JNK pourrait expliquer, au moins en partie, l'hyperactivité de NKCC2 du rat DS.

1. Alvarez-Guerra M, Garay RP. J Hypertension 2002; 20: 1-7.

ACTIN CYTOSKELETON REORGANIZATION IS INVOLVED IN THE REGULATORY VOLUME INCREASE AFTER HYPERTONICITY-INDUCED CELL SHRINKAGE IN RAT MEDULLARY THICK ASCENDING LIMB OF HENLE'S LOOP

Mauro Bustamante, Frank Roger, Pierre-Yves Martin and Eric Féraille
Division de Néphrologie, Fondation pour Recherches Médicales
64 ave de la Roseaie, CH-1211 Genève 4, Switzerland

Our previous work has shown that cell shrinkage but not hyperosmolarity triggers the activation of both extracellular regulated kinase (ERK) and p38 kinase in response to extracellular hypertonicity in the rat kidney medullary thick ascending limb of the Henle's loop (MTAL). Moreover, the regulatory volume increase was dependent on p38 kinase activation. In the present study we have investigated the relationship existing between actin cytoskeleton reorganization, cell volume variation and MAP kinase activation measured by immunofluorescence and the ratio between soluble and insoluble actin in Triton X-100. Hypertonicity induced rapid polymerization of actin filaments, followed by a rapid depolymerization phase and by a slow polymerization phase 10 min after addition of hypertonic medium. Slow actin polymerization was more important in the presence of hypertonic sucrose as compared to NaCl. By contrast, hypertonic urea, which does not modify MAP kinase activity, measured by Western blot with phosphospecific antibody and cellular volume, measured by photography, did not induce slow actin polymerization. Inhibiting p38 kinase with SB 203580 abolished both slow actin polymerization and regulatory volume increase (RVI). ML-7, a Myosin Light Chain Kinase inhibitor, did not change the actin polymerization pattern but completely prevented the RVI. Latrunculin B, a G-actin sequestering agent, attenuated cell shrinkage and enhanced RVI. Jasplakinolide by stabilizing actin filaments abolished RVI. Addition of swinholide A, which disrupts actin cytoskeleton and sequesters actin dimers, decreased the efficiency of RVI. These drugs did not alter the MAP kinase activation pattern in response to extracellular hypertonicity. We conclude that under hypertonic conditions: 1) extracellular hypertonicity induces actin cytoskeleton reorganization; 2) p38 kinase is involved in the reorganization of the actin cytoskeleton; and 3) RVI is dependent of actin cytoskeleton reorganization and MLCK activity.

ARACHIDONIC ACID RELEASE, MMP STIMULATION AND EGF-R TRANSACTIVATION ARE RESPONSIBLE FOR MAPK ACTIVATION BY α 2B-ADRENOCEPTOR IN PROXIMAL TUBULE CELLS

Daniel Cussac, Stéphane Schaak, Colette Denis and Hervé Paris
INSERM Unit 388, Institut L. Bugnard, CHU Rangueil
31403 Toulouse cedex 4, France

We have investigated the mechanisms whereby α 2B-adrenergic receptor (α 2B-AR) promotes MAPK activation in a clone of the renal tubular cell-line, LLC-PK1, transfected with the gene RNG (rat non-glycosylated α 2-AR). Treatment of LLC-PK1- α 2B with UK14304 or dexmedetomidine caused arachidonic acid (AA) release and ERK2 phosphorylation. AA release was abolished by prior treatment of the cells with pertussis toxin, quinacrine or MAFP, but not by addition of the MEK inhibitor U0126. The effects of α 2-agonists on MAPK phosphorylation were mimicked by cell exposure to exogenous AA. On the other hand, quinacrine abolished the effects of UK14304, but not of AA, suggesting that AA released through PLA2 is responsible for MAPK activation by α 2B-AR. The effects of α 2-agonists or AA were PKC-independent and were attenuated by indomethacin and NDGA. Treatment with batimastat, CRM 197 or typhostin AG1478 suppressed MAPK phosphorylation promoted by α 2-agonist or AA. Furthermore, conditioned culture medium from UK14304-treated LLC-PK1- α 2B induced MAPK phosphorylation in wild-type LLC-PK1. Based on these data, we propose a model whereby activation of MAPK by α 2B-AR is mediated through stimulation of PLA2, AA release, generation of AA derivatives, activation of matrix metalloproteinases, release of HB-EGF, transactivation of EGF-R and recruitment of Shc. Whether this pathway is particular to α 2B-AR and LLC-PK1 or whether it can be extended to other cell types and/or other GPCRs remains to be established.

INTRACELLULAR Na^+ INCREASES $\text{Na}_2\text{K-ATPase}$ CELL SURFACE EXPRESSION THROUGH cAMP-INDEPENDENT PKA ACTIVATION IN MAMMALIAN COLLECTING DUCT CELLS

Manlio Vinciguerra¹, Georges Deschenes², Alain Vandewalle³, Alain Doucet², Pierre-Yves Martin¹ and Eric Féraïlle¹

¹ Fondation pour Recherches Médicales, 64, Av. de la Roseraie, 1211, Genève, Suisse.

² INSERM, Unité 478, Faculté de Médecine Xavier-Bichat, 75870 Paris Cedex 18, France.

³ Laboratoire de Biologie Intégrée des Cellules Renales, Service de Biologie Cellulaire, Gif sur Yvette, France.

The renal collecting duct (CD) is the final site of regulation of sodium excretion. In this nephron segment, $\text{Na}_2\text{K-ATPase}$ activity which generates the driving force for vectorial Na^+ transport is tightly controlled by hormones and intracellular Na^+ . Previous studies performed in isolated mammalian CCDs have shown that raising intracellular Na^+ increased both $\text{Na}_2\text{K-ATPase}$ activity and the number of active $\text{Na}_2\text{K-pumps}$ at the cell surface in an aldosterone-dependent manner. However the mechanism of this effect has not been elucidated. Using mpkCCdCl4 cells, a model of mammalian principal cells, we increased intracellular Na^+ concentration by incubation of cells in the presence of amphotericin B or in the absence of extracellular K^+ . Both procedures increased the cell surface expression of $\text{Na}_2\text{K-ATPase}$ by 30 to 50%, as measured by Western blot after streptavidin precipitation of biotinylated cell-surface proteins. This effect was reproduced in isolated rat CCDs. The increase in cell-surface expression of $\text{Na}_2\text{K-ATPase}$ was Na^+ concentration-dependent and was not observed in aldosterone-depleted cells. Preincubation of cells with two structurally unrelated PKA inhibitors, H89 and Rp-cAMPs, prevented the increase in cell surface expression of $\text{Na}_2\text{K-ATPase}$ in response to high intracellular Na^+ concentration. However, increasing intracellular Na^+ concentration did not alter the intracellular concentration of cAMP. On the other hand, neither bisindolylmaleimide I (a specific PKC inhibitor), nor ML-7 (a specific myosin light-chain kinase inhibitor) altered the effect of increased intracellular Na^+ concentration. These results were confirmed in isolated rat CCDs. In conclusion, raising intracellular Na^+ concentration increases the cell-surface expression of $\text{Na}_2\text{K-ATPase}$ through cAMP-independent PKA activation.

DISTINCT ROLES FOR JUN-N-TERMINAL KINASE AND NF- κ B IN THE REGULATION OF α (2) TYPE I COLLAGEN GENE (*COL1A2*) GENE EXPRESSION BY TUMOR NECROSIS FACTOR- α

¹Franck Verrecchia, ²Erwin F. Wagner and ¹Alain Mauviel

¹INSERM U532, Institut de recherche sur la Peau, Hôpital Saint-Louis, Paris, France

²Research Institute for Molecular Pathology, University of Vienna, Vienna, Austria

We have investigated the signaling events underlying the antagonistic activity of TNF- α against TGF β -induced α (2) type I collagen gene (*COL1A2*) promoter transactivation. Transient transfection experiments using human dermal fibroblasts showed that expression of a dominant negative mutant form of MAP kinase kinase 4 (MKK4), blocking Jun N-terminal kinase (JNK) activation, prevented the antagonistic effect of TNF- α against TGF- β , whereas overexpression of a dominant-negative form of I- κ B kinase- α (IKK- α), preventing NF- κ B activation by TNF- α , did not. Next, using *JNK1-JNK2* double knockout (*JNK^{-/-}*) and *IKK- γ* NF- κ B Essential Modulator^{-/-} (*NEMO^{-/-}*) fibroblasts, in which the extent of *COL1A2* promoter transactivation by TGF- β is comparable to that observed in wild-type fibroblasts, we examined the specific roles played by the Jun N-terminal kinase (JNK)/AP-1 and NF- κ B/Rel pathways in mediating TNF- α inhibitory activity. In a cellular context devoid of JNK activity (i.e. *JNK^{-/-}* fibroblasts), exogenous TNF- α , or co-expressed c-Jun, did not inhibit Smad-driven *COL1A2* promoter transactivation induced by TGF- β , unless *jnk1* was re-introduced ectopically. On the other hand, in *NEMO^{-/-}* fibroblasts, the absence of NF- κ B activity did not affect the antagonistic activity of TNF- α against TGF- β , but prevented repression of basal *COL1A2* promoter activity by TNF- α . Cytokine modulation of endogenous type I collagen expression followed that of the transfected promoter reporter constructs, as estimated both at the protein and mRNA levels. In *NEMO^{-/-}* fibroblasts, overexpression of an antisense *c-jun* vector, and that of dominant-negative MKK4, blocked TNF- α antagonism against TGF- β . These results provide definitive evidence for a critical role of JNK activation, and resulting phosphorylation of c-Jun, in mediating the antagonistic effect of TNF- α on the upregulation of type I collagen gene expression by TGF- β whereas NF- κ B mediates the direct effect of TNF- α on basal *COL1A2* expression.

Nouvelles approches et apport des modèles animaux à la physiologie et à la physiopathologie

REGULATION OF THE PROXIMAL TUBULAR SODIUM/PROTON EXCHANGER NHE3 IN RATS WITH PUROMYCIN AMINONUCLEOSIDE (PAN) INDUCED NEPHROTIC SYNDROME

Valérie Besse-Eschmann¹, Jelena Klisic², Michel Le Hir¹, Brigitte Kaissling¹ and Patrice M. Ambühl^{2,3}

¹ Institute of Anatomy, University of Zurich, Switzerland

² Institute of Physiology, University of Zurich, Switzerland

³ Renal Division, University Hospital, Zurich, Switzerland

Institute of Anatomy, University of Zurich-Irchel, Winterthurerstrasse 190, CH-8057 Zurich

Excessive proteinuria due to loss of glomerular permselectivity in nephrotic syndrome can cause disturbances in renal salt and water handling with edema formation. Apart from oncotic and hydrostatic mechanisms associated with hypoalbuminemia, primary derangements in renal tubular sodium transport may contribute to the pathogenesis of nephrotic edema. Whereas there is evidence for an increase of cortical collecting duct sodium reabsorption in nephrotic rats, it remains controversial whether proximal tubule sodium transport may also be activated in this conditions. We investigated the regulation of the cortical Na/H exchanger NHE3, the main pathway for Na reabsorption in the proximal tubule (PT), in rats with puromycin aminonucleoside (PAN) induced nephrotic syndrome. PAN rats developed reduced GFR, severe proteinuria and sodium retention within 3 days. After 10 days, immunoblots of brush border vesicles revealed a decreased abundance of NHE3 in nephrotic animals. However, the Na/H antiporter activity in the same vesicle preparations was not significantly altered. Antiporter activity normalized for NHE3 protein was increased by 88% in nephrotic animals ($P = 0.025$). Immunohistochemistry with the same polyclonal antibody as for immunoblots revealed a decrease of NHE3 abundance in PT. In contrast, immunoreactivity for the monoclonal antibody 2B9, that specifically recognizes the non megalin-associated, transport-competent pool of NHE3, was higher in PAN-treated rats than in controls. We propose that increased protein reabsorption might be associated with a shift of NHE3 from an inactive pool to an active pool, thus contributing to sodium retention in proteinuric states.

EXPRESSION CONDITIONNELLE DU RÉCEPTEUR MINÉRALO-CORTICOÏDE HUMAIN DANS UNE LIGNÉE ÉPITHÉLIALE DE CANAL COLLECTEUR DE RAT

Antoine Ouvrard-Pascaud, Stefania Puttini, Yannis Ste-Marie, Gael Palais, Rafika Athman*, Virginie Fontaine, Marie-Edith Oblin-Rafestin, Marcel Blot-Chabaud et Frederic Jaisser

INSERM U478, Faculté de médecine X. Bichat, 75018 Paris

* UMR144, Institut Curie, Paris

Le canal collecteur rénal joue un rôle majeur dans la régulation de l'homéostasie des ions et des fluides. De nombreuses maladies génétiques ont été décrites impliquant des récepteurs ioniques ou des récepteurs hormonaux spécifiquement exprimés dans ce segment du néphron. La lignée cellulaire RCCD2 de canal collecteur cortical de rat développée au laboratoire a conservé les principales caractéristiques physiologiques du tubule natif. L'objectif de ce travail était la mise en place d'un système Cre/loxP permettant l'expression conditionnelle de transgènes dans cette lignée cellulaire. Nous avons testé deux enzymes Cre recombinases inducibles, les Cre-ER² et MerCreMer recombinases, dont l'activité dépend de la présence de Tamoxifène ou 4-OH-Tamoxifène (4-OH-Tam) dans le milieu de culture. D'autre part, nous avons défini une stratégie permettant une sélection rapide et efficace des clones cellulaires inducibles. L'analyse de l'expression conditionnelle d'un gène rapporteur LacZ *via* l'utilisation de la MerCreMer recombinase, stimulée ou non par 10nM de 4-OH-Tam pendant 48 heures démontre l'efficacité de ce système inducible dans les cellules RCCD2, en particulier l'absence de fuite d'activité β -galactosidase en absence d'induction. Dans une seconde étape, nous avons réalisé l'expression conditionnelle d'un transgène codant pour le récepteur minéralocorticoïde humain (eGFP-hRM). L'expression fonctionnelle du récepteur est induite par 48 heures de stimulation avec 10nM de 4-OH-Tam, suivies ou non d'une stimulation par l'aldostérone (Aldo) 10⁻⁹M pendant 24 heures (activité relative du gène rapporteur pour $n = 3$: + 4-OH-Tam - 10⁻⁹M Aldo = 14851 \pm 2142; + 4-OH-Tam + 10⁻⁹M Aldo = 54500 \pm 2055). Ce modèle est utilisé pour l'étude du trafic nucléo-cytoplasmique du RM par vidéo-microscopie. 10⁻⁹M Aldo induit la translocation nucléaire de la totalité des récepteurs eGFP-hRM dans un délai maximum de 30 minutes. En conclusion nous avons développé un système d'expression conditionnelle dans les cellules RCCD2 qui va nous permettre d'analyser les relations structure-fonctions du hRM dans un modèle proche des conditions physiologiques.

PHYSIOPATHOLOGICAL ROLE OF THE MINERALOCORTICOID RECEPTOR IN CARDIOMYOCYTES: USE OF CONDITIONAL TRANSGENIC MODELS

A. Ouvrard-Pascaud, Y. Sainte-Marie, A. T. Beggah, B. Escoubet*, S. M. Peuchmaur***, C. Delcayre**, N. Farman and F. Jaisser
INSERM U478, *INSERM U426, Hôpital Bichat, **INSERM U127, ***Pathology unit 75000 Paris, France

Aldosterone (Aldo) binds to the mineralocorticoid receptor (MR) in the kidney and in the heart where deleterious effects of aldo have been suggested. To assess the role of MR in the heart independently of the kidney, we generated transgenic mouse models that allows spatio-temporal control of the MR expression *in vivo*. Inducible expression of a 320 bp murine MR antisense mRNA (mMR-AS) was obtained in double-transgenic (DT) mice by mating donor MHC-tet OFF and acceptor tetO-mMR-AS mice. mMR-AS mRNA expression is restricted to cardiomyocytes and can be repressed when mice receive Doxycycline (Dox). mMR-AS mRNA expression results in 55% decrease in the steady state level of endogenous mMR mRNA. This was completely reversed with 10 days Dox administration. DT mice develop heart failure leading to death within 3-4 months. Echocardiography showed that DT mice progressively develop hypertrophic dilated hypokinetic cardiomyopathy. Cardiac remodeling with extensive interstitial fibrosis is observed (% control: 0.32 \pm 0.05; DT: 2.53 \pm 0.31; $p < 0.01$). A synergistic effect of Spironolactone with the MR antisense expression is observed, when Spiro is given to 1-month old mice. Importantly, the cardiopathy is fully reversible if transgene expression is turned OFF in 2 -mo old mice.

We are currently analysing a mirror model, i.e. with conditional, cardiac specific over-expression of the human MR. These conditional models will help to define the physio-pathological role of MR in cardiomyocytes.

DISTRIBUTION DES ARNm DES CANAUX CIC-K1 ET CIC-K2 LE LONG DU DCT DE SOURIS; UNE ÉTUDE PAR RT-PCR SUR CELLULE UNIQUE

A. Nissant, S. Baillet, S. Lourdel, J. Teulon et M. Imbert-Teboul
INSERM U426, Faculté Xavier Bichat, Paris et URA CNRS 1859, CEA Saclay, DBJC Bât 520, 91191 Gif sur Yvette

Si différents arguments permettent de postuler un rôle pour le canal CIC-K2 dans le transport de NaCl au niveau du tubule distal (DCT), on ignore encore le rôle du canal CIC-K1. Sa présence dans le DCT est même controversée.

Ayant démontré que les ARNm des deux types de canaux sont exprimés dans le DCT de souris, nous avons utilisé une approche de RT-PCR sur cellule unique pour étudier leur expression relative dans les parties précoce (DCT1) et tardive (DCT2) de ce segment. Le cytosol a été prélevé avec une pipette de patch clamp, en configuration « cellule attachée », sur des DCT microdisséqués après traitement à la collagénase. La transcription inverse des ARNm a été réalisée avec des amorces aléatoires et les cDNAs obtenus ont été amplifiés en deux étapes successives de PCR: 1) une PCR1 dans laquelle ont été coamplifiés des fragments d'ADN spécifiques de CIC-K1, de CIC-K2 et de marqueurs du segment large ascendant de l'anse de Henle (le cotransporteur Na/K/2Cl, NKCC2), du tubule connecteur (le récepteur V2 de la vasopressine, V2-R), de l'ensemble du DCT (le cotransporteur NaCl, NCCT), et du DCT2 vs le DCT1 (la sous unité β du canal sodium, β ENaC); 2) une série de six PCR2 spécifiques de chacune des séquences étudiées.

Vingt cellules de DCT ont été patchées (10 cellules de DCT1 à moins de 100 μ m de la *macula densa* et 10 cellules de DCT2 au delà de 300 μ m). Aucune n'exprime NKCC2 ou V2-R, et seules les cellules de DCT2 expriment β ENaC. La majorité (8/10) des cellules du DCT1 n'expriment que CIC-K2 alors que la majorité (6/10) des cellules du DCT2 co-expriment CIC-K1 et CIC-K2, trois d'entre elles (à 320 μ m de la *macula densa*) ayant un signal CIC-K1 supérieur au signal CIC-K2.

En conclusion, le DCT1 est un modèle qui devrait permettre de caractériser les propriétés du canal CIC-K2 sur des cellules natives.

L'INACTIVATION DU GÈNE NCC ENTRAÎNE UNE AUGMENTATION DE LA MASSE MINÉRALE OSSEUSE

L. Nicolet-Barousse¹, A. Blanchard¹, M. Bloch², P. Meneton², C. Roux³, P. Houillier¹, M. Paillard¹ et MC. De Vernejoul⁴
INSERM ¹U 356, ²U367, ⁴U349 ^{1,2}IFR58 15, rue de l'École de Médecine 75270 Paris Cedex 6, ³Hôpital Cochin

Introduction : Les diurétiques thiazidiques, qui inhibent le transporteur rénal Na-Cl (NCC), diminuent le risque fracturaire chez les sujets âgés, en réduisant la perte de masse osseuse. Pour évaluer le rôle de NCC dans le déterminisme génétique de la masse minérale osseuse, des études complémentaires ont été menées chez les patients porteurs d'un syndrome de Gitelman (GS) et une lignée de souris invalidées pour le gène du NCC (NCC^{-/-}). **Méthodes :** Le métabolisme phosphocalcique a été exploré chez 34 patients porteurs d'un GS génétiquement prouvé, et comparé à 55 sujets contrôles (CS). Une mesure de la densité minérale osseuse (DMO) a été effectuée par DXA chez 10 patients. Chez des souris sauvages NCC^{+/+} (n = 24) et des souris NCC^{-/-} (n = 24), le métabolisme phosphocalcique a été étudié en cage métabolique, la DMO a été mesurée par DXA complétée par une analyse histomorphométrique du fémur après administration de tétracyclines. **Résultats :** Chez les patients, la calcémie ionisée (1,15⁺ vs 1,21 mmol/l, GS vs CS) et la valeur de parathormone (22⁺ vs 32 pg/ml) étaient diminuées suggérant un hypoparathyroïdisme relatif. La magnésémie était diminuée (0,58⁺ vs 0,77 mmol/l). La charge filtrée en calcium était normale, associée à une hypocalciurie (0,06⁺ vs 0,16 mmol/mmol de créatinine), témoignant d'une augmentation de la réabsorption rénale du calcium. La DMO corticale et trabéculaire était augmentée d'environ 10%. La valeur d'ostéocalcine en calcium était normale, associée à une hypocalciurie (0,66⁺ vs 25 pg/ml), à une calciurie diminuée (0,29⁺ vs 0,39 mmol/mmol de créatinine) et à une magnésémie basse (0,88⁺ vs 1,12 mmol/l). La DMO corticale et trabéculaire était augmentée d'environ 5%. L'analyse histomorphométrique montrait une augmentation de l'épaisseur corticale, une diminution de l'activité à la fois ostéoblastique (diminution de l'épaisseur trabéculaire) et ostéoclastique (diminution de la surface de résorption endostéale), suggérant une diminution du remodelage osseux. **Conclusion :** La DMO est augmentée dans les deux modèles d'inactivation du gène du NCC. L'hypocalcémie ionisée observée en dépit d'une réabsorption rénale de calcium augmentée suggère un mécanisme extra rénal à la diminution du remodelage osseux, secondaire à un hypoparathyroïdisme relatif (homme) et/ou une résistance aux effets osseux de la PTH (souris). Ces derniers peuvent être expliqués par la déplétion en magnésium. (*p < 0,05).

MODULATION DU TONUS RÉNAL CHEZ LA SOURIS : ÉLABORATION D'UN MODÈLE DE REIN ISOLÉ PERFUSÉ

S. Fritsch, M. Barthelmebs et J.-J. Helwig
Pharmacologie & Physiologie Rénovasculaires (E0015 INSERM-ULP), Strasbourg

L'étude des systèmes physiologiques chez l'animal, se focalise de plus en plus sur la souris chez laquelle a pu être élaborée la majorité des modèles de transgène ou d'inactivation de gène. Il en est ainsi pour les études des gènes impliqués dans la régulation des fonctions physiologiques cardiovasculaire et rénale, dont les modèles expérimentaux devront inévitablement être adaptés à la souris. Le rein isolé perfusé (RIP) de rat est un modèle ancien pour l'étude des fonctions rénovasculaires. Il permet notamment de s'affranchir de l'influence des connexions nerveuses, ainsi que des facteurs circulants pour caractériser les propriétés vasoactives des facteurs agissant sur les modes auto-, para- et endocrines. Nous rapportons ici un modèle de RIP de souris (C3H, 25-30 g). Après anesthésie (pentobarbital, 4 mg.kg⁻¹ en *ip*) sous oxygénation constante, laparotomie médiane, ligature sous la loupe de l'aorte, de la veine cave, de l'artère surrenale (Ethicon 8/0) et de toutes les autres collatérales situées sous le carrefour aorto-réno-mésentérique (Ethicon 8/0), le rein droit (-0,2g) est perfusé, sans période d'ischémie, via un cathéter (diamètre: 0,55 mm) placé dans l'artère mésentérique. Le rein droit est isolé puis placé sur une coupelle thermostatée. Il est perfusé dans un circuit ouvert, à débit constant (10-11 ml.min⁻¹.g⁻¹ à 37°C), débit ajusté au cours d'une période d'équilibration d'une hr pour atteindre une pression de perfusion de 70-80 mmHg (résistance vasculaire de ~7 mmHg.min.g.ml⁻¹). Le perfusé est un tampon Tyrodes pH 7,4 glucosé et bicarbonaté. Ces montages manifestent une grande réactivité vasculaire. L'infusion d'Ang II (1 à 100 nM) pendant 17 sec toutes les 250 sec induit des pics de constriction successifs de 20-80 mmHg, constriction inhibées jusqu'à 50% par l'acétylcholine (1 µM). La libération de rénine basale ou stimulée par l'isoprotérénol dans le perfusé veineux, a pu être mesurée par la capacité du perfusé à former l'Ang I à partir de l'angio^{ème} de rat. **En conclusion,** nous avons adapté avec succès le modèle du RIP de rat à la souris. Si ces montages permettent d'envisager l'exploration de la réactivité rénovasculaire dans diverses souches mutées de souris, d'autres études sont en cours pour déterminer l'adaptation de ce modèle à la mesure de la filtration glomérulaire et à l'exploration des fonctions tubulaires.

TUBULAR ATROPHY IN A MURINE MODEL OF CRESCENTIC GLOMERULONEPHRITIS

Michel Le Hir and Valérie Besse-Eschmann
Institute of Anatomy, University of Zurich
8057 Zurich, Switzerland

Nephron loss is a major factor of renal failure observed in many glomerular diseases. There is no consent about how glomerular inflammation may result in tubular degeneration. Most authors put forward the toxicity of filtered proteins and/or interstitial inflammation. We investigated the morphological aspects of tubular degeneration in anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis in mice. Kidneys were fixed by perfusion and examined by light- and electron microscopy and by immunohistochemistry. The data suggest that tubular degeneration started with cellular atrophy in the proximal tubule. Atrophy was probably a consequence of restricted filtrate flow since it was regularly associated with the obstruction of the initial proximal tubule by a cellular crescent. Interstitial inflammation developed at the vicinity of atrophic tubules. Inflammatory infiltration in tubules themselves was observed only at late stages of tubular degeneration and it was preceded by the expression of adhesion molecules in tubular cells. Whereas induction of ICAM-1 in glomerulonephritic mice was seen in healthy tubules as well as in atrophic tubules, expression of CD44 and VCAM-1 appeared specific for atrophic tubules. In conclusion, in a similar way as described earlier for focal segmental glomerulosclerosis, in crescentic glomerulonephritis nephron loss may be initiated by the progression of a glomerular lesion into the proximal tubule. Interstitial inflammation would then be a consequence and not the cause of tubular degeneration.

RÔLE DE LA KALLICRÉINE TISSULAIRE DANS LE TRANSPORT TUBULAIRE RÉNAL DE CALCIUM

N. Picard, C. Campone, M. Bloch, M. Paillard, P. Meneton et P. Houillier
InsERM U 356, IFR58, 15, rue de l'École de Médecine 75270 Paris Cedex 6
InsERM U 367, IFR 58, 17 rue du Fer à moulin, 75005 Paris

Introduction : La réabsorption tubulaire rénale de calcium (Ca) est un déterminant essentiel de la valeur de calcémie et de l'excrétion urinaire de Ca. Elle est contrôlée par de nombreux facteurs hormonaux (PTH, calcitriol) ou non hormonaux (volume extracellulaire, calcémie, magnésémie, ...). Cependant, les facteurs intrarénaux impliqués dans le contrôle du transport de Ca sont mal connus. Une part importante (~10%) du Ca filtré est réabsorbée dans le tubule contourné distal et le canal connecteur. Ces segments coexpriment également et spécifiquement la kallibréine tissulaire (KT) qui pourrait jouer un rôle dans la régulation du transport rénal de Ca.

Matériels et méthode : Des souris sauvages 129 Sv (KT^{+/+}, n = 28) et des souris déficientes en KT (KT^{-/-}, n = 28) ont été étudiées après 2 semaines d'adaptation à un régime semi-synthétique normosodé (0,9%) et normocalcique (0,6%). Un premier recueil d'urine de 24 h a été effectué en cage métabolique au début de l'étude (J0). Puis, la moitié des souris KT^{+/+} et KT^{-/-} a reçu le même régime alors que l'autre moitié a reçu un régime normosodé mais pauvre en calcium (0,02%). Un nouveau recueil d'urine de 24 h a été effectué à 1 semaine (J7) et 2 semaines (J15). Un prélèvement sanguin a été effectué à J0 et J15.

Résultats : Le poids des animaux, la quantité de nourriture ingérée, la créatininurie et la natriurèse des 24 h ne variaient pas au cours de l'étude et étaient similaires dans les deux génotypes. En régime normocalcique, les souris KT^{-/-} excrétaient significativement plus de Ca que les souris KT^{+/+} (1,34 ± 0,13 vs 1,06 ± 0,07 mmol/mmol créatinine). Les valeurs de calcémie étaient similaires entre les deux génotypes. En régime pauvre en Ca, la calciurie diminuait significativement dans les 2 génotypes (de 1,59 ± 0,25 (J0) à 0,43 ± 0,05 dans le groupe KT^{-/-} et de 1,09 ± 0,14 (J0) à 0,32 ± 0,04 mmol/mmol créatinine dans le groupe KT^{+/+}). La calcémie ne variait pas dans le groupe KT^{+/+} mais diminuait significativement (de 1,96 ± 0,07 à 1,55 ± 0,06 mM) dans le groupe KT^{-/-}. Les concentrations de PTH, de calcitriol et de magnésium étaient identiques dans les deux génotypes.

Conclusion : En régime normal, les souris KT^{-/-} excrétaient plus de Ca que les souris KT^{+/+} et ont une calcémie identique; en régime pauvre en Ca, les souris KT^{-/-} excrétaient une quantité de Ca similaire à celle des souris KT^{+/+} en dépit d'une diminution significative de leur calcémie; l'ensemble démontrant une diminution de la réabsorption tubulaire de Ca chez les souris KT^{-/-}, qui apparaît indépendante de la PTH et du calcitriol. Ces données suggèrent que la KT peut être un facteur local intrarénal contrôlant le transport tubulaire de Ca.

RÔLE AUTOCRINE ET PARACRINE DE L'UROTENSINE II DANS DES CELLULES ÉPITHÉLIALES RÉNALES HUMAINES

Sophie Vandermeersch,*Elizabeth Scalbert, Raymond Ardaillou, Jean-Claude Dussaule et Dominique Chansel
U489, INSERM, Hôpital Tenon, 4, rue de la Chine, 75020, Paris, France
*IRIS, 92415, Courbevoie Cedex France

L'urotensine II est un peptide initialement isolé de l'urophyse des poissons téléostéens. Ce peptide a été détecté chez l'homme dans différents tissus, en particulier dans les motoneurons de la moelle. Il agit comme un vasoconstricteur artériel *in vivo* et *in vitro*, plus puissant que l'angiotensine II ou que l'endothéline. L'urotensine II humaine (hU-II) est un peptide cyclique de 11 acides aminés, provenant du clivage d'un prépropeptide de 130 acides aminés. Il est présent dans le sang et sa concentration plasmatique est augmentée chez les patients atteints d'insuffisance rénale chronique. Le récepteur orphelin « GPR 14 », récepteur à 7 domaines transmembranaires lié à une protéine G, a été identifié comme étant le récepteur naturel de U-II.

Le but de notre travail est : 1- d'examiner dans différentes lignées cellulaires rénales humaines la présence du récepteur de hU-II, de le caractériser et d'étudier ses voies de signalisation; 2- de rechercher si ces mêmes cellules synthétisent le peptide. Pour cela nous avons cultivé des cellules épithéliales glomérulaires provenant de glomérules de reins humains de cadavres refusés pour la transplantation et des cellules épithéliales tubulaires proximales provenant d'une lignée commerciale (HK2). Nos premiers résultats montrent que ¹²⁵I hU-II se fixe de façon spécifique sur ces deux types cellulaires. La fixation non spécifique représente 20 à 30% de la fixation totale en l'absence d'inhibiteurs de peptidases dans le milieu d'incubation. Un équilibre stable est obtenu après 45 minutes d'incubation à 37°C. Les expériences de saturation à l'équilibre montrent l'existence d'un seul groupe de sites récepteurs. La constante d'affinité est de l'ordre du nanomolaire et le nombre de sites (B_{max}) est faible, 40 fmol/mg de protéines. La présence de l'ARNm du prépropeptide a été mise en évidence par RT-PCR dans les cellules HK2. Ces résultats préliminaires démontrent l'existence d'un système autocrine et paracrine de hU-II dans l'épithélium tubulaire humain et indiquent qu'en plus de ses effets vasomoteurs sur les vaisseaux périphériques, hU-II joue un rôle dans le fonctionnement des cellules épithéliales rénales qu'il reste à démontrer.

LA GLYCOLYSE ANAÉROBIE ET LE MÉCANISME DE CONCENTRATION DE L'URINE : MODÉLISATION 2D ET 3D

Hakima YAHYI et S. Randall Thomas
INSERM U.467, Necker Faculty of Medicine, 75015 Paris, France

Depuis les années 50, on a prédit que des osmoles interstitiels pourrait théoriquement contribuer au mécanisme de concentration de l'urine, mais l'idée a été abandonnée par manque de candidats adéquats. Cette idée a été 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). Nous avons montré qu'il suffirait d'environ 100 mOsm d'osmoles « externes » pour contribuer de façon significative au mécanisme de concentration, mais il n'y avait toujours pas d'idée claire quant à une source pour ces osmoles interstitiels. Nous modélisons au sein de notre équipe une hypothèse fort prometteuse, la glycolyse anaérobie (GA) dans la médullaire interne (MI) en tant que source d'osmoles externes, contribuant ainsi à créer le gradient cortico-papillaire d'osmolarité qui sert à concentrer l'urine, par l'argument suivant. Il est connu depuis longtemps 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 particularité importante de la glycolyse anaérobie est qu'à partir d'une molécule de glucose consommée se forme deux molécules de lactate, il y a donc production d'osmoles. Ces deux sucres étant exclus des néphrons ils ont donc un fort pouvoir osmotique susceptible de soustraire de l'eau des néphrons et des canaux collecteurs et donc de concentrer leur contenu. Par ce biais, la production glycolytique de lactate dans la MI pourrait amplifier le recyclage médullaire de NaCl qui constitue 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 suffirait comme explication pour 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 le système de néphrons et canaux collecteurs (2D), avec de plus en plus de détails topologiques (3D). Il est connu que, dans de tels modèles, le recyclage passif de NaCl et urée (principe de base de toute hypothèse jusqu'ici) ne suffisent 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) présente un gradient proche de celui observé, alors que sans l'activité glycolytique, les mêmes modèles montrent un gradient osmotique insignifiant dans la MI. Par rapport aux modèles plus simples, le modèle 3D, qui intègre les recyclages impliquant les faisceaux vasculaires, rend mieux compte du gradient d'urée de la médullaire interne.

CRÉATION D'UN MODÈLE DE SOURIS TRANSGÉNIQUES PRÉSENTANT UNE INACTIVATION GÉNIQUE TISSU-SPÉCIFIQUE DE LA PROTÉINE CFTR DANS LE REIN

Hasseine L., Bertin G., Poujeol C., Rubera I., Poujeol P. et Tauc Michel
Laboratoire de physiologie cellulaire et moléculaire CNRS UMR 6548, Faculté des Sciences de Nice
Parc Valrose, 06108 Nice Cedex 2

La protéine CFTR dont le dysfonctionnement est à l'origine de la mucoviscidose est située sur la membrane apicale des épithéliums des différents organes dont le rein. Il a été établi que la protéine CFTR était impliquée dans la régulation des transports ioniques épithéliaux des tubules rénaux. Cependant, la fonction physiologique précise de cette protéine au niveau rénal reste méconnue. Afin de déterminer le rôle exact de la protéine CFTR et l'impact de la mucoviscidose dans le rein, nous avons choisi de générer un modèle murin présentant une inactivation génique de la protéine CFTR spécifiquement dans le rein en utilisant le système Cre/LoxP. Cette technique consiste à croiser deux lignées de souris transgéniques, l'une exprimant la recombinase Cre sous le contrôle d'un promoteur spécifique du tissu ou organe étudié. L'autre lignée de souris exprime le gène *cfr* muté par injection de sites LoxP qui encadrent l'exon 11. Cette lignée est en cours d'obtention par recombinaison homologe dans des cellules ES injectées dans des blastocystes. Ces derniers sont ensuite réimplantés dans l'utérus d'une souris pseudogestante. Le croisement des deux lignées aboutira à des souris transgéniques homozygotes présentant une inactivation de la protéine CFTR spécifiquement dans le rein. Pour diriger l'expression de la recombinase Cre, nous avons choisi le promoteur du récepteur 2 à la vasopressine spécifique des canaux collecteurs, lieu d'expression de la protéine CFTR dans le rein. Nous avons cloné ce promoteur chez la souris. La spécificité et l'efficacité *in vitro* du promoteur a été confirmée par des transfections transitoires. Des souris transgéniques ont été obtenues par des techniques classiques de transgénèse. Le génotypage des souris transgéniques a permis de détecter sept lignées transgéniques. Actuellement le phénotypage de ces lignées est en cours par des techniques de biologie moléculaire et d'immunohistochimie en croisant ces souris avec des souris transgéniques STOP/LacZ. Les premiers résultats montrent une expression fonctionnelle de la recombinase dans le rein mais aussi dans d'autres organes tels que la rate, le poulmon ou l'intestin en fonction de la lignée étudiée. La lignée 5 semble être intéressante pour inactiver la protéine CFTR dans le rein. Ces lignées de souris, une fois caractérisées peuvent servir à étudier le rôle de transporteurs rénaux ou encore de protéines non rénales exprimées dans d'autres organes tels que la rate ou l'intestin.

ÉTUDE DE L'EXPRESSION DIFFÉRENTIELLE DES PROTÉINES DANS LES CRYPTES DE COLON DISTAL DE SOURIS NORMALES ET INVALIDÉES POUR LE GÈNE CFTR

Noura Ben-Salem¹, Benoît Vallée¹, Danielle Tondelier¹, Noémie Davezac¹, France Demaugre², Aleksander Edelman¹
¹INSERM U.467, ²INSERM U.370 Faculté de Médecine Necker – Enfants Malades
Université Paris V, 156 rue de Vaugirard, 75730 Paris

La mucoviscidose est une maladie monogénique, qui résulte d'une défaillance dans la conductance des ions Cl⁻ au niveau des organes comportant un tissu épithélial, siège de transports hydroélectriques transépithéliaux. Les manifestations cliniques de la mucoviscidose s'associent aux mutations du gène *cfr* codant pour une glycoprotéine transmembranaire : la protéine CFTR. Mais ce qui caractérise la mucoviscidose c'est la difficile corrélation phénotype-génotype, puisque des patients de même génotype CFTR peuvent présenter un tableau clinique très différent. D'autres facteurs, autres que le génotype CFTR, seraient donc impliqués dans la détermination ou la modulation de la mucoviscidose. Le but de notre travail est d'identifier les protéines, qui varient d'un protéome normal à un protéome mucoviscidosique, afin d'expliquer les modulations de phénotype. Méthodes: Le modèle choisi pour étudier les protéomes sain et mucoviscidosique est celui des souris sauvages et invalidées pour le gène *cfr*. Ces dernières n'ont pas d'atteintes pulmonaires mais présentent les mêmes troubles intestinaux que les patients mucoviscidosiques. L'analyse des protéomes totaux, issus des cryptes de colon distal, au niveau desquelles seules les souris normales expriment une activité de type CFTR, est réalisée par électrophorèse bidimensionnelle. Le génotype des souris est vérifié par la présence ou non de la protéine CFTR au niveau des cryptes par immunohistochimie, et par deux tests fonctionnels : la méthode SPO et la technique de court circuit. Résultats: Sur deux souris sauvages et deux souris mutées : sept protéines varient notablement entre les deux types de protéomes. L'analyse de gels bidimensionnels pH 4-7 10% montrent que chez des souris -/-: deux protéines subissent des modifications posttraductionnelles, deux disparaissent et une est surexprimée. Dans la gamme des pH 6-11, deux protéines disparaissent. L'immunohistochimie montre que seules les souris sauvages présentent un marquage fluorescent au niveau des cryptes de colon distal, et la technique de court circuit démontre que seules les souris sauvages possèdent une activité de type CFTR. Conclusion: Ces résultats suggèrent que les phénotypes normaux et mucoviscidosiques ne sont pas seulement associés à des variations d'expression de la protéine CFTR, mais également à celles d'autres protéines. Des expériences sont en cours pour vérifier statistiquement ces différences protéomiques sur un plus grand nombre de souris, et pour identifier chimiquement ces protéines à expression variable par spectrométrie de masse.

ANALYSE DIFFÉRENTIELLE DES PROTÉOMES DE CELLULES HeLa CFTR-WT ET HeLa CFTR-ΔF508

Noélie Davezac¹, Danielle Tondelier¹, Benoit Vallée¹, Claude Jacquemin, France Demaugre² et Aleksander Edelman¹
¹INSERM U467, ²INSERM U370 Faculté de médecine Necker-Enfants malades
 Université Paris V, 156 rue de vaugirard, 75015 Paris

La mucoviscidose est une maladie monogénique causée par des mutations dans le gène codant pour la protéine CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane regulateur), un canal chlore dépendant de l'AMPc présent à la surface des cellules épithéliales. Environ 70% des malades présentent la mutation ΔF508 où la délétion de cette phénylalanine induit un défaut de maturation de la protéine. De plus, les patients porteurs de cette mutation présentent des phénotypes différents laissant penser que d'autres protéines sont impliquées.

Afin d'analyser ces différences, un premier modèle cellulaire est utilisé : des cellules HeLa sur-exprimant la protéine CFTR sauvage ou la forme mutée ΔF508. Plusieurs méthodes ont été utilisées pour l'obtention d'extraits cellulaires totaux (précipitations protéiques, solubilisation directe de l'échantillon). Les extraits ainsi obtenus sont analysés par électrophorèse bidimensionnelle suivie d'une coloration à l'argent ammoniacal. Les premiers résultats montrent des variations d'expression de différentes protéines. Cette méthode ne permettant l'accès qu'aux protéines fortement exprimées, nous développons un protocole de marquage des protéines avec un radioisotope de l'iode (¹²⁵I) qui permettra de mettre en évidence des quantités de l'ordre de la femtomole.

TRANSCRIPTOME LYMPHOCYTAIRE T AU COURS DU SYNDROME NÉPHROTIQUE IDIOPATHIQUE (SNI) DE L'ENFANT

H. Mansour, A. Doucet, J.-C. Aude, J.-M. Elalouf et G. Deschênes
 CNRS, FRE 2468, CEA Saclay
 91191 Gif sur Yvette

Le SNI, dans sa forme corticosensible, est une maladie rénale caractérisée par une protéinurie massive. L'anomalie de perméabilité de la paroi glomérulaire est fonctionnelle, réversible sans séquelles, et sous la dépendance d'un facteur circulant d'origine immunitaire T responsable de la désorganisation des cellules épithéliales glomérulaires. Toutes les tentatives de fractionnement du plasma pour identifier ce facteur circulant ont été vaines. Le but de cette étude est de comparer le transcriptome lymphocytaire T d'un malade en période de protéinurie (Pu+ : protéinurie = 2,45 g/jour, albuminémie = 24 g/l) puis en période de rémission (Pu0 : protéinurie < 0,1 g/j, albuminémie = 42 g/l). Les deux prélèvements ont été faits à distance de tous traitements immunosuppresseurs et glucocorticoïdes. Les lymphocytes T ont été séparés sur des billes magnétiques anti CD2 et les ARNm ont été extraits des lysats cellulaires. La méthode SADE a permis de constituer 2 banques : Pu+ (24431 étiquettes) et Pu0 (25058 étiquettes). La comparaison de ces deux banques par le test de Monte-Carlo a permis de retenir 371 étiquettes dont l'expression est significativement différente (p < 0,05). Parmi les 114 étiquettes surexprimées d'un facteur ≥ 5 dans la banque Pu+, 85 étiquettes correspondent à 114 ADNc identifiables par un cluster Unigene et 29 étiquettes n'ont aucune identification Unigene. Parmi ces 114 ADNc, 9 codent pour des protéines potentiellement sécrétées (1 cytokine, 5 récepteurs, 3 enzymes) et 16 pour des protéines avec un domaine transmembranaire. Une vérification par RT-PCR quantitative concernant 20 transcrits est en cours sur un groupe de 14 malades néphrotiques et un groupe de 11 malades non protéinuriques. En conclusion, cette première approche utilisant le transcriptome lymphocytaire T offre de nouvelles perspectives pour identifier le facteur circulant impliqué dans le mécanisme de la protéinurie du syndrome néphrotique idiopathique.

Apoptose – Prolifération – Remodelage

PROAPOTOTIC CASCADE INDUCED BY DOPAMINE IN RENAL PROXIMAL TUBULE CELLS: INVOLVEMENT OF MONOAMINE OXIDASE-DEPENDENT HYDROGEN PEROXIDE PRODUCTION

Bianchi P., Séguélas M-H., Parini A. and Cambon C.
INSERM U388, Institut Louis Bugnard, CHU Rangueil
31403 Toulouse, France

Dopamine (DA) could induced cell proliferation or apoptosis depending on concentration and cell type, but the mechanisms are still not fully elucidated. We have recently shown that, independently of receptor activation, low concentration of DA induced renal proximal tubule cell proliferation through hydrogen peroxide generated by dopamine-degrading enzyme monoamine oxidases (MAOs). Here we evaluated the effect of highest concentrations of DA on 1) rat proximal tubule cell apoptosis, microscopically by TUNEL assay, DNA ladder and using a fluorescent permeant DNA probe, SYTO-13 and 2) cell signalling leading to apoptosis.

DA (50-200 μ M) induced apoptosis of proximal tubule cells. Moreover this apoptosis process needs increases Bax/Bcl-2 ratio, mitochondria cytochrome c release and caspase-3 activation. These effects require dopamine cell internalisation, metabolism by MAOs and hydrogen peroxide production because they were fully prevented by the DA uptake inhibitor, GBR 12909, the MAO inhibitor, pargyline and the antioxidant N-acetylcysteine. These results support the role of hydrogen peroxide generated by the MAO-dependant dopamine metabolism on mitochondrial dysfunction leading to cell apoptosis.

REGULATION OF JNK/ERK ACTIVATION, CELL APOPTOSIS AND TISSUE REGENERATION BY MONOAMINE OXIDASES AFTER RENAL ISCHEMIA-REPERFUSION

O. Kunduzova, P. Bianchi, G. Escourrou, M. Seguelas, A. Parini and C. Cambon
Inserm U 388, Toulouse

Reactive oxygen species (ROS) contribute to the ischemia-reperfusion injury. In kidney, the intracellular sources of ROS during ischemia-reperfusion are still unclear. In the present study we investigated the role of the catecholamine-degrading enzyme monoamine oxidases (MAOs) in hydrogen peroxide (H_2O_2) generation after reperfusion and their involvement in cell events leading to tissue injury and recovery. In a rat model of renal ischemia-reperfusion, we show a concomitant MAO-dependent H_2O_2 production and lipid peroxidation in the early reperfusion period. Rat pre-treatment with the irreversible MAO inhibitor, pargyline, 1) prevented H_2O_2 production and lipid peroxidation; 2) decreased tubular cell apoptosis and necrosis, measured by TUNEL staining and histomorphological criteria and 3) increased tubular cell proliferation as determined by PCNA expression. MAO inhibition also prevented JNK phosphorylation and promoted ERK activation, two MAP kinases described as a part of a « death » and « survival » pathway after ischemia-reperfusion. This work demonstrates the crucial role of MAOs in mediating the production of injurious ROS, which contribute to acute apoptotic and necrotic cell death induced by renal ischemia-reperfusion *in vivo*. Targeted inhibition of these oxidases could provide a new avenue for therapy to prevent renal damage and promote renal recovery after ischemia-reperfusion.

L'APOPTOSE DES CELLULES DU CORTEX RÉNAL HUMAIN DÉPEND DE LEUR NIVEAU D'OXYGÉNATION

V. Brun¹, B. Ferrier¹, F. Djijoud¹, F. Verrechia², A. Mauviel², G. Baverel¹

¹ INSERM U499, Rue G. Paradin, 69372 LYON cedex 08

² INSERM U532, Hôpital St Louis, pav. Bazin, 1 av Cl. Vellefaux, 75475 Paris Cedex 10

De nombreuses atteintes rénales sont associées à une réduction de l'apport oxygéné. Cependant, les effets de l'hypoxie dans le rein sont encore mal connus. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés aux phénomènes de mort cellulaire (nécrose / apoptose) survenant dans le cortex rénal humain soumis à deux niveaux d'oxygénation. Nous avons utilisé un modèle de tranches fines de cortex rénal humain incubées 24 heures dans un système de fiole tournante; la phase gazeuse comportant soit 20% soit 40% d'oxygène. Des études préliminaires ont montré une réactivité métabolique importante du cortex rénal, en présence de 20% d'oxygène, se manifestant notamment par une glycolyse accrue et une augmentation de la synthèse d'alanine. La combinaison de techniques histologiques et biochimiques (mesures des activités caspases) a permis de mettre en évidence de la nécrose dans les tranches incubées avec 20% d'oxygène et de l'apoptose dans une atmosphère avec 40% d'oxygène. De manière surprenante, le niveau d'ATP intracellulaire n'est pas déterminant dans l'orientation des cellules vers la nécrose ou l'apoptose. En outre, nous avons montré que le processus apoptotique mis en jeu dans une atmosphère avec 40% d'oxygène implique l'activation de l'axe caspase 8 / caspase 3. Les variations de l'expression des gènes de ces protéases, analysées par RT-PCR semi-quantitative, ont confirmé ces résultats. Une analyse transcriptionnelle à grande échelle, réalisée à l'aide de microarrays, suggère également une intervention de la voie de signalisation pRb / E2F dans le processus apoptotique décrit.

IMPLICATION DES CALPAÏNES EXTRACELLULAIRES DANS LES MÉCANISMES DE LÉSION ISCHÉMIQUE DE L'ÉPITHÉLIUM TUBULAIRE

Carlos Frangié, Joëlle Perez, Julie Peltier, Jean-Philippe Haymann, Agnès Bellocq, Bruno Fouquieray et Laurent Baud
INSERM U 489, Hôpital Tenon, Paris

Les calpaïnes sont des protéases intracellulaires à cystéine dont l'activité est contrôlée par le calcium. Dans l'insuffisance rénale aiguë, l'activation des calpaïnes μ et m participe aux mécanismes d'apoptose puis de nécrose de l'épithélium bordant le tubule proximal. La nécrose entraîne la libération des calpaïnes dans la lumière tubulaire où elles pourraient participer à nouveau aux mécanismes de lésion et/ou, dans un deuxième temps, de réparation de l'épithélium. Le but de cette étude a été de rechercher *in vitro* les effets de calpaïnes extracellulaires sur le comportement de cellules épithéliales dérivées du tubule proximal humain (lignée HK-2). L'exposition de ces cellules à des concentrations de μ -calpaïne inférieures ou égales à 2 μ g/ml n'a entraîné aucune cytotoxicité, jugée sur l'exclusion du bleu Trypan (seulement 6,6% des cellules exposées à 1 μ g/ml de m -calpaïne n'excluaient pas le colorant). Elle a été suivie au contraire d'une augmentation discrète de l'incorporation de [³H]thymidine dans l'ADN après 24 h, sans modification du nombre de cellules après 48h. Elle a surtout provoqué une modification de la morphologie de ces cellules qui s'arrondissaient puis migraient sur la surface de la matrice extracellulaire pour former des agrégats. Cette réponse dépendait de la dose (entre 0,25 et 2 μ g/ml) et de l'activité catalytique de l'enzyme puisqu'elle était totalement prévenue par l'addition de calpastatine purifiée (6,5 μ g/ml), un inhibiteur très spécifique des calpaïnes. Elle se développait en moins de 15 minutes et était accentuée par la répétition des expositions à l'enzyme (2 à 3 fois à 30 minutes d'intervalle). Un examen en microscopie confocale après marquage de l'actine par la TRIC-phalloïdine a montré que l'exposition des cellules HK-2 à la m -calpaïne entraînait une réorganisation des filaments d'actine qui diminuaient en nombre et se redistribuaient vers la membrane.

En conclusion, présentes dans le compartiment extracellulaire, les calpaïnes limitent l'adhérence et favorisent la migration des cellules épithéliales tubulaires. Cette réponse pourrait être associée à la protéolyse du domaine extracellulaire d'intégrines comme l'intégrine β 1.

L'EFFET ANTIPROLIFÉRATIF DE LA BRADYKININE EST ASSOCIÉ À L'ACTIVATION DES RÉCEPTEURS B1 ET B2 VIA LE RECRUTEMENT DIRECT DE LA TYROSINE PHOSPHATASE SHP2

Duchêne J., Schanstra J.-P., Pecher C., Estève J.-P., Susini C., Bascands J.-L. et Girolami J.-P. INSERM U 388 et U531 Toulouse, France

Nous avons récemment démontré que l'existence d'une interaction de type protéine-protéine entre une séquence ITIM (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif) du récepteur B2 de la bradykinine (BK) et la protéine SHP2 est associée à un effet anti-prolifératif de la BK sur plusieurs types cellulaires (cellule mésangiale, CHO, HK2). Cependant, il existe 2 récepteurs de la bradykinine, le récepteur B2 (RB2) exprimé de manière constitutive, et le récepteur B1 (RB1) qui est induit lors des réactions inflammatoires mais également au cours du traitement par un inhibiteur de l'enzyme de conversion. Afin de comparer les potentialités anti-prolifératives de ces 2 récepteurs nous avons établi une lignée de cellule mésangiale surexprimant de manière stable le RB1, situation pouvant mimer un état inflammatoire fréquent au niveau du glomérule rénal. La stimulation de ces cellules par l'agoniste B1 est associée à une effet anti-prolifératif supérieur à celui de la stimulation du RB2. Nous avons ensuite identifié une interaction de type protéine-protéine identique à celle démontré pour le RB2. Cependant, la séquence ITIM du RB1 (VIYVFA) est différente de celle du RB2 (LVYVIV). En utilisant la technologie du BIAcore, nous avons montré que la séquence ITIM-like présente sur le récepteur B1 permet bien le recrutement spécifique de la phosphatase SHP-2 avec une affinité de 5,74 nM. D'autre part, l'activation du RB2 est associée à une inhibition de la phosphorylation de Erk 1/2 et de la prolifération cellulaire induite par l'insuline par un mécanisme impliquant SHP2. Un effet inhibiteur du RB2 sur la signalisation de l'EGF (phosphorylation d'Erk 1/2) a été également démontré.

Ces résultats montrent 1) que le RB1 a également un pouvoir anti-prolifératif 2) une bonne conservation de la séquence ITIM soulignant les capacités anti-prolifératives de ce type d'interaction. Cet effet antiprolifératif de la BK renforce le concept émergent d'un rôle néphro-protecteur pour la BK et ses récepteurs.

RÔLE DE L'ONCOGÈNE JUND DANS LA PROLIFÉRATION DES CELLULES TUBULAIRES ET LA PROGRESSION DES LÉSIONS RÉNALES APRÈS RÉDUCTION NÉPHRONIQUE

Evangeline Pillebout¹, Jonathan Weitzman², Martine Burtin¹, Moshe Yaniv², Gérard Friedlander¹ et Fabiola Terzi¹

¹INSERM U426, Faculté Bichat, 16, rue H. Huchart, 75018 Paris

²RS URA 1644, Institut Pasteur, Paris

De récentes études suggèrent qu'une augmentation de la prolifération cellulaire joue un rôle déterminant dans le développement des lésions rénales après réduction néphronique. Les facteurs impliqués dans ce phénomène sont peu connus. AP-1, facteur de transcription résultant de la dimérisation de protéines de la famille Jun ou Fos et participant à la transduction de l'effet mitogène de nombreux facteurs de croissance, pourrait être un élément clé. JunD est un des partenaires de ce complexe qui, à la différence des autres molécules, agit en dominant négatif, inhibant la prolifération cellulaire.

Le but de ce travail a été d'évaluer le rôle d'AP1 dans le processus de détérioration rénale, en analysant l'impact d'une réduction néphronique (réduction de 75% de la masse rénale) à différents temps après la chirurgie, chez des souris dont le gène JunD a été inactivé par recombinaison homologe. Nous montrons que : a) la réduction néphronique entraîne des lésions rénales sévères uniquement chez les souris mutantes ; b) la détérioration du parenchyme rénal est associée à la persistance d'une prolifération cellulaire importante, alors que chez les souris sauvages elle diminue significativement dès un mois après la réduction néphronique ; c) la prolifération des cellules tubulaires est corrélée positivement à la sévérité des lésions rénales et au nombre de cellules exprimant la β -galactosidase, un gène rapporteur dont l'expression est sous le contrôle du promoteur JunD ; d) les cellules qui prolifèrent ne sont pas celles qui expriment la β -galactosidase, suggérant l'existence d'un médiateur para/autocrine de la prolifération cellulaire dont l'expression serait contrôlée par JunD ; e) enfin, l'expression du TGF- α (Transforming Growth Facteur- α) augmente chez les souris mutantes, 2 mois après la réduction néphronique.

L'ensemble de ces résultats suggère que JunD serait l'élément clé du contrôle de la prolifération cellulaire après réduction néphronique, en inhibant, une fois la croissance compensatrice achevée, l'expression de TGF- α .

ROLE OF EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR ACTIVATION IN THE DEVELOPMENT OF RENAL VASCULAR FIBROSIS

Sandrine Placier, Hélène François, Jean-Claude Dussault and Christos Chatziantoniou INSERM U.489, Hôpital Tenon, 75020 Paris, France

We have previously observed that profibrotic peptides, such as endothelin, transactivate the EGF receptor in the aortic tissue *ex vivo*. Our present objective was to study whether such a transduction mechanism could be observed in physiopathological conditions *in vivo*. To this end, we have studied the role of EGF receptor activation in the renal vasculature of NO-deficient rats, a hypertensive model in which renal vascular remodelling and fibrogenesis are mainly due to endothelin and angiotensin II actions. NO deficiency was induced in Sprague-Dawley rats by oral administration of a NO synthase inhibitor (L-NAME) during 28 days. In a first set of experiments, we verified by immunocytochemistry that the EGF receptor was present in the renal cortical tissue. Activation of EGF receptor (determined with an antibody specific to the phosphorylated state of the receptor) was increased after 14 days of L-NAME-treatment within renal vessels and glomeruli. This activation of EGFR was accompanied by increased activity of the Mitogen Activated Kinases (MAPK) p42/p44 pathway (using Western Blot analysis of phosphorylated compared to total MAPK p42/p44). At the same period, collagen I mRNA (measured by ribonuclease protection assay) was two-fold increased in renal vessels of L-NAME rats compared to normotensive controls. Concomitant treatment of the L-NAME with iressa, a specific inhibitor of the phosphorylated form of EGF receptor, normalized the MAPK activation and cancelled the abnormal increase of collagen I expression. To test whether these early activations of EGFR and the MAPK pathways were dependent on ET-1, a supplementary group of NO deficient rats was treated with bosentan, an ET-receptor antagonist. Bosentan mimicked the protective action of iressa as inhibited both, the MAPK activation and the increase of collagen I expression. We propose that EGF receptor activation is an important step of the fibrogenic process within the renal vasculature, at least in the model of NO deficiency. It should be interesting to further investigate whether inhibitors of growth factors, in addition to their well known anti-tumour action, could be used in the anti-fibrotic therapy as well.

LA PTHrP CONTRÔLE LA RÉPONSE TROPHIQUE DU MUSCLE LISSE VASCULAIRE AU STRETCH MÉCANIQUE

E. Schordan, J.-J. Helwig et T. Massfelder Pharmacologie & Physiologie Rénovasculaires (E0015 INSERM-UPL), Strasbourg

La protéine apparentée à la PTH (*PTH-related protein*, PTHrP) régule la tonicité et le remodelage vasculaire. Dans les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) son expression est stimulée par les constricteurs, les facteurs de croissance et les forces mécaniques (stretch) s'exerçant sur les parois vasculaires. Ces forces sont augmentées au cours de l'hypertension artérielle et régulent la trophicité de la paroi vasculaire. En 1997 nous montrions que la PTHrP exerce un effet paradoxal sur la prolifération des CMLV : inhibition par la voie autocrine via le récepteur PTH1, et stimulation par une voie *intracrine* via la translocation du peptide vers le noyau.

Nous montrons à présent que le stretch (10% d'élongation, 1Hz) des CMLV cultivées à partir d'artères intra-rénales (CMLVr) ou d'aorte (CMLAo) de rat, retarde la croissance et diminue la densité cellulaire au plateau et est à l'origine d'une augmentation de l'expression de l'ARNm de la PTHrP dès 4 h, augmentation qui se maintient pendant au moins 48 h. Les CMLAo ont ensuite été transfectées de façon stable par la PTHrP ou son antisens. Les résultats suggèrent que la surexpression de PTHrP s'oppose à l'inhibition de la prolifération en réponse au stretch. Cet effet ne semble pas dû à une action autocrine de la PTHrP, car ni l'addition de PTHrP, ni celle d'un antagoniste des RPTH1, n'affectent la prolifération des cellules sauvages. La transfection antisens, quant à elle, reste sans effet, probablement à cause de l'inefficacité de l'antisens à bloquer l'augmentation endogène de PTHrP en réponse au stretch. De plus, la surexpression de PTHrP, qu'elle soit obtenue par transgénèse ou par stretch des CMLAo sauvages, semble induire une surexpression de la culline-3, une protéine impliquée dans la dégradation de la cycline E.

En conclusion, dans les CMLAo, l'effet de la surexpression de la PTHrP, associé à l'absence d'effet de la PTHrP exogène sur la cellule sauvage, suggèrent que la PTHrP s'oppose à l'inhibition de la prolifération de ces cellules en réponse au stretch par une voie intracrine. La surexpression de culline-3 en réponse à une surexpression de PTHrP, non seulement est en faveur de cette conclusion, mais aussi suggère que l'une des cibles nucléaires de la PTHrP est la culline-3, contrôlant ainsi l'entrée en phase S et donc le cycle cellulaire.

EFFECTS OF ADVANCED GLYCATION END-PRODUCTS (AGES) ON EXTRACELLULAR MATRIX REMODELING BY HUMAN GLOMERULAR MESANGIAL CELLS

Isabelle Tostivint, Jeannig Berrou, Alexandre Hertig, Laure Champion, Françoise Delarue and Eric Rondeau
INSERM U489, Hôpital Tenon, 75020 Paris

AGES accumulate during diabetes, aging and renal insufficiency. They may play a role in the pathogenesis of vascular and renal fibrosis through the activation of membrane receptors and an imbalance between matrix degradation and synthesis. In the human glomerulus, the identification of the AGE receptors is incomplete and the effects of AGES upon the extracellular matrix synthesis and degradation are not known. The aims of this study were to characterize the AGEs-receptors on human mesangial cells in culture, and to analyse the effects of AGES on glomerular gene expression for matrix and proteolytic systems.

By RT-PCR, we showed that human glomerular mesangial cells express the AGEs-receptors mRNA for R1, R2 and R3, 3 of the 7 identified AGEs-receptors. By reverse fibrin autography, AGEs were found to increase the PAI-1 activity in the conditioned culture medium. By Northern-blot and ELISA, we showed that AGEs stimulate PAI-1 gene transcription and PAI-1 synthesis in a time- and dose- dependent manner. N acetyl cysteine, an antioxidant agent, and norleucine, an inhibitor of NF-kB decrease the AGE-induced transcription of PAI-1 gene. Plasminogen activators, t-PA and u-PA, seemed to be stimulated in zymography whereas MMP2, the main gelatinase produced by mesangial cells, seemed not to be influenced by the presence of AGEs. The preliminary results in microarray experiments indicates that AGEs induce the transcription of several genes among which the vitronectin precursor (x7) and the TIMP3 (x4.3) at 4 hours and laminin (x3.4), collagen VI alpha 3 (x4.3) and MMP9 at 8 hours. These results suggest that AGEs may exert a glomerular fibrogenic effect by a double mechanism: 1) the stimulation of the synthesis of the extracellular matrix components and 2) by stimulating PAI-1 and TIMP3 synthesis, they may inhibit the extracellular matrix degradation. Several receptors may be responsible for these effects, which are mediated by reactive oxygen radical formation and NF-kB activation.

Stress et rein

ARISTOLOCHIC ACID AND OCHRATOXIN A INTERFERE DIFFERENTLY WITH RECEPTOR-MEDIATED ENDOCYTOSIS IN PROXIMAL TUBULE CELLS

Lebeau C.¹, P. Verroust², V. Arit³, O. Devuyt⁴ and R. Beauwens¹

¹ Department of Physiopathology, CP 604, ULB, 808 Route de Lennik, B-1070 Brussels

² INSERM U538, CHU St Antoine, Paris

³ Institute of Cancer Research, Sutton

⁴ Division of Nephrology, UCL, Brussels

Low molecular weight proteinuria (LMWP) is an early sign of many tubulointerstitial nephritis as reported in Chinese herbs nephropathy (CHN) and Balkan endemic nephropathy (BEN). The pathogenic toxins were recently identified as aristolochic acid (AA) for CHN and ochratoxin A (OTA) for BEN. Their effects on receptor-mediated endocytosis were investigated in the opossum kidney (OK) proximal tubule cell line. Protein internalisation involves binding to megalin or to its co-receptor cubilin, with subsequent delivery into endosomes containing the CIC-5 channel. Lack of expression of any of these membrane proteins results in LMWP as reported in megalin or CIC-5 knockout mice and in cubilin-deficient dogs.

Exposure of OK cell monolayer to either AA or OTA (20 μ M) for 24 hours impaired the uptake of albumin by 60%. Recovery from this initial insult was evaluated by removal of the toxin for up to 6 days. Removal of AA induced a gradual, permanent inhibition of albumin uptake, whereas removal of OTA led to a progressive, nearly complete restoration of albumin internalisation after 3 days. The expression of endogenous megalin, cubilin and CIC-5 was estimated by immunoblotting cell extracts from OK monolayer exposed to the toxin for 24 hours and after 2 and 6-day recovery period. Exposure to AA induced a progressive, persistent decrease in megalin, cubilin and CIC-5 expression. In contrast, OTA treatment led only to a transient reduction of the expression of the three proteins. On the other hand, despite similar initial impairment of endocytosis, AA but not OTA induced the formation of specific DNA-adducts persisting even after 6-day recovery period. These data suggest that AA permanently decreases the expression of megalin, cubilin and CIC-5 in proximal tubule cells and thus persistently alters receptor-mediated endocytosis, whereas OTA only transiently affects this endocytic process. The persistence of endocytic dysfunction despite AA removal may be correlated to the persistence of specific DNA-adducts. Our results in OK cells exposed to AA and OTA provide new insight into the pathogenesis of CHN and BEN.

RÉABSORPTION DU CALCIUM, DU CADMIUM ET DU ZINC LE LONG DU NÉPHRON DE RAT : UNE ÉTUDE PAR MICRO-INJECTION

O. Barbier, G. Jacquillet, M. Tauc et P. Poujeol

UMR CNRS 6548, Université de Nice

Sophia Antipolis, 06108 Nice Cedex 2

L'exposition au cadmium (Cd^{2+}) induit des néphropathies qui résultent souvent d'une atteinte de l'homéostasie calcique. Notamment, le Cd^{2+} augmente les pertes urinaires de calcium (Ca^{2+}) ce qui conduit à la formation de calculs rénaux.

Notre objectif a été d'étudier les transports du Zn^{2+} , Ca^{2+} et du Cd^{2+} le long du néphron pour localiser les sites au niveau desquels le Cd^{2+} pourrait agir sur la réabsorption du Ca^{2+} et du Zn^{2+} .

Dans un premier temps, l'effet d'une charge aiguë de Cd^{2+} (10 μ M) sur la fonction rénale a été observé en utilisant la technique des clairances sur des rats wistars _ en condition non diurétique. Il apparaît que cette charge aiguë de Cd^{2+} ne modifie ni le débit urinaire ni la GFR. Par contre, l'excrétion fractionnelle de Ca^{2+} augmente alors que sa concentration plasmatique et sa quantité filtrée ne changent pas.

Dans un second temps, des microinjections de $^{45}CaCl_2$, $^{109}CdCl_2$ et $^{65}ZnCl_2$ ont été réalisées dans la lumière de tubules proximaux (PCT) précoces et terminaux et de tubules distaux (DCT) précoces et terminaux chez des rats en condition de diurèse saline. Exprimée en % de la quantité injectée, la réabsorption du Ca^{2+} s'élève à $3,3 \pm 0,4$ (n = 8) dans le PCT, $66,1 \pm 2,6$ (n = 15) dans l'anse de Henle et $22,2 \pm 0,9$ (n = 15) dans le DCT. Le lanthane (1 mM), le cadmium (20 μ M) et le gadolinium (100 μ M) inhibent fortement la réabsorption du ^{45}Ca dans le DCT : respectivement 41%, 61% et 65%. La nifédipine (20 μ M) ne modifie pas ce transport. Les microinjections de ^{109}Cd montrent que $9,8 \pm 1,7\%$ (n = 18) du Cd^{2+} injecté sont réabsorbés par le PCT, $46,8 \pm 3,8\%$ (n = 20) par l'anse de Henle et $38,3 \pm 3,1\%$ (n = 20) par le DCT. Le gadolinium bloque la réabsorption distale de Cd^{2+} à hauteur de 78%. Les microinjections de ^{65}Zn permettent d'observer que $26,6 \pm 3,6\%$ de la quantité injectée de Zn^{2+} sont réabsorbés par le PCT et $59,1 \pm 6,7\%$ par l'anse de Henle. Au niveau du DCT la réabsorption de Zn^{2+} est nulle.

En conclusion, le profil pharmacologique du transport distal de Ca^{2+} confirme *in vivo* le possible rôle du transporteur ECaC au niveau du DCT. Par contre, l'absence de transport distal du Zn^{2+} remet en cause l'hypothèse selon laquelle DMT1 (Nramp2) pourrait être le transporteur rénal de zinc. Enfin, le Cd^{2+} et le Ca^{2+} sont principalement réabsorbés dans l'anse de Henle et le DCT, empruntant vraisemblablement des voies de réabsorption communes. Le blocage du transport distal de Ca^{2+} par le Cd^{2+} pourrait expliquer l'hypercalciurie observée lors d'une intoxication au Cd^{2+} .

EFFETS DE LA TOXINE EPSILON DE CLOSTRIDIUM PERFRINGENS SUR LA PERMÉABILITÉ MEMBRANAIRE DES CELLULES DU TUBE COLLECTEUR DE SOURIS

Mahdi K., Bens M., Cluzeaud F., *Duong Van Huyen J.-P., Popoff M.R. et Vandewalle A. INSERM U478, Faculté X. Bichat, 75870 Paris

*Service d'Anatomo-pathologie, Hôpital G. Pompidou, 75015 Paris

Unité des toxines Microbiennes, Institut Pasteur, 75015 Paris

La toxine epsilon (ϵ) de *Clostridium perfringens* est responsable de graves entérotoxémies bovines et ovines. Le mécanisme d'action de cette toxine, responsable de la formation de pores membranaires, reste cependant encore mal connu. La souris étant très sensible à l'action de la toxine ϵ et le rein étant son site électif de fixation, nous avons vérifié si la lignée de cellules mpkCCD_{cl4}, issues du tube collecteur de souris précédemment établie au laboratoire présente une sensibilité particulière à la toxine. Des électrophorèses ont montré que la toxine ϵ forme un complexe heptamérique dans les membranes plasmiques des cellules.

Les tests MTT de viabilité ont montré que la toxine ϵ , mais aussi la prototoxine ϵ (normalement peu ou pas active), induisent une mortalité cellulaire rapide ($IC_{50} = 5 \times 10^{-9}$ M). Des mesures de courant de court-circuit (Isc) ont montré que des doses sub-léthales de toxine (10^{-9} M) appliquées du côté apical des cellules entraînent une augmentation (x 2-3) transitoire de l'Isc et une chute rapide de l'Isc lorsque ϵ est appliquée du côté basal des cellules. Des mesures d'Isc réalisées en présence d'un sérum anti-toxine ϵ neutralisant ont démontré que la toxine se lie de façon spécifique aux membranes apicales et basolatérales des cellules. Des expériences d'Isc réalisées avec l'amiloride, un inhibiteur du canal Na^+ épithélial (ENaC) et l'ouabaine ont montré que la toxine entraîne une augmentation de la réabsorption de Na^+ dépendante des pompes Na^+K^+ -ATPases par des pores apicaux n'altérant pas l'activité de ENaC. Des d'immunofluorescences indirectes réalisées avec un anticorps anti ZO-1 ont confirmé que la toxine n'altère pas les jonctions serrées. Enfin, l'analyse ultrastructurale des cellules a montré que la toxine ϵ est responsable d'altérations mitochondriales sévères. Ces résultats démontrent que la lignée de cellules mpkCCD_{cl4} de tube collecteur de souris représente un modèle cellulaire idéal non seulement pour étudier les effets membranaires de la toxine ϵ , mais aussi pour définir les domaines membranaires de fixation de la toxine et à plus long terme cloner et identifier le récepteur de cette toxine.

MODULATION DIFFÉRENTIELLE *IN VIVO* DE LA RÉPONSE DILATATRICE À LA PTHrP DANS LES LITS VASCULAIRES RÉNAUX ET MÉSENTÉRIQUES AU COURS DE L'HYPERTENSION GÉNÉTIQUE

S. Welsch, T. Massfelder, J.-J. Helwig et M. Barthelmebs

Pharmacologie & Physiologie Rénovasculaires (E0015 INSERM-ULP), Strasbourg

La protéine apparentée à l'hormone parathyroïdienne (PTHrP) se lie au récepteur PTH1 dont l'activation entraîne une relaxation des territoires vasculaires rénaux et mésentériques. Nos études antérieures ont montré qu'*in vitro*, dans le rein isolé perfusé, la vasodilatation rénale induite par la PTHrP était diminuée chez des rats spontanément hypertendus (SHR) de 12 semaines comparés à leurs témoins normotendus, les rats WKY, et que la PTHrP contribuait à la résistance vasculaire rénale élevée du SHR.

Nous avons étendu ces observations par des études *in vivo*, chez le rat anesthésié (Inactine®), en perfusant la PTHrP (1-36) de façon pulsée dans l'artère rénale gauche afin d'éviter ses effets systémiques, selon la méthode de Parekh et coll. (Am J Physiol, 1995, 268: F967-71). Le débit sanguin a été mesuré par débitmétrie électromagnétique. L'action vasodilatatrice rénale induite par la PTHrP (3 nM) était diminuée chez le SHR par rapport au rat WKY ($-14,8 \pm 1,5\%$ vs $-23,8 \pm 0,9\%$, $m \pm SEM$, $n = 7-8$, $P < 0,001$). Inversement, au niveau mésentérique, la relaxation induite par la PTHrP était augmentée chez le SHR, aussi bien *in vivo*, en perfusant la PTHrP(1-36) dans l'artère mésentérique supérieure (3 nM: $-0,10 \pm 1,2\%$ vs $-5,1 \pm 1,2\%$, $n = 5-6$, $P < 0,05$), qu'*in vitro*, sur le lit mésentérique isolé perfusé (30 nM: $-16,2 \pm 2,8\%$ vs $-45,7 \pm 2,8\%$, $n = 6-8$, $P < 0,001$). Parallèlement, l'expression de la protéine réceptrice (western blot) était diminuée dans les artérioles rénales et augmentée dans les artérioles mésentériques. Cependant, l'ARNm du récepteur PTH1 (RT-PCR) était diminué dans les deux types de vaisseaux des SHR. Les raisons de cette discordance au niveau mésentérique entre ARNm et protéine réceptrice sont en cours d'étude.

En conclusion, le récepteur PTH1 est régulé de façon différente dans les artérioles de résistance rénales et mésentériques du SHR. De plus, l'altération de la réponse vasodilatatrice à la PTHrP dans ce modèle d'hypertension artérielle génétique pourrait être sélectivement localisée au niveau du lit vasculaire rénal.

INDUCTION DE LA P-GLYCOPROTÉINE EN SITUATION DE STRESS CELLULAIRE : RÔLE DE LA CARENCE EN GLUCOSE

D. Laouari, S. Ledoux et G. Friedlander
INSERM U 426, Faculté Xavier Bichat, Paris, France

Plusieurs transporteurs de la famille ABC sont exprimés dans le rein sans que leur fonction physiologique ait toujours pu être précisée dans cet organe. La P-glycoprotéine (P-gp), responsable d'un phénotype de chimiorésistance dans les cellules cancéreuses, est abondante dans la membrane apicale des cellules du tubule proximal. Outre sa fonction d'élimination des xénobiotiques, elle pourrait avoir un effet cytoprotecteur dans le rein. Son induction en réponse à différentes situations de stress cellulaire pourrait en effet avoir un rôle antiapoptotique.

Dans le but de préciser les facteurs qui régulent la P-gp en situation pro-apoptotique, nous avons étudié les effets de la carence en glucose sur l'expression de la P-gp dans trois lignées cellulaires de rat représentatives de sa distribution physiologique (tubule rénal, foie, endothélium). La carence en glucose a induit une augmentation parallèle de l'expression des ARNm de la P-gp (mdr1a et b), de l'expression de la protéine et de son activité de transport. Ces effets étaient reproduits par deux agents induisant une déglycosylation des protéines, le 2-désoxyglucose et la tunicamycine, et par la thapsigargine qui, comme les agents déglycosylants, induit un stress du réticulum endoplasmique. Dans ces situations, nous avons observé une augmentation de l'expression de c-jun et de l'activité de liaison du complexe AP1, suggérant que ce facteur pourrait être impliqué dans l'activation de la P-gp par la carence en glucose. Enfin, des données préliminaires montrent que les inhibiteurs de la P-gp (vérapamil, dipyrindamole) diminuent la viabilité cellulaire au cours de la carence en glucose.

En conclusion, l'induction de la P-gp par la carence en glucose pourrait être liée à une réponse de stress du réticulum, secondaire à la déglycosylation des protéines, et associée à une activation du complexe AP1. L'activation de la P-gp dans cette situation pro-apoptotique pourrait favoriser la survie des cellules.

LA VIMENTINE EST NÉCESSAIRE AU RÉTABLISSEMENT DU COTRANSPORT NA-GLUCOSE APRÈS ISCHÉMIE RÉNALE

I. Runembert, S. Couette, P. Federici, G. Friedlander et F. Terzi
INSERM U 426, Faculté de Médecine Xavier Bichat, Paris, France

La vimentine, filament intermédiaire exprimé uniquement dans les cellules mésenchymateuses, est réexprimée dans les cellules tubulaires rénales, *in vivo*, après une nécrose tubulaire aiguë et, *in vitro*, dans les cellules en culture. Le rôle de cette réexpression reste à déterminer. Nous avons montré récemment que l'absence de vimentine affecte l'activité et la localisation du cotransporteur SGLT1 dans les rafts membranaires de cellules tubulaires proximales en culture primaire.

Le but de cette étude a été d'évaluer la signification de ce phénotype *in vivo*, en étudiant le transport tubulaire de glucose lors d'une ischémie rénale bilatérale (clampage du pédicule vasculaire pendant 30 minutes) chez des souris dont le gène de la vimentine a été invalidé par recombinaison homologue (*Vim*^{-/-}) et chez des souris sauvages issues de la même portée (*Vim*^{+/+}). Deux jours après l'ischémie, la capture de glucose dépendante du sodium diminue significativement dans les vésicules de membranes de bordures en brosse (BBMV). La même diminution est observée chez les souris *Vim*^{-/-} et *Vim*^{+/+}; elle s'accompagne d'une réduction de l'abondance de la protéine SGLT1 dans les BBMV. Dès dix jours après l'ischémie, le transport de glucose augmente chez les souris *Vim*^{+/+} et devient comparable à celui de souris contrôles. En revanche, la capture de glucose reste diminuée chez les souris *Vim*^{-/-}, et ceci jusqu'au temps le plus tardif de notre étude, 28 jours après l'ischémie. Les modifications de la protéine SGLT1 dans les BBMV sont parallèles à celles du transport Na-glucose. De même, l'excrétion urinaire de glucose augmente dès 24 heures après l'ischémie dans les deux groupes expérimentaux, redevient normale dès 10 jours chez les souris *Vim*^{+/+} mais persiste jusqu'au jour 28 chez les souris *Vim*^{-/-}. La morphologie rénale, l'intégrité du réseau d'actine et la présence des jonctions serrées sont comparables chez les souris *Vim*^{-/-} et *Vim*^{+/+} à tous les temps expérimentaux. De façon intéressante, l'expression de la vimentine est détectée dans les bordures en brosse des souris *Vim*^{+/+} à partir de 10 jours après l'ischémie.

En conclusion, ces résultats suggèrent que la réexpression de la vimentine dans les tubules lésés permet de rétablir une activité de transport de glucose en permettant la mise en place des transporteurs sodium-glucose dans la membrane apicale.

DIFFERENTIAL REGULATION OF CYCLOOXYGENASE (COX) ISOFORMS IN RESPONSE TO VASOACTIVE HORMONES

Franziska Theilig, Benno Nafz (*) and Sebastian Bachmann
Department of Anatomy, and Physiology (*), Charité, Humboldt University
Augustenburger Platz 1, D-13353, Berlin

Renal prostaglandins derived from COX isoforms act to adjust salt and water balance of the kidney. COX-2 is regulated upon changes in NaCl transport and hormonal stimuli. Less is known on changes in COX-1 and the downstream acting prostaglandin E synthase, PGES. We analyzed the immunoreactivity (ir) and protein levels (Western blot) of these enzymes in 2K1C Goldblatt condition (2K1C), during angiotensin II-blockade (Cand) and during bradykinin-2 receptor blockade treatment (HOE 140) in rat kidneys. We detected COX-2 in cTAL, and COX-1 and PGES in the DCT, CNT and the entire CD. COX-2 ir was increased 2-fold in the clipped kidney of 2K1C, decreased by 67.2% in the non-clip kidney, increased 5.2-fold after Cand, and decreased by 52.2% after HOE140 (p < .05). COX-1 protein expression was not changed by 2K1C, but increased 3-fold after Cand (p > .05). HOE140 induced an increased ir for COX-1 and PGES in DCT and CNT. Results indicate that COX-1 and COX-2 are differentially regulated by local paracrine hormones.

SÉQUESTRATION INAPPROPRIÉE DES ANTHRACYCLINES DANS LE COMPARTIMENT LYOSOMAL ACIDE DE CELLULES TUBULAIRES PROXIMALES DE REIN RÉSISTANTES AUX DROGUES : RESTAURATION DE LA SENSIBILITÉ PAR LES INHIBITEURS DES PROTONS ATPases VACUOLAIRES

Vandewalle A., Ouar Z., Bens M., Cluzeaud F., *Paulais M. et R. Lacave
INSERM U478
*U426 Faculté X. Bichat, 75870
Laboratoire d'Histologie et Biologie Tumorale, Hôpital Tenon, 75020 Paris

L'acquisition d'une résistance multiple aux drogues (MDR) par les cellules cancéreuses représente un obstacle majeur à l'efficacité de la chimiothérapie. Elle s'accompagne généralement d'une surexpression du gène MDR codant pour la P-glycoprotéine (P-gp) responsable d'une diminution de l'accumulation cellulaire des drogues. Cependant, d'autres mécanismes, ne faisant pas intervenir la P-gp ou d'autres transporteurs ABC, peuvent aussi participer au phénomène MDR. Dans ce travail, nous avons étudié la distribution d'une anthracycline, la daunomycine, dans une lignée de cellules tubulaires proximales sensibles aux drogues (PKSV-PR) et leur contrepartie MDR obtenue après sélection par la colchicine (PKSV-PR_{col50}). Des expériences de fluorescence sur cellules vivantes avec la sonde LysoTracker Red DND-99 ont montré que les cellules PKSV-PR_{col50} ont une densité plus importante de lysosomes sans modification notable des valeurs de pH lysosomal (PKSV-PR_{col50}: 5,74 ± 0,02, n = 330; PKSV-PR: 5,66 ± 0,02, n = 62). Les cellules PKSV-PR_{col50} excrètent aussi deux fois plus d'enzymes lysosomales (NAG et GUS) que les cellules PKSV-PR. La daunomycine, essentiellement répartie dans le cytoplasme et les noyaux des cellules PKSV-PR, s'accumule quasi exclusivement dans les lysosomes des cellules PKSV-PR_{col50}. Un traitement par la concanamycine (CCM A, 20 nM), un inhibiteur des protons ATPases vacuolaires, responsable d'une alcalinisation rapide du compartiment lysosomal, est sans effets sur les cellules PKSV-PR mais induit une redistribution nucléo-cytoplasmique de la daunomycine. De plus, la CCM A et la bafilomycine A1 (20 nM) entraînent une resensibilisation des cellules MDR PKSV-PR_{col50} à la daunomycine, la doxorubicine et l'épirubicine. Ces résultats montrent qu'une séquestration inappropriée de drogues, comme les anthracyclines, dans les organelles acides des cellules MDR peut représenter un obstacle supplémentaire à l'efficacité de la chimiothérapie en cancérologie.